



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PERİTONİT OLUŞTURULAN RATLARDA
HIGH MOBILITY GROUP BOX-1 (HMGB-1) VE TÜMÖR
NEKROZİS FAKTÖR- α (TNF- α) İNHİBİSYONUNUN
GASTROİNTESTİNAL MOTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Burçin TUŞTAŞ AY
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Dinçer AVLAN**

Mersin-2007

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL PERİTONİT OLUŞTURULAN RATLARDA
HIGH MOBILITY GROUP BOX-1 (HMGB-1) VE TÜMÖR
NEKROZİS FAKTÖR- α (TNF- α) İNHİBİSYONUNUN
GASTROİNTESTİNAL MOTİLİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Burçin TUŞTAŞ AY
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Dinçer AVLAN**

**Bu tez, BAP-TF CTB (DA) 2006-3 kodlu proje olarak Mersin
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.**

Mersin-2007

TEŞEKKÜR

Üniversitemizde Atatürk ilkelerine uygun, çağdaş ve gelişmelere açık, akademik bir ortamda çalışmamız için yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Rektörümüz Sayın Prof. Dr. Süha AYDIN ve Dekanımız Sayın Prof. Dr. Güliz İkizoğlu'na,

Çocuk cerrahisi eğitimimde büyük emeği bulunan, başta Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Selim Aksöyek olmak üzere, Doç. Dr. Ali NAYCI, tez danışmanım Doç. Dr. Dinçer AVLAN, Yrd. Doç. Dr. Gökhan Gündoğdu ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitimime katkıları olan tüm hocalarıma, kıdemlilerim Uzm. Dr. Eda ÇINGI ve Uzm. Dr. Hakan TAŞKINLAR, çalışma arkadaşım araştırma görevlisi Dr. Nuri ŞİMŞEK'e, tüm servis hemşirelerimiz ve çalışanlarına,

Tezimin başlangıç aşamasından son aşamasına kadar, tezin verilerinin toplanması ve yorumlanmasında her türlü yardımı sağlayan hocalarım Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR, Doç. Dr. Ayşe POLAT, Doç. Dr. Lülüfer TAMER, Doç. Dr. Arzu KANIK, Doç. Dr. Ali BİÇER'e ve Farmakoloji, Biyokimya ve Biyoistatistik anabilim dallarında çalışan araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Tüm yaşamım boyunca sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiren anneme, babama ve ağabeyime, beni hiç yalnız bırakmayan eşime ve kızıma teşekkür ederim.

Dr. Burçin TUŞTAŞ AY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	7
1.GİRİŞ VE AMAÇ	8
2.GENEL BİLGİLER	10
2.1. Anatomi	10
2.1.1 Periton	10
2.1.2 İncebarsaklar	10
2.2. Gastrointestinal Motilitenin Hormonal Kontrolü	11
2.3. Gastrointestinal Motilitenin Sinirsel Kontrolü	12
2.3.1. Enterik Sinir Sistemi (İntrinsik İnnervasyon)	12
2.3.2. Otonom Sinir Sistemi (Ekstrinsik İnnervasyon)	12
2.4. Peristaltizm	14
2.5. Peritonit	15
2.6. İnflamasyon	22
2.6.1. Akut İnflamasyon	22
2.6.2. Kronik İnflamasyon	23
2.6.3. İnflamasyonun Kimyasal Medyatörleri	23
3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER	30
3.1.Deney Hayvanlarının Seçimi	30
3.2. Deney Modeli	30
3.3.Deney Protokolü	31
3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.5. Biyokimyasal Analizler	32
3.5.1.Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması	32
3.5.2. Serum TNF- α Ölçümü	32

3.5.3. Doku Malondialdehit (MDA) Ölçümü	32
3.5.4. Doku Myeloperoksidaz (MPO) Ölçümü	33
3.6. Histopatolojik Değerlendirme	33
3.7. Organ Banyosu	34
3.8. İstatistiksel analiz	35
4.BULGULAR	36
4.1.Biyokimyasal Analiz Sonuçları	36
4.2. Histopatolojik H-E Boyama Sonuçları	38
4.3. Organ Banyosu Sonuçları	42
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	53
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	61
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	63
TABLolar DİZİNİ	64

ÖZET

Bu deneysel çalışmada, peritonitte gelişen ileusun fizyopatolojisinde inflamasyonun erken medyatörü Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) ve geç medyatörü High Mobility Group Box-1 (HMGB-1)'in rolü ve bu medyatörlerin inhibisyonunun barsak motilitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada her birinde 8 Wistar Albino cinsi erişkin rat içeren 4 grup oluşturuldu. Kontrol grubuna laparotomi yapıldı, çekum ligasyonu ve perforasyonu yapılmadan sadece manipulasyon uygulandı. Peritonit grubuna laparotomi yapıldı, çekum ligasyonu ve perforasyonu uygulandı. Etanercept grubuna laparotomi ile çekum ligasyonu ve perforasyonu yapılarak peritonit oluşturuldu. Peritonitten 1 ve 4 saat sonra intraperitoneal (i.p.) 8 mg/kg/doz etanercept uygulandı. Etil pirüvat grubuna ise, laparotomi yapılarak çekum ligasyonu ve perforasyonu ile oluşturulan peritonitten 12 ve 24 saat sonra i.p. 40 mg/kg/doz etil pirüvat uygulandı. Ratlardan 36 saat sonra alınan ileum örneklerinde biyokimyasal incelemelerle doku malondialdehit (MDA) ve myeloperoksidaz (MPO) düzeyleri, kan örneklerinde TNF- α düzeyleri ölçüldü. Histopatolojik incelemelerde ışık mikroskobu ile ileum duvarındaki hasar, Chiu skorlaması ve semikantitatif skorlama ile değerlendirildi. Organ banyosu ile ileumun elektriksel uyarı, potasyum klorür (KCl) ve karbakole (CCh) verdiği kasılma yanıtları incelendi.

Peritonitle artan serum TNF- α düzeylerinin etanercept grubunda, doku MDA ve MPO seviyelerinin hem etanercept hem de etil pirüvat gruplarında önemli ölçüde azaldığı saptandı. Işık mikroskopik kesitlerde peritonit grubunda epitelde ileri derecede kalkmalar, yer yer soyulma, lamina propriada konjesyon, serozada nötrofil infiltrasyonu izlenirken etanercept ve etil pirüvat gruplarında peritonitin neden olduğu histopatolojik değişikliklerin anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Organ banyosunda ileal dokulara elektriksel uyarı verildiğinde etanercept grubunda kasılma yanıtlarının güçlendiği görüldü. Yüksek doz KCl'e verilen kasılma yanıtlarının etil pirüvat grubunda, kümülatif CCh uygulamasına verilen kasılma yanıtlarının ise etanercept grubunda düzeldiği izlendi.

Bu çalışma peritonitte ortaya çıkan barsak doku hasarı ve barsak motilite değişikliklerinde TNF- α ve HMGB-1'in farklı mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu göstermektedir. Bu sitokinlerin inhibe edilmesi ile intestinal hasarın düzelmesi ve bozulan barsak motilitesinin iyileşmesinin hangi yollar üzerinden olduğu ve hangi mekanizmaların etkili olduğunun kesinleşebilmesi için daha çok sayıda deneysel ve klinik çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Peritonit, ileus, TNF- α , HMGB-1, etanercept, etil pirüvat

ABSTRACT

In this experimental study, the role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) that is early mediator of inflammation and high mobility group box-1 (HMGB-1) that is late mediator of inflammation has been investigated in physiopathology of the ileus and affect of inhibition of these mediators on intestinal motility.

Thirty-two adult Wistar Albino rats divided randomly into four groups (n=8 in each group): Control group (laparotomy and manipulation of the small intestine), peritonitis group [(laparotomy and cecal ligation and puncture (CLP)], etanercept group [1 and 4 hours after CLP plus intraperitoneal (i.p.) 8 mg/kg/dose etanercept] and ethyl pyruvate group (12 and 24 hours after CLP plus i.p. 40 mg/kg/dose ethyl pyruvate). Thirty-six hours after CLP, tissue malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) levels in ileum samples and blood TNF- α levels measured with biochemical studies. In ileum samples, the degree of histopathological changes was graded semi quantitatively using the histological injury scale previously defined by Chiu et al. and semi quantitative new scale. Contractility answers of ileum to electrical field stimulation, KCl and CCh evaluated with organ bath.

Blood TNF- α levels elevated in peritonitis group and reduce in etanercept group. Tissue MDA and MPO levels were reduce in both of etanercept and ethyl pyruvate groups. In histopathological evaluation with light microscope, extension of the subepithelial space with moderate lifting of the epithelial layer from the lamina propria, massive epithelial lifting down the sides of villi and congestion in lamina propria noticed in peritonitis group. These histopathological changes were significantly reduced in both of etanercept and ethyl pyruvate groups. In organ baths, the contractility answers of ileum were induced to electrical field stimulation and improve to cumulative CCh in etanercept group and improve to high doses of KCl in ethyl pyruvate group.

It has been shown that TNF- α and HMGB-1 causes intestinal injury and contractility in the peritonitis by different ways. More experimental and clinical studies are needed to explain exact pathways and mechanisms which result improvement of intestinal injury and motility with the inhibition of these cytokines.

Keywords: Peritonitis, ileus, TNF- α , HMGB-1, etanercept, ethyl pyruvate

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Peritonit, viseral ve/veya paryetal peritonu içine alan bir inflamasyondur. İnflamasyona sebep olan barsak içeriği, bakteriler, bakteri yıkım ürünleri, polimorfonükleer hücreler ve makrofajlar periton yüzeyinden ve diyafram altındaki porlardan hızla kan dolaşımına karışarak sistemik inflamatuvar yanıt ve sepsise neden olurlar. Tıbbi bakım ve tedavilerdeki gelişmelere rağmen peritoneal sepsis, yüksek mortalite oranı ile klinisyen ve araştırmacılar için sorun olmaya devam etmektedir.

Peritonda meydana gelen inflamasyon, hümmoral ve hüccresel immün yanıtın aracılık ettiği bir sürece tir. Hüccresel immünitede makrofajlar, mast hüccreleri, bazofiller, trombositler ve lenfositler rol oynarken, hümmoral immüniteyi immunglobulinler, kompleman sistemi, lökotrienler ve akut faz reaktanları oluşturur. Konakçının inflamasyona verdiği yanıt, inflamasyonun ortaya çıktığı bölgenin yanı sıra organizmanın tüm sistemlerine ait doku ve hüccrelerini etkiler. Bu süreçte gastrointestinal sistem motilitesi de özellikle etkilenmektedir ¹. İnflamasyona cevap olarak gastrointestinal sistem düz kaslarında meydana gelen değişiklikler klinikte incebarsaklarda ileus, kolonda ise diare şeklinde karşımıza çıkmaktadır. İleus, kritik hastalarda sıklıkla sepsis ve multiorgan yetmezliğine eşlik eder ve patofizyolojisine katkıda bulunur. İleus tablosu, barsak lümeninde staz oluşturarak bakteri içeriğinin artmasına, bu artış da bakteriyel translokasyona neden olarak sepsis-ileus-sepsis kısır döngüsünün oluşmasına neden olmaktadır. Diare ise, peritonitli yoğun bakım tedavisi gören veya inflamatuvar barsak hastalığı olan hastalarda görülen ve daha çok kolon motilitesindeki değişikliklerin neden olduğu düşünölen bir tablodur. Her ne kadar sepsiste görülen motilite bozukluğunun mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da, gastrointestinal düz kasların kasılma fonksiyonunda bozulma ile ilişkili olabilir ².

Sistemik inflamasyonun patofizyolojisinde sitokin kaskadı yer alır. TNF, interlökin (IL)-1 β , HMGB-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterize sepsiste, sitokinler doku hasarını sınırlamak için lokal koagülasyonu aktive edici yararlı inflamatuvar yanıtı tetikler. Ancak proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi, immün yanıtın normal düzenlenmesi ile üstesinden gelinebilecek orijinal

uyarıdan tehlikeli hale gelerek patolojik inflamatuvar bozukluk oluşturabilir ³. Genellikle sepsiste aşırı sitokin üretimi kapiller kaçak, doku hasarı ve multiorgan yetmezliği ile sonuçlanır. Sepsiste, etkilenen sistemlerden biri olan barsaklarda immün yanıtı aracılık eden sistem, barsak ilişkili lenfoid dokudur (gut-associated lymphoid tissue, GALT). Mukoza ilişkili lenfoid dokunun (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) bir parçası olan GALT'nun üç komponenti vardır: Peyer plakları (PP), intraepitelyal lenfositler ve lamina propriada yer alan lenfoid hücreleri ⁴. GALT'da yer alan muskuler makrofajların aktivasyonu ve muskularis eksternadan inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin salınması ile inflamatuvar kaskad başlar. Bu inflamatuvar ortam, dolaşımdaki lökositlerin birikimi ve lökosit kaynaklı maddelerin salınımı ile sonuçlanır ⁵. İntestinal muskularis propriada, proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesiyle inflamatuvar lökositler muskuler tabakaya ekstravaze olur. Serbestleştirilen medyatörlerin çoğu, intestinal düz kasların kontraktilesini direk inhibe ederek ileusa neden olur ^{5,6}.

İnflamatuvar sitokinlerden biri olan TNF- α erken sitokin yanıtına aracılık ederken, nükleer transkripsiyon faktörü olarak bilinen HMGB-1'in inflamasyonun geç medyatörü olduğu bildirilmiştir ⁷. Peritonit inflamatuvar bir süreç olup gelişen parolitik ileusta da bu sitokinlerin etkili olduğu bilinmektedir ^{8,9,10}. Çalışmada çekum ligasyonu ve perforasyonu yöntemi ile oluşturulan peritonit modelinde ortaya çıkan barsak motilite değişikliklerinin fizyopatolojisinde inflamasyonun erken medyatörü olarak bilinen TNF- α ve geç medyatörü olarak bilinen HMGB-1'in rolü ve bu sitokinlerin inhibisyonunun barsak motilitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anatomi

2.1.1. Periton

Batın duvarının iç yüzünü ve mezodermal kökenli batın içi organları saran zara periton adı verilir. Batın duvarının iç yüzünü örten paryetal, abdominal organları saran ise viseral peritondur. Paryetal ve viseral periton birbirinin kesintisiz devamı olup iki periton yaprağı arasında periton boşluğu yer alır ¹¹. Bu boşlukta seröz bir sıvı bulunur ve abdominal organların rahatça hareket edebilmesi için sürtünmesiz bir ortam sağlar. Periton sıvısı, peritoneal seroza tarafından salgılanan, yaklaşık 75-100 ml miktarda, protein içeriği 3 g/dl olan seröz vasıfta lenf sıvısıdır. %80 diyafram tarafından emilir ve santral dolaşıma torasik lenfatikler yoluyla katılır. Büyük moleküller laküna adı verilen diyaframa komşu peritoneal mezoteldeki lenfatiklerden emilir. Barsak perforasyonu sonucu ortaya çıkan bakteri ve ürünleri, bu yolla sistemik dolaşıma geçer. Periton içine verilen terapotik ajanlar da aynı şekilde sistemik dolaşıma geçerek etki ederler ¹².

2.1.2. İncebarsaklar

İncebarsaklar, sindirim kanalının mide ile kolon arasında uzanan parçasıdır. Kanalın en uzun bölümü olup pilor ile mideden, ileoçekal valf ile kolondan ayrılır. Uzunluğu taze kadavrada 6-7m, canlılarda kas tonusu nedeniyle 5m kadardır. Çapı başlangıçtan sona doğru yavaş yavaş azalır. İncebarsaklar, genellikle abdomenin orta ve alt kısımlarında bulunurlar. Duodenum, jejenum ve ileum olmak üzere üç kısımdan oluşur.

Duodenum; incebarsağın en kısa, en geniş ve en az hareketli kısmıdır. Mezenteri yoktur ve kısmen periton ile örtülüdür. Pilordan başlar, duodenojejunal fleksura suspensor ligamente (Trietz) kadar uzanır. Trietz ligamenti, fibromuskuler bir bant olup duodenumu tespit eder. Duodenum superior, inen, inferior ve çıkan kısım olmak üzere dört bölümden oluşmuştur.

Jejenum; ortalama 4 cm çapında olup ileuma göre kanlanması daha fazla ve villusları daha büyüktür. Jejenumun büyük bir bölümü umblikal bölgede bulunur. İlk jejenum kısmı transvers mezokolonun sol parçası ile sol böbreğin ön yüzü arasındaki çıkımda yer alır.

İleum; yaklaşık 3.5 cm çapındadır. Duvarı jejenumdan daha incedir. Büyük bir kısmı hipogastrik ve pelvik bölgelerde bulunur. Terminal parçası pelviste yer alır. Sağ psoas kasının ve sağ iliak damarların üzerinden yukarıya doğru yükselir ve sağ iliak fossada çıkan kolon ile çekumun birleşme yerinin medial tarafına açılır. Lenf follikülleri, jejenumdakilere göre daha fazla sayıda ve daha geniştir.

İncebarsakları saran peritona mezenter denir. Mezenter, incebarsakları sardıktan sonra batın arka duvarına tutunur.

Jejenum ve ileum duvarları seroza, muskuler tabaka, submukoza ve mukoza olmak üzere dört tabakadan oluşur. Mukozada sirküler plikalar, villuslar, lenf follikülleri ve bezler bulunur. Kas tabakası dışta longitudinal, içte sirküler olmak üzere iki tabakadan oluşur. Jejenum ve ileum, arterlerini superior mezenterik arterden alırlar. Jejunal ve ileal arter dalları, mezenterin iki yaprağı arasında mezenterik kenardan barsağa dik olarak girerler, muskuler tabakayı geçerek submukozada pleksuslar oluştururlar. Venleri de arterlere benzer. Lenf damarları, iki grup halinde, mukozada ve muskuler tabakada bulunurlar. Villusların lenf damarları bu oluşumlardan başlar. Mukoza ve submukozada karışık bir pleksus yaparlar. Lenfatik follikül tabanında lenf damarları ile birleşirler. Muskuler tabakanın lenf damarları ise, iki kas tabakası arasında bulunur ve burada pleksus yaparlar. Mukozadan gelen lenf damarları ile birleştikten sonra barsakların mezenterik kenarında daha geniş damarlara açılırlar.

İncebarsakların parasempatik sinirleri vagustan, sempatikleri ise splanchnik sinirlerden, çöliak ganglion ve superior mezenterik arter yoluyla barsağa gelirler. Sinir lifleri, kas tabakaları arasında (myenterik pleksus) ve submukozada (Meissner pleksusu) olmak üzere iki sinir ağı oluştururlar¹³.

2.2. Gastrointestinal Motilitenin Hormonal Kontrolü

Gastrointestinal sistem vücuttaki en büyük endokrin organ olup içerdiği endokrin hücreleri, enterik endokrin sistem olarak adlandırılır. Sindirim fonksiyonlarının endokrin kontrolü, enterik endokrin sistem tarafından salgılanan hormonal medyatörler aracılığı ile sağlanır. Bu hormonların birçoğu aynı zamanda gastrointestinal kanalın bazı bölümlerinde motiliteyi de etkilemektedirler. Bu etkiler hormonların salgı faaliyetine oranla daha az olmakla birlikte önemli olanları şunlardır:

Kolesistokinin; barsak lümeninde yağlı maddelerin bulunması ile jejenum mukozasından salınan bu hormon safra kesesinde kontraksiyona neden olan çok güçlü bir etkiye sahiptir. Safra barsağa akarak yağlı gıdaları emülsiyona uğratar ve sindirilip emilmelerini kolaylaştırır. Aynı zamanda mide motilitesini de bir dereceye kadar inhibe eder. Böylece kolesistokinin, safra kesesini kontrakte edip safranın barsağa akmasını sağlarken, mide motilitesini azaltıp mide içeriğinin barsağa geçişini azaltarak barsak lümenindeki yağların sindirimi için zaman kazandırır.

Sekretin; mideden asidik kimusun pilor yoluyla duodenuma geçmesi sonucunda duodenum mukozasından salınır. Gastrointestinal sistemin hemen tamamında inhibitör etki gösterir.

Gastrik inhibe edici peptit; incebarsakların proksimal kesiminde yağ ve karbonhidrat bulunmasına cevap olarak barsak mukozasından salınır. Mide motilitesini inhibe ederek barsak lümeni proksimalde dolu iken mide boşalmasını yavaşlatır.

2.3. Gastrointestinal Motilitenin Sinirsel Kontrolü

Gastrointestinal sistemin sinirsel kontrolü, enterik (intrinsik) ve otonom (ekstrinsik) sinir sistemi olarak iki ayrı sisteme sahiptir.

2.3.1. Enterik Sinir Sistemi (İntrinsik İnnervasyon)

Gastrointestinal sistem, özofagustan başlayıp anüse kadar devam eden intrinsik sinir sistemine sahiptir ve enterik (intramural) sinir sistemi olarak adlandırılır. Bu sistem tamamen barsak duvarında yer alır. Başlıca iki nöron tabakası ve aralarındaki bağlayıcı liflerden oluşur. Longitudinal ve sirküler kas tabakası arasında seyreden myenterik (Auerbach), submukozada yer alan ise submukozal (Meissner) pleksus olarak adlandırılır. Myenterik pleksus başlıca gastrointestinal hareketleri kontrol ederken, submukozal pleksus salgı ve kan akımını kontrol eder.

Myenterik pleksus, genel olarak gastrointestinal kanalın tümü boyunca uzanan, birbiri ile ilişkili nöronların zincir şeklinde sıralanması ile meydana gelir ve muskuler tabakada yer aldığı için, temel olarak barsak boyunca oluşan motor aktivitenin kontrolü ile ilgilidir. Myenterik pleksusun uyarılması, barsağın motor aktivitesini arttıran başlıca dört etki yapar: Tonik kontraksiyonları ya da barsak duvarının tonusunu, ritmik kontraksiyonların şiddetini, ritmik kontraksiyonların frekansını ve peristaltik dalgaların hızlanmasına neden olan uyarıcı dalgaların

ileti hızını arttırır. Eksitatör liflerin büyük kısmı kolinerjik olup asetilkolin (Ach) salgırlarlar ¹⁴. Bununla birlikte bazı myenterik pleksus lifleri vazoaktif intestinal polipeptit (VIP), nitrik oksit (NO), adenin trifosfat (ATP) gibi nörotransmitterler salgılayarak inhibitör etki gösterir. Bu inhibitör transmitterler, pilor sfinkteri gibi midenin boşalmasını, ileoçekal valf gibi incebarsağın kolona boşalmasını kontrol eder.

Submukozal pleksus ise, her bir küçük barsak segmentinin iç duvarındaki kontrolden sorumludur. Birçok duyusal sinyal gastrointestinal epitelden salgılanır ve daha sonra submukozal pleksusta toplanarak lokal intestinal sekresyon, absorpsiyon ve mide mukozasının çeşitli derecelerde katlanmasına neden olan submukozal kasın lokal kontraksiyonuna neden olur ^{14,15}.

2.3.2. Otonom Sinir Sistemi (Ekstrinsik İnnervasyon)

Enterik sinir sistemi her ne kadar kendi kendine fonksiyon görse de, sindirim fonksiyonu enterik sinir sistemi ile santral sinir sistemi arasında iletişim gerektirir. Gerekli iletişim, santral sinir sistemini enterik sinir sistemine ve de santral sinir sistemini direk olarak sindirim kanalına bağlayan sempatik ve parasempatik sinir lifleri tarafından sağlanır. Gastrointestinal sistem, barsakların tümünü ya da özel bölgelerin aktivitesini değiştirecek kadar geniş parasempatik ve sempatik innervasyon taşır. Böylece gastrointestinal sistem santral sinir sistemine duyusal bilgiler sağlarken, santral sinir sistemi de gastrointestinal fonksiyonu etkiler.

Sempatik stimölasyon, gastrointestinal sekresyon ve motor aktiviteyi inhibe eder, sfinkterlerin ve kan damarlarının kontraksiyonuna yol açar. Parasempatik stimölasyon ise, sindirim aktivitesini uyarır ^{14,15,16}.

Parasempatik İnnervasyon: Splenik fleksuraya kadar mide ve barsakların parasempatik innervasyonu vagus siniri tarafından, splenik fleksuradan sonraki barsak segmentlerinin parasempatik innervasyonu ise spinal kordun 2, 3 ve 4. sakral segmentinden köken alan parasempatik liflerden sağlanır. Parasempatik sistemin preganglionik lifleri myenterik ve submukozal pleksusta sonlanır. Postganglionik lifler düz kasları ve salgı bezlerini innerve eder, peristaltizmi ve sekresyonu uyarırken, sfinkterleri gevşetir ^{14,15,16}.

Sempatik İnnervasyon: Medulla spinaliste T8 ile L2 arasındaki segmentlerden kaynaklanan preganglionik sempatik lifler, çöliak ve mezenterik ganglionlarda sonlanırlar. Postganglioner nöron hücrelerinin bulunduğu bu ganglionlardan

başlayan postganglioner lifler, kan damarlarıyla birlikte barsakların tüm bölümlerine gidip enterik sinir sistemindeki nöronlarda sonlanırlar. Sempatik sinir uçlarından norepinefrin salgılanır. Sempatik sistemin stimülasyonu gastrointestinal sistemin aktivitesini inhibe eder. Norepinefrinin düz kaslar üzerine direk inhibitör etkisi ve yine norepinefrinin enterik sinir sistemi nöronları üzerindeki geniş inhibitör etkisiyle gastrointestinal sistem aktivitesi inhibe olur ¹⁴.

Gastrointestinal sistem, barsak duvarı ve mukozasındaki reseptörler aracılığı ile algılanan uyarıları, santral sinir sistemine ileten vagal ve splanknik afferent sinirler ile zengin bir şekilde innerve edilmiştir. Afferent sinirler üç gruba ayrılabilir.

a) Hücre gövdeleri enterik sinir sistemi içinde olup yine enterik sinir sistemi içinde sonlananlar: Mukozanın irritasyonu ile, gastrointestinal sistemin distansiyonuyla, lümen içindeki spesifik kimyasal maddelerin varlığı ile uyarılırlar. Bu lifler aracılığı ile iletilen sinyaller, intestinal motilitenin ve sekresyonun uyarılmasına ve inhibe edilmesine neden olurlar.

b) Hücre gövdeleri enterik sinir sistemi içinde olup aksonları ekstrinsik sinirler yoluyla prevertebral parasempatik ganglionlarda (çöliak, hipogastrik, mezenterik) sonlanırlar.

c) Hücre gövdeleri spinal kordun dorsal kök ganglionlarında ya da kranial sinirlerin ganglionlarında bulunanlar: Bu lifler sempatik ve parasempatik sinir trunkusları ile beraber ilerleyerek sinyallerini direk olarak spinal korda ya da beyin sapına iletirler ve bu sinyaller gastrointestinal sisteme geri dönen ve fonksiyonlarını kontrol eden birçok afferent motor sinyaller oluşturur ^{14,15,16}.

2.4. Peristaltizm

Peristaltizm, gastrointestinal sistemin temel ilerletici hareketi olup lümen içeriği tarafından barsak duvarının gerilmesi ile başlayan refleks bir yanıttır ve sindirim kanalının bütün bölgelerinde oluşur. Peristaltizmi başlatan diğer uyarılar, barsak yüzey epitelinin irritasyonu ve ekstrinsik sinir sinyalleridir. İntestinal kanalda bir segment, gerilme yoluyla uyarıldığı zaman peristaltik hareket başlarken, gerilen barsak segmentinin hafifçe kranial tarafında kontraktıl halka ortaya çıkar; sonra gerilmiş segmente doğru ilerleyerek barsak içeriğini kaudal yöne doğru iter. Aynı zamanda, barsak kaudal yönde birkaç santimetre boyunca gevşer. Reseptif gevşeme adı verilen bu mekanizma, kimusun kranial

yönden kaudal yöne daha kolay olarak ilerlemesini sağlar. Bu sırada lümen içeriği yaklaşık 2-2,5 cm/sn hızla kaudale doğru ilerletilir ¹⁴.

Peristaltik etkinlik, barsaktaki otonomik girdi ile azaltılabilir veya arttırılabilir, ancak dış innervasyondan bağımsızdır. Peristaltizm, enterik sinir sisteminin bütünleşmiş etkinliği için iyi bir örnektir. Lokal gerilme ile seratonin salınır, bu da myenterik pleksusu etkinleştirerek duysal nöronları aktifler. Bu pleksusta retrograd yönde giden kolinerjik nöronlar, P maddesi ve Ach salgılayan nöronları aktifleyerek düz kasın kasılmasına neden olur. Aynı anda antegrad yönde giden kolinerjik nöronlar NO, VIP ve ATP salgılayan nöronları etkileyerek uyarının ön tarafında gevşemeye neden olurlar. Myenterik pleksus bulunmazsa, gerilme noktasının gerisinde kasılma, ilerisinde gevşeme ile karakterize komplike model ortaya çıkmaz. Bu nedenle bu komplekse genellikle myenterik (peristaltik) refleks adı verilir. Peristaltik refleks ve peristaltik hareketin kaudal yönde ilerlemesine barsak yasası denir ^{14,15}.

Paralitik ileus, barsakların atonik halidir. Gastrointestinal traktusun normal peristaltizmini yapamaması sonucu gelişir. İtici peristaltizm tamamen kaybolmuştur. Sebepleri arasında peritonit, metabolik bozukluklar, abdominal cerrahi girişimler, ganglion bloke edici ajanlar ve sempatik refleks yer alır ^{17,18,19}. İleus sonrası, barsak lümeninde staza bağlı bakteriyel aşırı çoğalma, barsak distansiyonuna sekonder mukozal iskemi, mukozal bariyer bozulması ve permeabilite artışı gibi faktörlerle gelişen bakteriyel translokasyon gerçekleşir. Sonuçta gelişen bakteriyemi sepsis patofizyolojisine katkıda bulunur.

2.5. Peritonit

Gelişmelere rağmen intraabdominal enfeksiyonların mortalitesi halen kabul edilemeyecek kadar yüksektir. Bu yüzyılın başında, intraabdominal enfeksiyonlar cerrahi olmayan yöntemlerle tedavi edildiğinde gözlenen mortalite %90 civarındayken, standart cerrahi yöntemlerin kullanılmaya başlandığı 1920li yıllarda %40-50, antibiyotik kullanımıyla birlikte 1970li yıllarda %30-70 olarak bildirilmiştir. Antibiyotiklerin bu hastalardaki başarısızlığının nedenleri, peritonitin bakteriyolojik etyolojisi ve antibiyotiklerin farmakodinamisi ile ilgili yanlış bilgiler, altta yatan patofizyolojik olayların anlaşılabilmesi ve hastalığın tanımlanmasındaki zorluklar şeklinde yorumlanmıştır. 1970lerden sonra sorunlar anlaşılmaya başlanmış ve gelişmeler sonucunda mortalite oranı %10-20 düzeyine inmiştir.

Peritonit, peritonun bir kısmı ya da tamamının inflamasyonudur. Periton boşluğu normalde sterildir. Ancak herhangi bir kontaminasyon halinde inflamatuvar yanıt başlar ve peritoneal makrofajlar, mast hücreleri sitokinleri ve vazoaktif maddeleri üretmeye başlar. Bunlar da periton sıvısının kemotaksinler, opsoninler ve komplemanlar bakımından zenginleşmesini sağlar. Ardından biyokimyasal değişikliklerle birlikte periton ve subepitelyal bağ dokusunda masif sıvı birikimi olur. Bakteriler, lenfatikler tarafından hızlıca uzaklaştırılır ve sistemik dolaşıma geçerek sistemik savunma mekanizmaları ile karşı karşıya kalırlar.

Erken inflamasyon döneminde, hasarlanan damar endotelinden plazma ve fibrin eksüdasyonu olur. Yüzey prokoagulan aktivitesi aracılığıyla peritoneal makrofajlar, fibrin birikimini artırıp peritoneal yüzeye hücre agregasyonu ve adherensini sağlarlar. Enfeksiyon ilerledikçe olay periferde doğru ilerler ve makrofajlar ile fibrin birikimi, enfeksiyonu sınırlamaya çalışır. Piyojenik bir membran oluşturarak abseleşebilir. Doku hasarı ve bakteri yoğunluğu, konakçı savunmasının enfeksiyonu ortadan kaldırma kapasitesini aştığı zaman, abse oluşması efektif savunma olduğunu gösterir²⁰.

Peritonitte, peritonda lokalize inflamatuvar olay, üçüncü boşluklara sıvı kaybı ile hipovolemik şoka neden olabilir. Paralitik ileus, bakteriyel aşırı çoğalma ve bunların sonucunda gelişen bakteriyel translokasyon ile erken dönemde endotoksinler sistemik dolaşıma geçebilir. Bakteriyemi, endotoksemi ve şok ciddi sistemik inflamatuvar cevabı aktive edebilirler. Dolaşımdaki serbest bakteriyel ekzotoksinler ve endotoksinler birçok organ fonksiyonunu olumsuz yönde etkiler. Sonuçta sepsis ve multiorgan yetmezliği tabloları gelişebilir. Organizmanın ani olarak endotoksinlerle yüklenmesi septik şoka neden olur. Başlangıçtaki hiperdinamik faz, hücrelerin oksijeni kullanamaması ve sirkülatuar sistemin bunu kompanze etmeye çalışması ile açıklanır. Son aşama organizmanın tükenmesine bağlı hipodinamik fazdır²⁰. (Şekil 1)

Sepsis; organizmanın, patojenlere veya salgıladığı maddelere karşı verdiği sistemik yanıt olarak tanımlanabilir ²¹. Bakteriyeminin sepsis tanısında şart olduğunu ilk kez 1980 yılında Krager ileri sürmüştü, ancak daha sonraki çalışmalarda konağın pasif olmadığı, nonenfeksiyöz tetiklenmelerle de aynı yanıtın ortaya çıkabildiği ve enfeksiyon eradike edilse bile klinik yanıtın sürebildiği ortaya konmuştur ²². Sepsis kriterleri içinde tanımlanan hasta grubunun tedaviye aynı şekilde yanıt vermeyen, heterojen bir grup olduğu sonucuna yıllar içinde varılmış ve genetik polimorfizmlerin mortaliteyle ilişkileri ortaya konmaya başlamıştır ^{23,24,25}. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ise, enfeksiyöz veya nonenfeksiyöz bir tetikleme mekanizmasıyla, organizmada ortaya çıkabilecek abartılı sistemik inflamatuvar yanıttır. Neden ne olursa olsun organizmanın yanıtı ilk olarak SIRS tablosudur ^{26,27}.

1991 yılındaki konsensus toplantısında varılan ve “American College of Chest Physicians” ve “Society of Critical Care Medicine”da yayınlanan sonuçlara göre; sepsisli hastalarda inflamatuvar yanıtın aşamaları belirlenmiş ve kanıtlanmış enfeksiyon odağı ile birlikte sistemik inflamatuvar reaksiyon sendromunun bulunmasını sepsis, uygun sıvı resusitasyonuna rağmen hipotansiyon, organ yetmezliği ve hipoperfüzyon olmasını ise septik şok olarak tanımlanmıştır ²⁸.

Sepsis, vücuttaki bir enfeksiyon odağından, bakteri veya diğer patojenlerin kan dolaşımına geçmesi sonucu gelişen sistemik bir cevaptır. Sepsiste enfeksiyonun klinik belirtisi ile birlikte enfeksiyona karşı sistemik cevabın bir belirtisi olan aşağıdaki özelliklerin de bulunması gerekmektedir;

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

-Kalp hızı >90 atım/dk.

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

-Beyaz küre >12000 , <4000 veya $\%10 >$ genç (çomak) hücrelerin olması

Şiddetli sepsis, sepsisle birlikte yetersiz organ perfüzyonu belirtilerinden bir ya da daha fazlasının birarada bulunması durumudur. Bu belirtiler:

-Mental değişiklikler

-Hipoksemi

-Oligüri

-Plazma laktat düzeyinde artma

-Hipotansiyon

-Koagülopati şeklinde olabilir.

Septik şok, sepsiste, uygun ve yeterli sıvı tedavisine rağmen, hipotansiyonun diğer nedenleri olmaksızın, sistolik kan basıncının 90 mmHg < olması veya önceki düzeyden 40 mmHg dan fazla düşmesi ile ortaya çıkan ve perfüzyon bozukluğu ile seyreden klinik tablodur. Eğer hipotansiyon, sıvı ve vazopressör tedaviye 1 saat içinde cevap verirse erken septik şok, vermezse dirençli (refrakter) şok olarak adlandırılır ²¹.

Multipl organ disfonksiyonu sendromu (MODS), genellikle sepsis ve septik şokun ileri dönemlerinde karşılaştığımız, organ sistemlerinde homeostazın müdahale olmaksızın sürdürülmesine imkan vermeyen bozuklukların olmasıyla karakterize, mortalitesi çok yüksek bir klinik durumdur. İlk kez 1969 yılında Shillman tarafından yoğun bakım hastalarında eroziv gastritten sonra gelişen, sepsis ve sarılıkla karakterize bir tablo tarif edilmiştir. 1973'te Tinlen ve Bailey rüptüre aort anevrizması onarımını takiben ortaya çıkan organ-sistem yetmezliğini vurgulamışlardır. MODS tanısı için; 1989'da Knaus tarafından ortaya konulan 5 organ/sisteme ait yetmezlik bulguları şematize edilecek olursa, şu bulgulardan en az ikisinin 24 saatten fazla bulunması gereklidir ²¹.

Kardiovaksüler sistem :

- Kalp hızı <54/dk.
- Ortalama arterial basınç <49 mmHg
- Ventriküler taşikardi veya fibrilasyon

Respiratuar sistem:

- Solunum hızı <5/dk. veya >49/dk
- pH <7,24 ve PaCO₂ >49 mmHg veya PaO₂ <50 mmHg
- Ventilatöre bağımlılık

Renal sistem:

- İdrar çıkışı < 479 ml /24 h
- Serum BUN >100 mg/dl
- Serum kreatinin >3,5 mg/dl

Hematolojik:

- Lökosit sayısı $<1000/\text{mm}^3$
- Trombosit sayısı $<20000/\text{mm}^3$
- Hct $< \%20$

Nörolojik:

- Glasgow koma skoru <6

Sepsiste, inflamatuvar olaylardan etkilenen sistemlerden biri de barsaklardır. İntestinal immüniteyi sağlayan, mukoza ilişkili lenfoid dokunun (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) bir parçası olan barsak ilişkili lenfoid doku (gut-associated lymphoid tissue, GALT) bu etkilenmenin asıl sorumlusudur. GALT'nun üç komponenti vardır. Peyer plakları (PP), intraepitelyal lenfositler ve lamina propriada yer alan lenfoid hücreler (plazma hücreleri, B ve T lenfositler, diğer mononükleer hücreler). PP, distal ileumda bulunan lenfoid folliküllerden oluşur⁴. Plazma hücrelerinden salınan sekretuar immünglobulin A (IgA) bağladığı antijeni, follikülle ilişkili epitel içinde yer alan ve antijen bağlamak için özelleşmiş M hücrelerine iletir. PP'nin subepitelyal kısmına ulaşan sekretuar IgA, kemik iliği kaynaklı antijen sunulan hücrelere (APC) (dendritik hücreler, CD4+ T hücreleri ve B hücreleri) bağlanır. Dendritik hücrelerin matüritesi, farklı sitokin yanıtlarından sorumludur. İmmatür dendritik hücreler besinlerdeki proteinlere karşı yanıt oluştururken, matür dendritik hücreler sistemik inflamatuvar olaylarla aktiflenir²⁹. Sistemik inflamasyonda rol alan nötrofillerin yüzeyinde, mikroorganizmaları ve ürünleri tanımasında aracılık eden, hücreler arası sinyal iletiminde rol oynayan ve doğal immun yanıtı başlatan, transmembran domainine sahip, iletici yüzey proteini olan Toll like reseptörler (TLR) tanımlanmıştır. TLR ile aktive olan dendritik hücreler inflamatuvar sitokinleri salgılar³⁰. İntestinal muskularis propriada, proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesiyle inflamatuvar lökositler muskuler tabakaya ekstrasvaze olur. Salınan sitokinlerin çoğu, intestinal düz kasların kontraktilesini direk inhibe ederek ileusa neden olur^{5,6}.

İdiyopatik veya spontan peritonit olarak adlandırılan primer peritonit, periton boşluğunun karın içi organlardan kaynaklanmayan bakteriyel enfeksiyonudur. Bakterilerin periton boşluğuna ulaşması %50 olguda kan, diğer olgularda ise transdiyaframatik lenfatikler yoluyla, diyaliz kateteri,

ventriküloperitoneal şantlar gibi yabancı cisimler, genital, üriner ve sindirim sisteminden translokasyonla veya direk yayılımla olur. Çoğunlukla batın içi organların inflamasyonu, perforasyonu veya delici karın yaralanmaları sırasında ortaya çıkan tablo sekonder peritonittir ³¹. Tersiyer peritonit ise; peritonit ve sepsisi olan hastalarda, tedavide cerrahi girişim uygulananlarda ve başarılı antibiyotik tedavisi uygulananlarda gelişir. Konakçı defans yetmezliği sözkonusudur. Bu hastalarda tanımlanmış bir enfeksiyon odağı olmaksızın sepsisin klinik bulgusu vardır ve genellikle rekürren veya rezidüel enfekte sıvıların drenajı için gereksiz laparatomiler uygulanmıştır. Sıklıkla hiçbir patojen yoktur veya düşük patojenitesi olan koagulaz negatif stafilokok ve mantarların neden olduğu bir tablo söz konusudur ²⁰.

Neden ne olursa olsun batın içi enfeksiyon periton, barsaklar ve onu takiben sekonder endokrin, kardiyak, respiratuar, renal ve metabolik olaylara yol açan sıvı kompartmanını ilgilendiren lokal ve sistemik cevap olarak ortaya çıkar. Bu patofizyolojik cevap, klinik olarak görülen belirti ve bulguları açıklar.

Klinikte genellikle karın ağrısı vardır. Başlangıçta, ağrı otonom sinir sistemi irritasyonuna bağlı olarak özgül olmayabilir ve çoğunlukla peritoneal inflamasyonun en fazla olduğu bölgededir. Ağrı şiddetinin zamanla azalması inflamatuvar olayın lokalize olduğunu, artması ise yaygın peritonit geliştiğini düşündürür.

Hemen her zaman iştahsızlık, bulantı vardır, bazen kusma eşlik eder. Susuzluk hissi, titreme ile yükselen ateş (38-40 °C) vardır. Karın ağrısı nedeni ile yüzeysel solunum mevcuttur. Batın distansiyonu vardır. Batında hassasiyet, defans, rebound mevcuttur. Erken dönemde barsak sesleri duyulabilirken, inflamasyon yayıldıkça paralitik ileus yerleşir ve barsak sesleri duyulamaz. Taşikardi ve zayıf periferik nabız hipovolemiyi gösterir. Hipovolemi ilerledikçe şok tablosu yerleşir.

Lökositoz sık görülür, ancak masif peritoneal inflamasyon bölgeye lökosit mobilizasyonuna yol açarak periferik lökopeniye neden olabilir. Lökositozun 25000/mm³ ün üzerinde veya lökopeninin 4000/mm³ ün altında olması ile mortalite artar ²⁰.

Tedavide amaç mortalite ve morbiditenin azaltılmasıdır. Patojenlerin daha iyi tanımlanmaları, bunlara etkin antimikrobiyal tedavinin kullanımı, erken

cerrahi prensiplerinin uygulanması ve cerrahi tekniklerindeki gelişmeler ile mortalite son yıllarda %30'un altına inmiştir. Erken cerrahi tedavi prensipleri;

- a) Enfeksiyon kaynağının kontrolü ve ortadan kaldırılması,
- b) Bakteri, toksin ve nekrotik materyalin konsantrasyonunun azaltılması veya ortadan kaldırılması,
- c) Rezidüel bakterilerin ilaçla tedavisi,
- d) Organ fonksiyon bozukluklarının düzeltilmesi

Cerrahi tedavide ise amaç, batin içindeki pürülan ve nekrotik materyali temizlemek, enfeksiyöz odağı ortadan kaldırmaktır ²⁰.

2.6 İnflamasyon

Organizmanın, hücre hasarı oluşturacak uyarılara karşı vaskülarize konnektif dokuda verdiği koruyucu yanıtıdır. Amaç, organizmayı hücre hasarı oluşturan uyarandan ve bu hasarın sonucunda oluşan nekrotik materyal ve dokulardan temizlemektir. İnflamatuvar yanıt konnektif doku, plazma, dolaşan hücreler ve kan damarlarını içerir. İki tip inflamasyon mevcuttur. Akut inflamasyon, nisbeten kısa süreli, birkaç dakika ila birkaç gün arasında olup esas özellikleri plazma protein ve sıvısının eksudasyonu, lökositlerin emigrasyonu. Kronik inflamasyon ise, daha uzun sürelidir ve histolojik olarak lenfositler ve makrofajların bulunuşu, kan damarları proliferasyonu ve konnektif dokunun mevcudiyeti ile birlikte ³².

2.6.1. Akut İnflamasyon

Organizmanın hücre hasarı oluşturacak uyarana karşı verdiği ani ve erken yanıtıdır. Üç majör komponenti vardır. Kan akışında artışa neden olan damar çapındaki değişiklikler, plazma protein ve lökositlerinin sirkülasyondan dışarı çıkmasına yol açan mikrosirkülasyondaki striktürel değişiklikler, mikrosirkülasyondan lökositlerin emigrasyonu ve hasar bölgesinde toplanması.

Hasarlı bölgede artan kan akışı ile karakterize vasküler olay, arteriolar dilatasyon ve kapiller yatağın açılmasıyla meydana gelir. Artan vasküler permeabilite, proteinden zengin ekstravasküler sıvı birikimine neden olur ve eksudayı meydana getirir. Plazma proteinleri, damarları ya venüllerin genişlemiş intraendotelyal hücre bileşkelerinden veya direk endotelyal hücre incinmesiyle terk eder. Başlıca nötrofiller olmak üzere lökositler, önce adezyon molekülleriyle endotele yapışır, sonra mikrosirkülasyonu terk eder ve kemotaktik ajanların etkisi ile hasarlı bölgeye doğru göç ederler. Bunu, hasar oluşturan etkenin

fagositozu takip eder ve bu da mikroorganizmanın ölümüne yol açabilir. Kemotaksis ve fagositoz esnasında aktive lökositler toksik metabolitleri ve proteazları ekstrasellüler olarak açığa çıkarabilir ve bu da endotelial ve doku hasarına yol açabilir³².

2.6.2. Kronik İnflamasyon

Akut inflamasyonu takiben gelişebilir veya hasarlanmanın başından itibaren kronik olabilir. Akut inflamatuvar yanıt, hücre hasarı oluşturan uyarının devam etmesi halinde ya da normal iyileşmedeki bazı bozukluklarda kronik hale geçebilir. Çoğu durumlarda kronik inflamasyon primer olay olarak başlar. Genellikle, akut inflamasyona yol açan uyarılara göre daha az toksik ajanlara maruziyet söz konusudur. Düşük toksisiteli intrasellüler mikroorganizmalarla gelişen persistan enfeksiyonlar, parçalanamayan cansız materyale (silika inhalasyonu) uzun süre maruz kalma veya bazı otoimmün reaksiyonlar kronik inflamasyona yol açar. Kronik inflamasyon makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerini, doku detruksiyonunu ve fibrozisi içeren özellik taşır³².

2.6.3. İnflamasyonun Kimyasal Medyatörleri

İnflamasyonun vasküler ve sellüler yanıtları, plazma ve hücrelerden çıkan ve inflamatuvar stimulusla meydana gelen kimyasal faktörlerle ortaya çıkmaktadır. Bu kimyasal medyatörler ve sitokinler, bir arada veya sırayla etki yaparak inflamatuvar yanıtı oluştururlar. Medyatörler, aktive edilince veya hücreden salınıncaya çoğu bozulur veya inaktif olur. Bu şekilde, medyatör etkilerinin ayarlanmasında kontrol ve denge sistemi vardır. Hemen tüm medyatörler, hedef hücredeki spesifik reseptöre bağlanarak biyolojik aktivitelerini meydana getirirler³².

Vazoaktif Aminler:

Histamin; konnektif dokuda yer alan mast hücrelerinde, kanda bazofillerde ve trombositlerde bulunur. Artan vasküler permeabilitenin ani fazının başlıca medyatörüdür³².

Plazma Proteazları:

Kinin sistemi aktivasyonu bradikinin oluşumuna yol açar. Bradikinin, arteriolar dilatasyona, endotel hücre kontraksiyonu ile venüler permeabilite artışına ve ekstrasellüler düz kas kontraksiyonuna neden olur.

Kompleman sistemi hem immünitelerde, hem de inflamasyonda önemli rol oynayan bir dizi plazma proteini içerir. En kritik basamak, kompleman C3'ün

aktivasyonu olup diğer tüm kompleman komponentleri, C3 ile etkileşimleriyle ilgili olarak fonksiyonel üniteler şeklinde sınıflandırılabilir. Bu gruplar da, vasküler fenomen, kemotaksis ve fagositoz gibi inflamasyonun çeşitli aşamalarında rol oynarlar.

Pıhtılaşma sistemi de bir seri plazma proteini olup Hageman faktörü ile aktive edilebilir. Son basamakta, trombinin etkisiyle fibrinojenden fibrin oluşumu esnasında meydana gelen fibrinopeptidler, vasküler geçirgenliği artırır ve lökositler için kemotaktiktir³².

Araşidonik Asit Metabolitleri:

Araşidonik asit, poliansature bir yağ asidi olup hücre membranındaki fosfolipidlerde bulunur. Araşidonik asit metabolizması sonucunda, siklooksijenaz yoluyla oluşan prostoglandinler ve lipooksijenaz yoluyla oluşan lökotrienler inflamasyonun hemen her basamağını etkiler³².

Trombosit Aktive Eden Faktör:

Trombosit stimülasyonuna ilaveten vasküler permeabilite artışı, lökosit migrasyonu, adezyonu, kemotaksis ve bir dizi sistemik hemodinamik değişikliklere neden olur³².

Sitokinler:

Özellikle aktive lenfosit ve makrofaj gibi birçok hücreden salınan, değişik yapıda bir grup çözünen proteinden oluşan polipeptitlerdir. Bazı karakteristik özellikleri vardır:

- a)Çok düşük konsantrasyonlarda ($<10^{-11}$ mol/L) aktif olan protein yapısında hormonlardır.
- b)Doğal ve spesifik immünitinin efektör evresinde üretilirler.
- c)Diğer polipeptit hormonlar gibi, hedef hücredeki spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterirler.
- d)Konağın immün ve inflamatuvar yanıtlarına aracılık ederler ve önemli otokrin, parakrin ve endokrin etkileri vardır³³.

Sitokinlerin inflamasyondaki en önemli etkileri endotel üzerine olan lokal etkileri ile sistemik olarak akut faz reaktanları ve fibroblastlar üzerinedir. Endotelyal adezyon moleküllerinin yüzey düzenlemesini sağlar ve endotelin trombojenitesini arttırırlar³².

Tümör Nekrozis Faktör-α (TNF-α)

Solid tümörlerde tanımlanmış sitolitik bir peptittir ³⁴. İlk kez 1893'de Newyork'lu cerrah William Coley tarafından, erizipelden alınan inokulasyon materyali içinde, malign tümörlerin nekrozuna yol açan bir toksin tanımlanmıştır³⁵ ve 1975'de Carwell ve arkadaşları tarafından ilk kez "Tümör Nekrozis Faktör" terimi kullanılmıştır ³⁶. TNF-α, 233 aminoasitli bir prohormondan bir seri proteolitik reaksiyon sonucu ortaya çıkan, 157 aminoasitli bir polipeptiddir ³⁷. Bu sitokin, birçok değişik hücrede mevcut olan özgül bir reseptörle etkileşime girer ^{38,39,40} ve bu reseptörlerin sadece %5ini tutarak bir biyolojik yanıt oluşturabilir ⁴⁰. Parazitemi, serebral malarya, transplantasyonda doku reddi, septik şok gibi birçok inflamatuvar reaksiyonda gözlenen hasardan TNF-α'nın aşırı yapımı sorumlu tutulmaktadır³⁴. Değişik etkilerinden çoğunu, hücrel etkileşimlerle (parakrin etki) oluşturur ⁴¹. Birçok hücreden salınmakla birlikte asıl kaynağı, aktive olmuş mononükleer fagositlerdir. Lokal olarak nötrofil aktivitesini ve nötrofillerin endotele adherensini artırır. Patojenlerin hızlı eliminasyonunu indükler ³⁴.

TNF-α, inflamasyonun erken sitokin yanıtlarındandır ⁷. İnflamasyonun başlamasına neden olan herhangi bir uyarıdan sonraki dakikalar içinde TNF-α salınımı başlar, 1 saatte pik yapar ve 3-4 saat sonra salınım durur ³. TNF-α düzeylerindeki kısa süreli yükselme, ardışık sekonder reaksiyonlara yol açar ve bunların etkileri, TNF-α serumdan kaybolduktan uzun süre sonra da devam eder. Bu sekonder etkilerin çoğu, muhtemelen TNF-α ile sinerjistik etkisi olan diğer sitokinlerin salınımına bağlıdır ^{42,43,44,45}.

İnflamatuvar sürecin medyatörleri üzerine yapılan araştırmalar sonucunda sitokinlerin sayıları giderek artmaktadır. Ancak bu kadar çok sayıdaki sitokinden hangilerinin klinik olarak anlam taşıdığı tam olarak aydınlatılamamıştır ⁴⁶. Bu konudaki istisnalardan birisi TNF-α'dır. TNF-α hakkında edinilen bilgiler temelinde bazı noktalar kesinleşmiştir:

1- Kritik enfektif hastalıkların başlangıcında kan dolaşımında saptanabilir. Dolaşımda TNF-α'nın belirmesi kısa süreli olup semptomların ortaya çıkması ile birlikte seviyesi hızla düşmektedir. Değişik etyolojiye sahip enfektif hastalıkların prodrom döneminde ve hastalığın başlangıcında dolaşımdaki TNF-α kanıtlanmıştır. Bazı seçilmiş enfeksiyonlarda TNF-α konsantrasyonları

hastalığın prognozu hakkında dikkat çekici bir doğrulukla önceden bilgi vermektedir ^{47,48}.

2- TNF- α uygulanması, bakteriyel invazyonu takiben oluşarlardan ayırt edilemeyecek değışiklikler başlatır. Memelilerde rekombinant TNF- α verilmesi dolaşım kollapsı, böbrek yetmezliği ve dissemine intravasküler koagülasyona bağlı ölüme neden olur. Otopsi bulguları ciddi gram-negatif sepsisemi sonrası gözlenenlerin aynısıdır ⁴⁹. Köpeklerde subletal dozlarda TNF- α infüzyonu, sepsiste görülen karakteristik hormonal ve metabolik bozuklukları başlatmıştır ⁵⁰.

3- TNF- α , letal sistemik inflamasyonda ortaya çıkan ilk medyatördür. Ölmekte olan konağın dolaşımında birçok medyatör bulunmakla birlikte, deneysel ve klinik araştırmalarda kan akımında ilk saptanan medyatörün TNF- α olduğu gösterilmiştir. İn vitro olarak TNF- α 'nın diğer medyatör ve yolakların çoğunu uyardığı bilindiği için, letal sistemik inflamasyonda ilk sinyal olduğuna ilişkin oldukça güçlenen bir görüş mevcuttur.

4- TNF- α 'nın nötralizasyonu, sistemik inflamasyonu takip eden ölümden korur ^{51,52}.

TNF- α 'nın septic sürecin en önemli medyatörlerinden biri olduğuna inanılmaktadır. İnflamasyonda konağın cevabını düzenleyen ilk sitokin olduğu hipotezini destekleyen birçok bulgu vardır ⁵³: İlk olarak, septic şoktaki hayvanların serumlarında saptanmıştır. İkinci bulgu, genetik bir defektten dolayı TNF- α üretemeyen hayvanların letal endotoksin uygulamalarına dirençli olması ya da hasta hayvanlardan farmakolojik yöntemlerle TNF- α çıkarılmasının survide belirgin düzelmeye neden olmasıdır. Üçüncüsü ise, sağlıklı hayvanlara TNF- α verilmesi ile sepsise benzer klinik tablo görülmesidir ⁷. Örneğin ratlara yüksek konsantrasyonda TNF- α infüzyonu laktik asidoz, hipotansiyon ve ölüme yol açmıştır. Bu hayvanların postmortem incelemesinde adrenal nekroz, pulmoner konjesyon, çekum nekrozu, intestinal iskemi, pankreatik infarkt, pulmoner inflamasyon ve anüri saptanmıştır ⁴⁶⁻⁵⁸.

TNF- α 'nın letal sistemik inflamasyonun patogeneğinde önemli rolü olduğunu düşündüren bu deneysel bulgular, daha sonra serum TNF- α düzeyleri ile hastalığın ciddiyeti ve septic şoka bağlı mortalite arasında korelasyon olduğunu gösteren birçok klinik çalışmayla doğrulanmıştır ^{59,60,61}. Calandra ve arkadaşları, septic şokta hayatta kalanlarda TNF- α düzeylerinde progresif bir

düşme olduğunu, kaybedilen hastalarda ise ilk tanı ve tedavi süresince TNF- α düzeylerinin yüksek kaldığını bildirmişlerdir⁶⁰.

TNF- α 'nın sistemik inflamasyon ve bunun sonucunda gelişen septik şok ve multiorgan yetmezliği oluşum mekanizmalarındaki önemli rolü anlaşıldığından beri, tedavide TNF- α ve diğer inflamatuvar medyatörler üzerine etkili olacak, bunların oluşum ya da etkilerini baskılayacak modaliteler üzerinde durulmaya başlanmıştır. Konağın bu yıkıcı yanıtını düzenlemeye yönelik çabalar, yeni tedavilerin gelişimine yol açmıştır. Bu tedavi yöntemleri, direk endotoksini nötralize etmek, hücrelerden sitokin salınımını inhibe etmek, aşırı sitokin salınımının sonuçlarından korunmak için endojen medyatörlerin etkilerini direk bloke etme amacını güden tedavilerdir³³.

High Mobility Group Box-1 (HMGB-1)

Yaklaşık 30 yıl önce, hücre nükleusundan histonlarla birlikte 30 kDA molekül ağırlıklı protein serbestleştirilmiş ve elektroforez jelindeki hızlı hareketinden dolayı high mobility group box-1 olarak adlandırılmıştır. HMGB-1, ökaryotlardaki korunmuş proteinler arasında en yararlı olanıdır. Nüklear bir protein olan HMGB-1, kromatin bağlayıcı önemli yapısal bir faktördür. Nükleozomal yapı ve stabilitenin belirlenmesi, transkripsiyon faktörlerinin aynı kökenli DNA yapılarına bağlanması gibi farklı hücresel fonksiyonlar içerir. İleri derecede yüklü olan HMGB-1, C-terminalinde negatif yüklü rezidüer (aspartik ve glutamik asit), N-terminalinde pozitif yüklü bölgeler (A box ve B box) içerir. Sekonder DNA yapıları için bağlanma bölgeleri mevcuttur. Bu gözlemler HMGB-1'in DNA rekombinasyonu, onarımı, replikasyonu ve transkripsiyonunda rol oynadığını destekler.

HMGB-1 hemen her hücre tipinde üretilir, ancak hücre düzeyi yaş ve gelişimle değişir. Hücresel lokalizasyon çalışmaları, HMGB-1'in nükleus ile sitoplazma arasında hücre siklusuna bağlı olarak hareket ettiğini ortaya koymuştur. HMGB-1, karaciğer ve beyin hücrelerinde belirgin olarak sitoplazmada bulunurken, lenfoid hücrelerde hem sitoplazmada hem de nükleusta yer alır.

İnflamasyona yanıt olarak HMGB-1'in bağışıklık sistem hücrelerinden (monosit, makrofajlar) aktif, nekrotik hücrelerden de pasif salınımı söz konusudur. HMGB-1'in aktif salınımı, ekzojen bakteriyel endotoksin veya endojen proinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1 β) stimülasyonu ile doz ve zaman

bağımlı olarak gerçekleşir. Nekrotik ve hasarlı hücrelerden pasif olarak salınan HMGB-1 ise, komşu bağışıklık sistem hücrelerine hasar sinyalini taşır⁶².

Ekstrasellüler HMGB-1, *invivo* inflamatuvar yanıtı aracılık eder. Genetik olarak lipopolisakkarite dirençli farelere intratrakeal verilen HMGB-1 akciğerde nötrofil birikimini ve proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β) akciğer dokusunda lokal üretimini stimüle eder. Akciğer dokusunun histolojik incelemesinde interstisyel ve intraalveolar alanlarda nötrofil birikimi, interstisyel ödem, alveolar yüzeye protein eksudasyonu ile karakterize akut diffüz inflamatuvar yanıt görülür. Ancak önceki gözlemlerde rekombinant TNF- α infüzyonuna bağlı şok tablosu geliştiği gösterilen hayvanların aksine, HMGB-1 infüzyonu şok tablosu oluşturmaksızın ani kardiyak ölüme neden olur. HMGB-1'in intraserebroventriküler verilmesi beyinde TNF- α ve interleükin-6 (IL-6) yapımını artırır. Gastrointestinal sistem üzerine etkisi incelendiğinde, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini, epitelyal bariyer fonksiyon kaybı ile intestinal mukozal permeabiliteyi ve mezenterik lenf nodlarına bakteriyel translokasyonu arttırdığı gösterilmiştir.

İnflamasyonun geç medyatörü olarak salınan HMGB-1 sistemik inflamatuvar yanıt patogenezinin erken medyatör yanıtından sonra katılır⁶³. Endotoksin verilmesinden 8 saat sonra ilk olarak serumda tespit edilir ve 16-32 saate kadar artarak plato düzeyine ulaşır. Benzer olarak, deneysel sepsis modellerinde (çekal ligasyon ve perforasyon), peritonit indüksiyonundan 18 saat sonra serumda HMGB-1 saptandığı ve 72 saate kadar serum düzeylerinin yüksek kaldığı gösterilmiştir. HMGB-1'in gecikmiş ortaya çıkışı, deneysel endotoksemi veya sepsise sekonder letalitenin başlangıcı ile paralellik gösterir ve sistemik inflamatuvar yanıtın TNF- α ve önceden tanımlanmış diğer erken etkili medyatörlerinden farklıdır. Klinik çalışmalar da, serum HMGB-1 seviyelerinin belirgin olarak arttığını göstermiştir. Septik veya sepsise sekonder organ yetmezlikli hastaların serum HMGB-1 düzeyleri sağlıklı gönüllülere göre belirgin olarak yüksek saptanmıştır.

Hemorajik şok da, enfeksiyon olmaksızın HMGB-1'in sistemik salınımını stimüle edebilir. Klinik olarak, hemorajik şokta 24 saat sonra HMGB-1'in serumda belirgin arttığı ve şok tablosu gerileyinceye kadar yüksek kaldığı gözlenmiştir. Şoka erken TNF- α yanıtının uyarısı ve hasarlı ve ölü hücrelerin uyarısı ile aktiflenen bağışıklık sistem hücrelerinden HMGB-1 salındığı düşünülmektedir.

Deneyisel olarak HMGB-1'in salınımını ya da aktivitesini inhibe eden tedavi stratejileri, hayvanlarda sepsise bağılı ölümü önlemiştir. HMGB-1 antikorları ve HMG A box (HMG'nin N-terminalinde yer alan pozitif yüklü bölge) HMGB-1'i antagonize ederken, etil pirüvatın HMGB-1 salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir.

Özet olarak HMGB-1, letal sistemik inflamasyonun, monosit veya makrofaj kaynaklı geç etkili sitokini olarak tanımlanmıştır. HMGB-1'in geç etkisi, TNF- α ve diğere klasik proinflamatuvar sitokinlerden ayıran özelliğidir ve doğal immün yanıtın anlaşılması ve manipule edilmesinde önemlidir⁶².

Çalışmada kullanılan etanercept (Enbrel), TNF- α reseptör füzyon proteinidir. Çözünür TNF- α reseptörü olup TNF- α 'yı bağlayarak, kendi reseptörüne bağlanmasını önler ve böylece proinflamatuvar etkilerini bloke eder^{9,64}. Etil pirüvat ise, pirüvik asitten elde edilen basit alifatik esterdir. İn vitro ve in vivo modellerde etkili antiinflamatuvar ajan olup HMGB-1'in sistemik salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir^{6,65}. Çalışmada oluşturulan deneysel peritonit modelinde, etanercept ve etil pirüvat kullanılmış, inflamasyonun erken ve geç sitokin yanıtlarının inhibisyonu ile barsak motilitesinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER

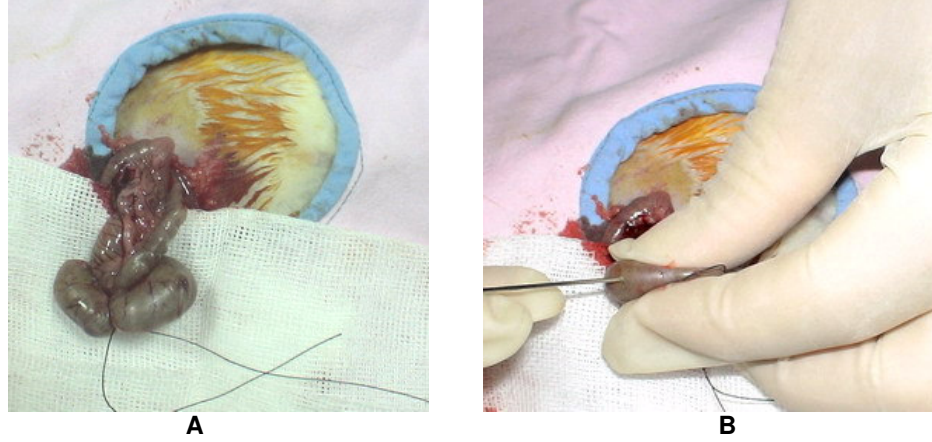
Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı (B.30.2.MEÜ.0.01.00.00/3156) alındıktan sonra, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Laboratuvarı ve Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Deneysel araştırmalar T.C Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca (Proje No: BAP-TF CTB (DA) 2006-3) maddi olarak desteklenmiştir.

3.1.Deney Hayvanlarının Seçimi

Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında temin edilen 32 adet Wistar Albino tipi, ortalama 132g ağırlığında, erişkin rat, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınarak kullanıldı. Ratların beslenmesi aynı gıdaları içeren diyetler ve su ile sağlanıp 24 °C olan odalarda saklandı. Çalışmada, her grupta 8 rat olmak üzere kontrol (sham operasyon), sadece peritonit oluşturulan deney, peritonitten 1 ve 4 saat sonra i.p. 8 mg/kg/doz etanercept verilen ve peritonitten 12 ve 24 saat sonra i.p. 40 mg/kg/doz etil pirüvat verilen grup olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Ratlar gruplara rastgele dağıtıldı.

3.2.Deney Modeli

Çalışmamızda peritonit oluşturmak için, daha önce Baker ve arkadaşları tarafından tanımlanan, çekum ligasyonu ve perforasyonu modeli kullanıldı⁶⁶. Bu model 24 saat içinde sepsise neden olan, hiperdinamik ve normotansif peritonit modelidir. Cerrahi girişim öncesi ratlara anestezik ajan olarak 100mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar) (Eczacıbaşı İlaç Sanayi, İstanbul, TÜRKİYE) intramuskuler (i.m.) uygulandı. Ratlar anestezisi altında supin pozisyonda yatırılıp tespit edildi ve abdominal bölge kılları traş edildi. Cerrahi saha povidon-iyot (Batticon) ile temizlendi, steril örtü ile kapatıldı ve 2 cm midline insizyon ile laparotomi yapıldı. Çekum, ileoçekal valfin hemen altında bulunup serbestleştirilerek 4/0 ipek sütünle dolaşımı bozulmayacak ve barsak geçişini engellemeyecek şekilde bağlandı. Çekumun antimezenterik yüzünde 22 G iğne ile 1 cm aralıklarla 2 farklı delik açıldı (Resim 1). Delinen yerlerden barsak içeriği nazikçe periton içine boşaltıldıktan sonra, çekum tekrar peritoneal kaviteye yerleştirildi ve insizyon iki kat üzerinden kapatıldı. Daha sonra ratlar, 36 saatlik bekleme için tekrar kafeslerine alındı. Operasyondan sonra su ve beslenme serbest bırakıldı.



Resim 1. Çekum ligasyonu ve perforasyonu

3.3. Deney Protokolü

Ratların beslenmeleri bir gün önce kesildi, su almaları serbest bırakıldı. Ratlar gelişigüzel dört gruba ayrıldı.

a) Kontrol (sham) grubu (n=8): Anestezi verilen ve laparotomi yapılan ratların çekumuna herhangi bir ligasyon ve perforasyon yapılmadan manipulasyon uygulandı.

b) Deney (peritonit) grubu (n=8): Anestezi verilen ve laparotomi yapılan ratların çekumuna ligasyon ve perforasyon uygulandı.

c) Etanercept grubu (n=8): Peritonit oluşturulan ratlara peritonitten 1 ve 4 saat sonra i.p 8 mg/kg/doz etanercept uygulandı.

d) Etil pirüvat grubu (n=8): Peritonit oluşturulan ratlara peritonitten 12 ve 24 saat sonra i.p. 40 mg/kg/doz etil pirüvat uygulandı.

Ratlara, 36 saat sonra önce eski insizyon yerinden relaparotomi yapıldı. Histopatolojik, biyokimyasal inceleme ve farmakolojik çalışma için doku örnekleri elde etmek amacıyla çekumun 5 cm proksimalinden 10 cm.lik ileum segmenti çıkarıldı. Daha sonra yapılan sternotomi ile ratların kalbinden biyokimyasal inceleme için 5 ml kan örneği alındı. Bu uygulama ile aynı zamanda hayvanın öldürülmesi sağlandı.

3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Etanercept (Enbrel) Wyeth İlaçları A.Ş., etil pirüvat ve karbamilkolin klorür (Karbakol) Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), potasyum klorür (KCl) Merck & Co., Inc. (USA) firmasından temin edildi.

3.5.Biyokimyasal Analizler

3.5.1.Kan ve Doku Örneklerinin Hazırlanması

Serum TNF- α ölçümü için kan örnekleri, 5 ml enjektör ile intrakardiyak olarak alındı. Örnekler 5000 rpm devirde 8 dakika ve +4 $^{\circ}$ C'de santrifüj edildi ve süpernatant çalışma için alındı. Doku MDA ve MPO ölçümü için alınan ileum örnekleri çalışma yapılıncaya kadar -20 $^{\circ}$ C'de saklandı.

3.5.2.Serum TNF- α Ölçümü

Serumda TNF- α düzeyleri "Biosource Rat TNF- α kit; lot. no: KRC3011" ile solid faz sandöviç Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. Tabak içindeki kuyucuklar, TNF- α için spesifik antikolar ile kaplandı. Standartlar, kontroller ve örnekler kuyucuklara eklendikten sonra üzerlerine biotinlenmiş ikinci bir antikor eklendi. Birinci inkübasyon sırasında TNF- α antijenleri, immobilize antikolarla ve biyotinlenmiş antikolarla bağlandı. Ortamdaki fazla antikoların yıkama ile uzaklaştırılmalarından sonra streptavidin-peroksidaz enzimi eklendi. İkinci inkübasyon ve yıkama sonrasında bağlanmayan enzimler ortamdan uzaklaştırıldı. Üzerlerine, enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solusyonu eklendi. Oluşan rengin absorbansı, örnekte bulunan TNF- α konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Sonuçlar standartlardan oluşturulan konsantrasyon-absorbans eğrisinden pg/ml olarak hesaplandı.

3.5.3.Doku Malondialdehid (MDA) Ölçümü

Doku lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kullanılan MDA düzeyleri, Yağı ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemle göre saptandı⁶⁷. Aerobik şartlarda doku homojenatının pH:3.4'de tiyobarbitürik asit ile 95 $^{\circ}$ C'de inkübasyonu sonucunda, lipid peroksidasyonu varsa sekonder bir ürün olarak MDA oluşur ve MDA tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu renk şiddetinin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonu saptanır. Çalışmada da, alınan ve -20 $^{\circ}$ C'de saklanmış olan ileum örnekleri çözüldü, tüm dokular tartıldı ve 50 mg dokuya 500 μ L 0.15 M KCl eklenerek homojenize edildi. Örneklerin hazırlanma aşamasında, solüsyonlar 95 $^{\circ}$ C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra musluk suyunda soğutuldu ve 1 ml distile su eklendi, 14:1 oranında hazırlanan n-bütanol:piridin solüsyonundan 5 ml eklenerek vortekste karıştırıldı. 4000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 200 μ supernatant alınarak örnek, kromatografik ayırım için cihaza

verildi. Sonuçlar, aynı yöntemle çalışılarak değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standart eğri yardımı ile nmol/ml olarak hesaplandı.

3.5.4.Doku Myeloperoksidaz (MPO) Ölçümü

Nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınan MPO enzimi, dokulardaki nötrofil aktivasyonunun dolaylı göstergesi olarak kullanılmaktadır. Doku örneklerindeki MPO düzeyleri, Golowich ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemle göre saptandı⁶⁸. Çalışma için -20 °C'de saklanmış olan ileum örnekleri çözüldü ve tartıldı. Dokular, 300 mg doku içine 5 ml olarak hesaplanan 0.02 M EDTA (pH 7.4) konularak 60 saniye homojenize edildi. Homojenat 20000 rpm devirde, +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 0,05 M KPO₄ (pH:6) tamponu içinde %0,5 Hekza Adezil Trimetil Amonyum Bromid (HETAAB) hazırlandı. Elde edilen pellet, 1,5 ml HETAAB ile tekrar homojenize edildi. Homojenat 20000 rpm devirde, +4 °C'de 15 dakika tekrar santrifüj edildi ve süpernatant çalışma için alındı.

Doku MPO ölçümü, hidrojen peroksidin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianosidini redüklemesi ve redükte o-dianosidin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanılarak yapıldı. Sonuçlar spesifik aktivite, ünite/gr doku olarak hesaplandı.

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

İleumdan alınan örnekler %10'luk nötral formaldehid içeren kaplar içine konuldu. Bir gece tespit işleminin ardından dokular sırasıyla alkol, ksilol ve solusyonlarında bekletilerek rutin işleme tabi tutuldu. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 µ kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilin eosin (H-E) histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelendi. Fotoğraflama işlemi Nikon dijital kamera, DS-L1 ile yapıldı. Barsak dokusunda hasarı değerlendirmek için Chiu ve arkadaşları tarafından tarif edilen histolojik mukozal hasar skalası kullanıldı⁶⁹. Buna göre;

Grade 0: Normal mukozal villus

Grade 1: Kapiller konjesyon ile birlikte subepitelyal boşluk oluşumu

Grade 2: Subepitelyal boşlukta genişleme ile birlikte epitelde orta derecede kalkma

Grade 3: Epitelde ileri derecede kalkmalar, yer yer epitelde soyulma ve lamina propriada konjesyon, villöz uçlarda ülserasyon

Grade 4: Epitelin tamamen soyulması ile birlikte lamina propria ve dilate kapillerlerin açığa çıkması

Grade 5: Lamina proprianın ortadan kalkması, hemoraji ve ülserasyon

Chiu skorlaması temelde sadece epitel hasarını değerlendirdiğinden ek bir skorlama sistemine gerek duyuldu. Yeni skorlamaya göre de, sırasıyla villusları döşeyen epitel hasarı, lamina propria ve serozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu, lamina propriada ödem ve konjesyon değerlendirildi. Belirtilen tüm parametreler için; 0 normal, 1 hafif derecede, 2 orta derecede ve 3 şiddetli olarak semikantitatif derecelendirme sistemi kullanıldı. Her örnek için yapılan puanlamalar, toplam skor olarak hesaplandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Her iki skorlama sistemi için de, her grupta ortaya çıkan değişikliklerin puanı, değişiklik olan hayvan sayısı ile çarpıldı ve gruptaki hayvan sayısına bölünerek o grubun ortalama hasar skoru bulundu.

3.7. Organ Banyosu

2 cm uzunluğundaki tam kat ileum örnekleri, içinde Krebs solusyonu (mM/L olarak NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24, glukoz 11, MgSO₄ 1.2, Na₂EDTA 0.01) bulunan, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan organ banyosuna sirküler kas yönünde asıldı. Tüm deneylerde banyo sıcaklığı 37 °C'de, pH'sı 7.4'de sabit tutuldu. 10 ml'lik organ banyosunda bütün preparatlara 1 gr ön gerim uygulandı ve bir saatlik dengelenme süresi boyunca 20 dakikada bir Krebs solüsyonuyla yıkandı. Dokuların tonusundaki değişiklikler "force displacement transducer" (COMMAT, Ankara, Türkiye) aracılığı ile izometrik olarak ölçüldü ve Biopac Kayıt Sistemi (Biopac Systems Inc., CA, USA) ile veriler bilgisayar ortamında elde edildi (Resim 2).



Resim 2. Organ banyosu düzeneği

Çalışma gruplarından alınan ileum dokuları 50 mM KCl ile muamele edildi ve kasılma cevapları gram kasılma olarak ifade edildi. Dokuların dinlendirilmesinden sonra 40 volt, 0.5 msn, ardışık 0.5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz elektriksel uyarı, ardışık 10 mM, 20 mM, 40 mM ve 80 mM KCl, kümülatif (10^{-9} - 10^{-4} M) CCh ayrı ayrı uygulandı. Uygulamalar arasında Krebs solusyonu ile yıkanan ve dinlendirilen dokuların kasılma cevapları değerlendirildi. Sonuçlar, tüm gruplarda gram kasılma/yaş doku ağırlığı olarak hesaplandı.

3.8.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı (SPSS 11.5 ve Statistica 6.0). Biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerin dağılımlarının normal olup olmadıklarını değerlendirmek için Tek Örneklem Kolmogorov Simirnov testi kullanıldı ve tüm örneklerin normal dağılım gösterdikleri sonucuna ulaşıldı. TNF- α , MDA, MPO ve organ banyosu çalışmalarına ait değerlerin gruplar arasında anlamlı bir farklılık gösterip göstermedikleri Tek Yönlü Varyans Analizi (one-way ANOVA) ile test edildi, farklılık olan alt grupların belirlenmesinde ise Tukey testinden yararlanıldı. Histopatolojik değerlendirmede elde edilen skorlar bakımından gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. İstatistik analizlerde $p < 0,050$ ise test sonucu anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Serum TNF- α düzeyleri değerlendirildiğinde peritonit grubunda TNF- α 'nın kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ve etanercept grubunda bu değerlerin kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu saptandı. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. (p=0,001) (Tablo 1, Şekil 2)

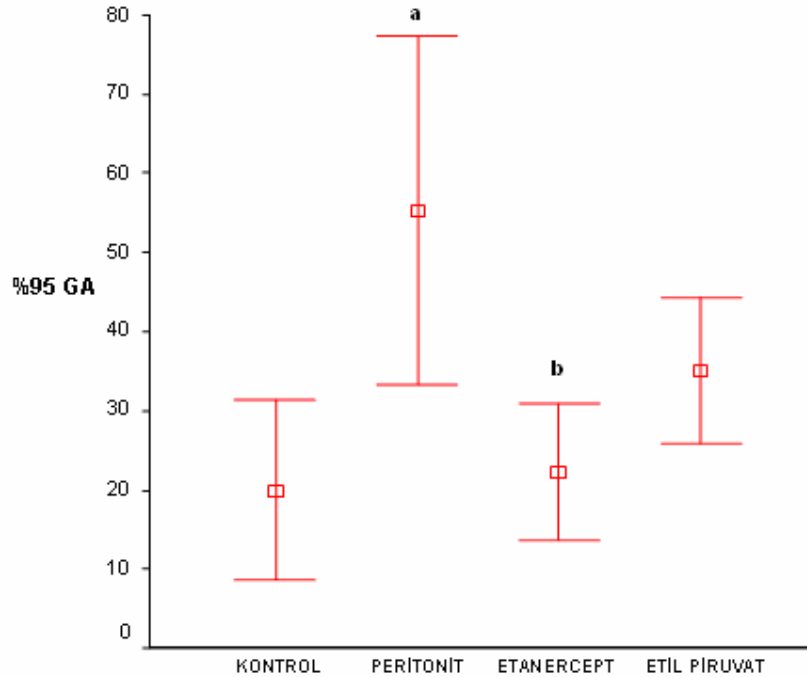
Tablo 1. Serum TNF- α , doku MDA ve MPO düzeyleri

Değişken	Kontrol	Peritonit	Etanercept	Etil Pirüvat	P
TNF- α (pg/ml)	19,94 \pm 4,81	55,31 \pm 9,35 ^a	22,22 \pm 3,67 ^b	35,05 \pm 3,93	0,001
MDA (nmol/ml)	29,66 \pm 1,10	40,62 \pm 6,32	31,69 \pm 1,50	29,10 \pm 0,82	0,072
MPO (ünite/gr)	0,14 \pm 0,01	0,30 \pm 0,04 ^c	0,23 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	0,005

^a p=0,001 TNF- α düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiştir.

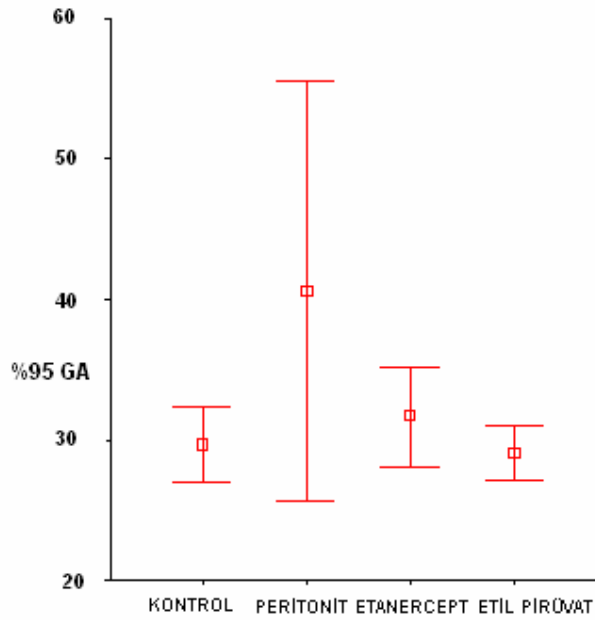
^b p=0,003 Peritonit ile yükselen TNF- α etanercept ile önemli oranda düşmüştür.

^c p=0,004 Peritonit MPO düzeylerini yükseltmiştir.

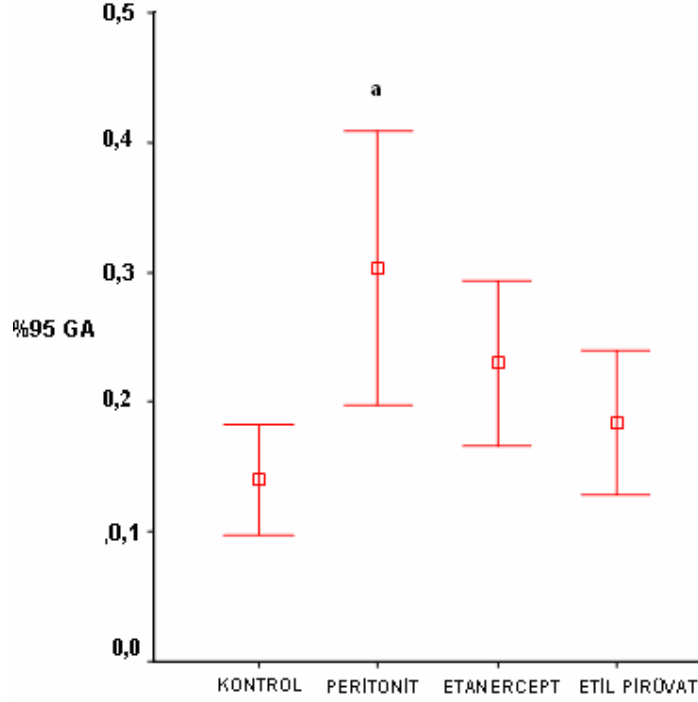


Şekil 2. Serum TNF- α düzeyleri. Yatay eksen de gruplar, dikey eksen de TNF- α değerleri görülmektedir. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir. [(varyans analizi, p=0,001, Tukey testi; **a** için p=0,001 kontrol grubu ile, **b** için p=0,003 Peritonit grubu ile karşılaştırıldığında peritonitle anlamlı şekilde yükselen TNF- α düzeyleri etanercept ile istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşmüştür.)].

Doku MDA ve MPO seviyelerine bakıldığında, peritonit grubunda kontrol grubuna göre hem MDA hem de MPO'da artış tespit edildi. MPO seviyelerindeki artış istatistiksel olarak da anlamlı idi. Etanercept ve etil pirüvat verilen her iki grupta da hem MDA, hem MPO düzeyleri önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Özellikle etil pirüvat grubundaki MPO değerleri peritonit grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı derecede düşük bulunmuştur. (Tablo 1, Şekil 3, Şekil 4)



Şekil 3. Doku MDA düzeyleri. Yatay eksen de gruplar, dikey eksen de MDA değerleri görülmektedir. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir. Peritonit grubunda MDA düzeyleri daha yüksek izlenmekle birlikte gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır. (varyans analizi, $p=0,072$).

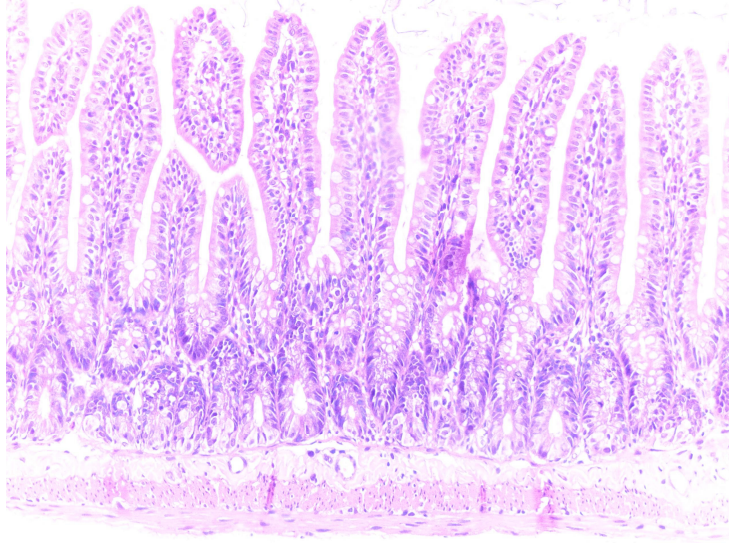


Şekil 4. Doku MPO düzeyleri. Yatay ekseninde gruplar, dikey ekseninde MPO değerleri görülmektedir. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir. Kontrol grubuna göre peritonit grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek izlenen doku MPO düzeylerinin, peritonitten sonra etanercept ve etil pirüvat uygulaması ile azaldığı görülmektedir. [(varyans analizi, $p=0,005$, Tukey testi; a için $p=0,004$)].

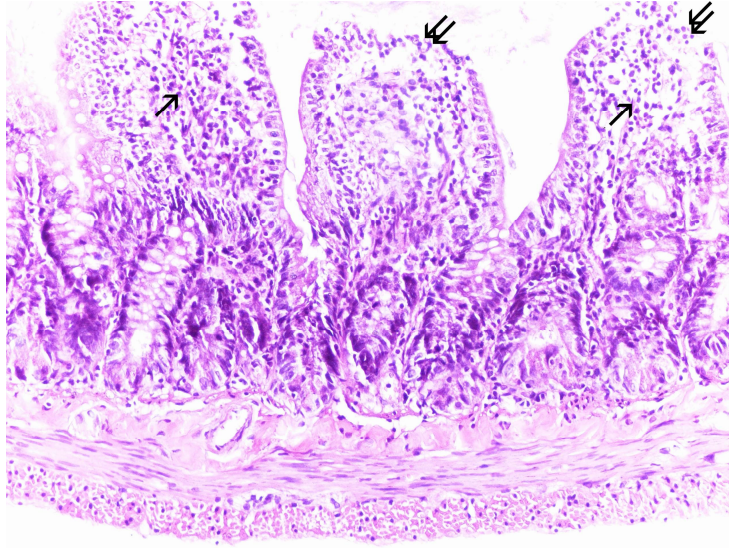
4.2.Histopatolojik H-E Boyama Sonuçları

İleum dokularından alınan kesitlerin H-E boyaması ışık mikroskopik incelemelerinde; peritonit grubunda epitelde ileri derecede kalkmalar, yer yer soyulma, lamina propriada konjesyon ve serozada nötrofil infiltrasyonu izlendi. (Resim 3, Resim 4)

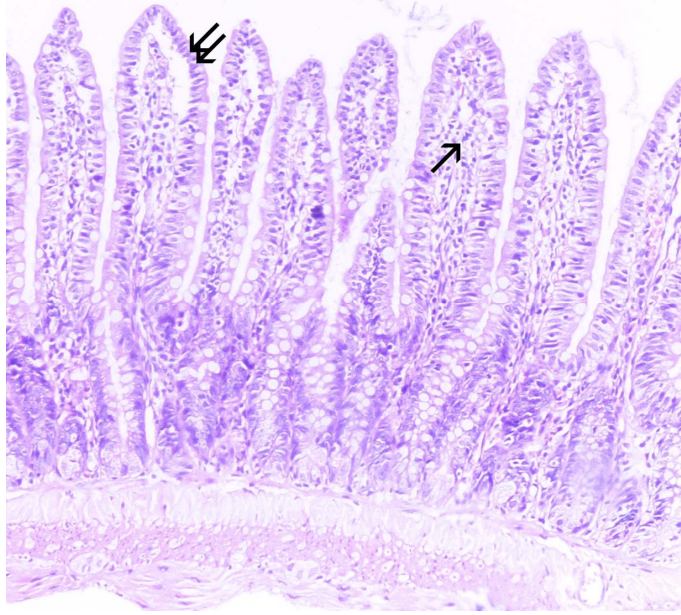
Etanercept ve etil pirüvat gruplarında lamina propriada nötrofil infiltrasyonu, subepitelyal genişleme ile birlikte epitelde orta derecede kalkma izlendi. (Resim 5, Resim 6). Bu iki grupta gözlenen histopatolojik değişiklikler her iki skorumaya sistemine de paralel olarak peritonit grubuna oranla önemli ölçüde daha azdı.



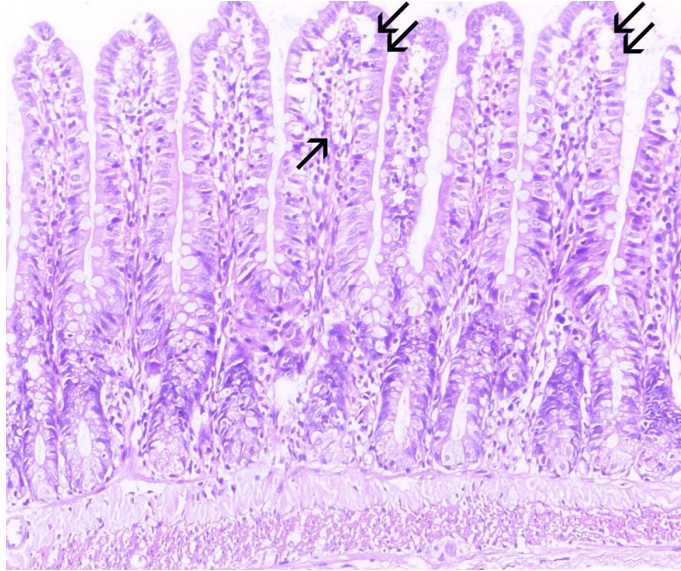
Resim 3. Kontrol grubuna ait ileum örnekleri. Düzenli yapıda villuslar içeren ince barsak dokusu izlenmektedir (H-E, x 200).



Resim 4. Peritonit grubuna ait ileum örnekleri. Villuslarda distorsiyon, döşeyici epitelde hasar (çift ok ile işaretli) lamina propriada ödem yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok ile işaretli) izlenmektedir. Serozal yüzeyde inflamatuvar hücre toplulukları dikkati çekmektedir. (H-E,x200).



Resim 5. Etanercept grubuna ait ileum örnekleri. Genelde düzenli yapıdaki ileum örneklerinde villusların uç kısımlarında epitelde ayrılma (çift ok ile işaretli), lamina propriada hafif derecede ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmektedir. Serozal yüzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcut değil (H-E,x200).



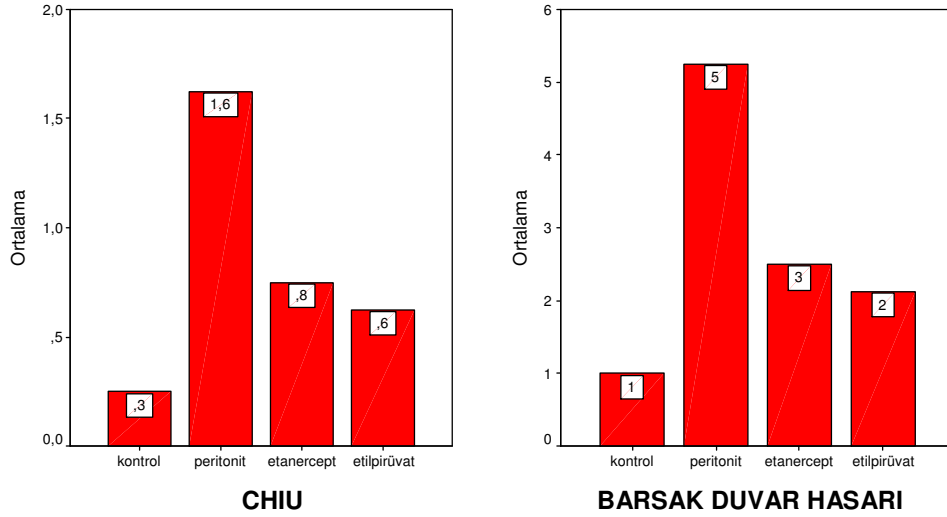
Resim 6. Etil pirüvat grubuna ait ileum örnekleri. Genelde düzenli yapıdaki ileum örneklerinde villusların uç kısımlarında etanercept verilen gruba göre epitelde daha hafif derecede ayrılma (çift ok ile işaretli), lamina propriada minimal derecede ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmektedir. Serozal yüzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcut değil (H-E,x200).

Chiu skorları bakımından gruplar değerlendirildiğinde, kontrol ile peritonit grupları ($p=0,011$) arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık varken diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Barsak duvar hasarı skorları bakımından gruplar arasında farklılık saptandı ($p= 0,001$), kontrol ile peritonit grupları ($p=0,001$) ve peritonit ile etil pirüvat grupları ($p=0,039$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık varken diğer gruplar arasında önemli bir farklılık izlenmedi. (Tablo 2, Şekil 5)

Tablo 2. İleumda Chiu ve barsak duvar hasarı skorlaması bulguları

	Kontrol	Peritonit	Etanercept	Etil Pirüvat	P
Chiu skorlaması	0,30 ^a	1,60	0,80	0,60	0,008
Barsak duvar hasarı skorlaması	1,00 ^b	5,00 ^c	3,00	2,00	0,001

^a $p=0,011$, ^b $p= 0,001$ peritonit grubu ile, ^c $p=0,039$ etil pirüvat grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 5. İleumda Chiu ve barsak duvar hasarı skora ortalamalarının gruplara göre dağılımı. Peritonit hem ileum mukozasında hem de tüm barsak duvarında inflamatuvar hasara neden olmuştur. Etanercept ve etil pirüvat uygulaması ile bu hasarlanma anlamlı ölçüde azalmıştır.

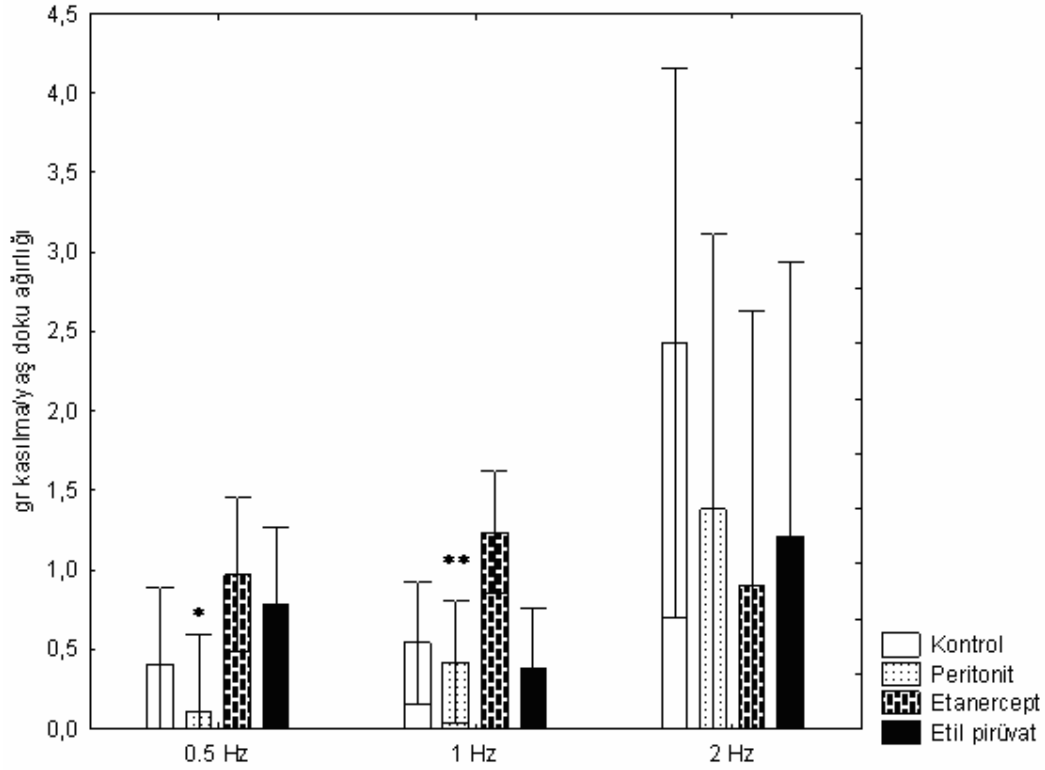
4.3.Organ Banyosu Sonuçları

Elektriksel uyarı verildiğinde kontrol grubundaki normal ileum dokusunda frekans arttıkça dokunun verdiği kasılma yanıtının arttığı, peritonitin bu yanıtı değiştirmedeği ancak tüm frekanslarda peritonit grubunda kasılma yanıtlarının azaldığı görülmüştür. Etanercept verilen grupta kasılma yanıtlarının 0.5 ve 1 Hz frekansta güçlendiği görülmüştür. Etil pirüvatın elektriksel uyarı ile kasılma üzerine anlamlı bir etkisi saptanmamıştır. (Tablo 3, Şekil 6).

Tablo 3. Elektriksel uyarı kasılma yanıtları

Değişken	Kontrol	Peritonit	Etanercept	Etil Pirüvat
0,5 Hz	0,40 ± 0,31	0,11 ± 0,11	0,96 ± 1,01 ^a	0,78 ± 0,80
1 Hz	0,54 ± 0,60	0,42 ± 0,30	1,23 ± 0,76 ^a	0,37 ± 0,30
2 Hz	2,43 ± 4,06	1,38 ± 1,61	0,90 ± 1,18	1,21 ± 1,51

^a 0,5 Hz için p=0,005, 1 Hz için p=0,024 Etanercept uygulanması peritonit grubuna göre kasılmayı arttırmıştır.



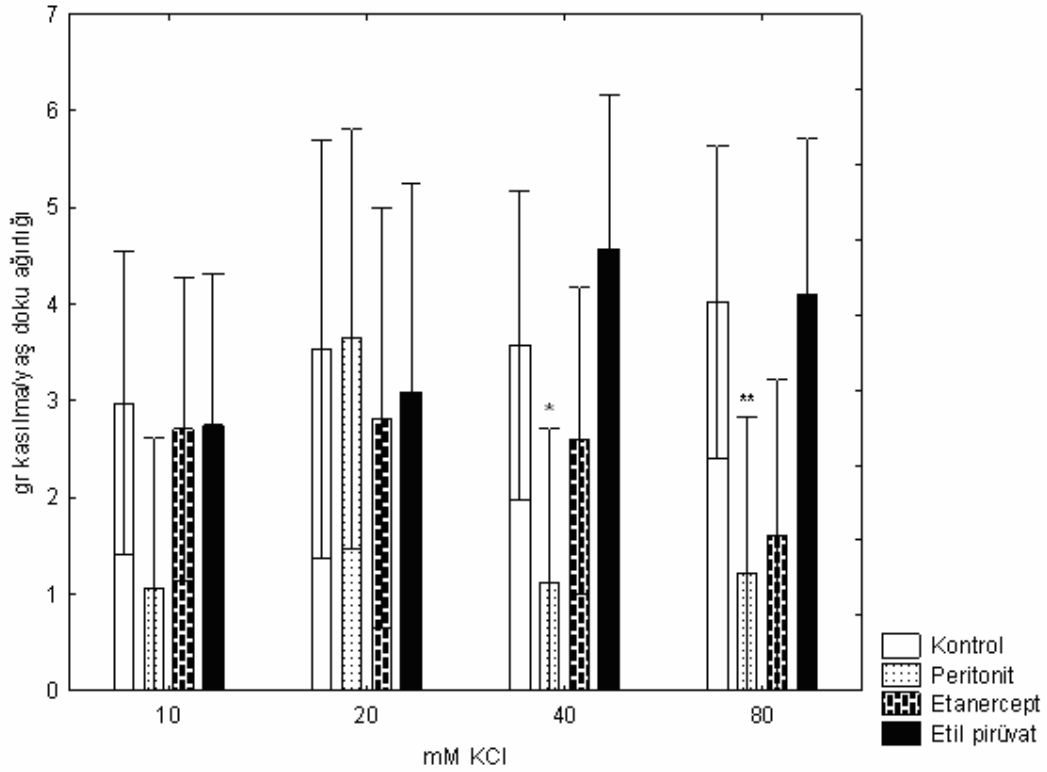
Şekil 6. Elektriksel uyarı kasılma yanıtları. Etanerceptin bozulan kasılma yanıtlarını arttırdığı izlenmektedir. (Tukey, * p=0,005, ** p=0,024 etanercept grubu ile karşılaştırıldığında)

Organ banyosu çalışmalarında, peritonitin ileum dokusunun 40 ve 80 mM gibi yüksek doz KCl'e verdiği kasılma yanıtlarını anlamlı şekilde azalttığı gözlemlendi. Etil pirüvat uygulanan gruplarda bu kasılma yanıtlarının anlamlı olarak düzeldiği, ancak etanerceptin bir etkisinin olmadığı izlendi. (Tablo 4, Şekil 7)

Tablo 4. KCl kasılma yanıtları

Değişken	Kontrol	Peritonit	Etanercept	Etil Pirüvat
10 Mm	2,97 ± 2,54	1,05 ± 1,23	2,70 ± 2,41	2,74 ± 2,22
20 mM	3,53 ± 2,51	3,64 ± 3,71	2,82 ± 1,97	3,08 ± 3,43
40 mM	3,57 ± 1,43	1,11 ± 1,03 ^a	2,58 ± 1,68	4,57 ± 3,65
80 mM	4, 02 ± 1,79	1,22 ± 1,31 ^b	1,61 ± 1,24	4,09 ± 3,66

^a p=0,019, ^b p=0,05 Kontrol ve etil pirüvat grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

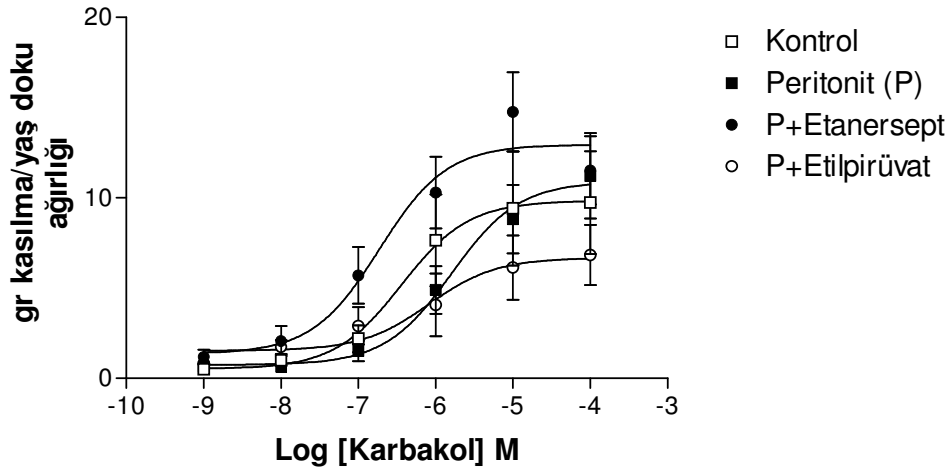


Şekil 7. KCl kasılma yanıtları. Yüksek konsantrasyonda peritonitle bozulan kasılma yanıtları etil pirüvat ile düzelmiştir. (Tukey testi, * $p=0,019$, ** $p=0,05$ Kontrol ve etil pirüvat grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.)

Kümülatif CCh uygulamasında peritonit ile bozulan kasılma yanıtı, etanercept verilen grupta tersine dönmüş, ancak etil pirüvat verilen grupta etkilenmemiştir. (Tablo 5, Şekil 8)

Tablo 5. CCh kasılma yanıtları

Değişken	Kontrol	Peritonit	Etanercept	Etil Pirüvat
$10^{-9}M$	$0,51 \pm 0,13$	$0,65 \pm 0,24$	$1,19 \pm 0,39$	$0,81 \pm 0,18$
$10^{-8}M$	$1,00 \pm 0,30$	$0,65 \pm 0,19$	$2,07 \pm 0,82$	$1,73 \pm 0,38$
$10^{-7}M$	$2,20 \pm 0,73$	$1,52 \pm 0,56$	$5,71 \pm 1,56$	$2,90 \pm 1,03$
$10^{-6}M$	$7,65 \pm 2,54$	$4,90 \pm 1,32$	$10,29 \pm 1,97$	$4,07 \pm 1,73$
$10^{-5}M$	$9,47 \pm 2,74$	$8,82 \pm 1,90$	$14,7 \pm 2,19$	$6,14 \pm 1,78$
$10^{-4}M$	$9,74 \pm 2,84$	$11,21 \pm 2,37$	$11,52 \pm 1,89$	$6,83 \pm 1,66$



Şekil 8. CCh kasılma yanıtları. Kümülatif CCh kasılma yanıtlarından elde edilen logaritmik eğrilerde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir interaksiyon izlenmemekle birlikte ileal doku kasılması etanercept uygulaması ile güçlenmiştir. ($p=0,096$).

Tablo 6. CCh'e ait EC_{50} değerleri

	CCh'e ait EC_{50} (μM)
Kontrol	0,36 \pm 0,46 (n=8)
Peritonit	1,62 \pm 0,29 (n=8)*
Etanercept (100mg/kg x 2)	0,19 \pm 0,30 (n=8)**
Etil pirüvat (40mg/kg x 2)	0,82 \pm 0,52 (n=8)

* $p= 0,03$ kontrol grubuna göre, ** $p<0,05$ peritonit grubu ile karşılaştırıldığında.

Maksimum kasılma yanıtının % 50'sini oluşturabilmesi için gerekli CCh dozunun (EC_{50}) peritonit grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak da anlamlı derecede yüksek olduğu, etanercept uygulanması ile EC_{50} değerinin önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir. (Tablo 6).

5. TARTIŞMA

Peritonit, batin içi organlarda şiddetli lokal hasarla birlikte sistemik etkileri de olan, periton zarının inflamasyonu ile karakterize klinik tablodur^{70,71}. Batında distansiyon, ileus, şok, multiorgan yetmezliği gibi geniş klinik spektruma sahip bu süreçte, en çok etkilenen batin içi organ barsaklar olup düz kas kasılma fonksiyonlarının bozulduğu gösterilmiştir^{5,20}. Peritonitte görülen bu geniş klinik tablodan lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtın sorumlu olduğu bilinmektedir^{5,70,71,72,73}.

Çalışmada peritonit oluşturmak için kullandığımız, Baker tarafından tanımlanmış çekum ligasyonu ve perforasyonu, insanlardaki peritonit ve sepsisin klinik semptomatolojisini en yakın taklit eden, 24 saat içinde sepsise neden olan, hiperdinamik ve normotansif peritonit modelidir^{5,66,74,75}. Kaya ve arkadaşlarının çalışmasında çekum ligasyonu ve perforasyonu ile oluşturulan deneysel peritonitte ileal kontraksiyonların bozulduğu gösterilmiştir⁷⁰. Bizim çalışmamızda da, bu modelin literatürde bildirilenlerle benzer olarak deneysel peritonit ve sepsis oluşturma ve intestinal motilite çalışması için uygun bir model olduğu görülmüştür.

Peritonitte görülen lokal ve sistemik organ hasarından TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve siklooksijenaz ürünleri gibi değişik proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi sorumludur^{70,71}. TNF- α 'nın inflamasyonun erken yanıtlarından sorumlu olduğu, inflamatuvar uyarıdan sonra dakikalar içinde salınmaya başladığı, 1. saate pik yapıp 3-4 saat sonra salınımının durduğu bilinmektedir^{3,7}. Lodato ve ark., ratlarda lipopolisakkaritle indüklenen endotoksemi modelinde ileal kas kontraktilesini değerlendirmişler ve endotoksinin TNF ve IL-1 yapımını uyardığını, bu sitokinlerin ileal NOS aktivitesini artırarak kontraktileyi azalttığını, sitokinler antagonize edildiğinde ise TNF bağlayıcı proteinin (TNFbp) IL-1 reseptör antagonistine (IL-1ra) göre kontraktileyi korumada daha efektif olduğunu bildirmişlerdir¹. Çalışmamızda peritonit grubunda serum TNF- α düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. TNF- α 'daki bu artış barsak dokusunda ciddi inflamatuvar reaksiyona yol açmıştır. Doku MPO seviyesindeki artış ve barsak duvarındaki hasarlanma bulguları da bunun göstergesidir.

Etanercept, suda çözünür TNF- α reseptör füzyon proteini olup TNF- α 'yı bağlar ve kendi reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek etki gösterir^{9,64}. Etanercepti TNF- α 'nın pik yaptığı 1. saatte ve salınımının durduğu 4. saatte;

önceden yapılmış deneysel çalışmalarda toksik olmayan ancak etkisinin gösterildiği 8 mg/kg dozda vermeyi planladık^{76,77}. Etanercept verilen grupta TNF- α düzeylerinin kontrol grubu ile korelasyon gösterdiğini, ileal dokulardaki MDA ve MPO düzeylerinin düşük olduğunu, histopatolojik incelemede peritonit grubunda ileum duvarında gözlenen ödemin ve konjesyonun, nötrofilik infiltrasyonun ve epitel hasarının azaldığını, ileumun elektriksel uyarı ile ve CCh uygulaması ile kasılma yanıtlarının düzeldiğini saptadık.

İnflamasyonun geç medyatörlerinden olan HMGB-1'in, endotoksemide 8. saatte, çekum ligasyonu ve perforasyonu sonrasında 18. saatten itibaren serumda saptandığı ve 24-72. saate kadar yüksek seyrettiği bildirilmiştir. Temelde hücre içi transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmış olan bu molekül, makrofajlardan TNF- α ve IL-1 β salınımını aktive, nötrofilleri stimüle ederek ve düz kas hücrelerine kemotaksisi artırarak proinflamatuvar etkilerini gösterir^{62,65,78}. İntestinal epitelde NOS aktivitesini artırır⁶². Literatürde immunglobulin grubu reseptör ailesinin üyesi olan, ileri glikolizasyonun son ürünleri için reseptör (receptor for advanced glycation end products, RAGE) tanımlanmıştır. Endotel hücresi, düz kas hücresi, monosit, makrofaj, nöronlar ve birçok malign hücrede eksprese olan RAGE'ün, HMGB-1 dahil birçok ligandla bağlandığı bildirilmiştir⁷⁹. HMGB-1'in barsak düz kas hücrelerine de RAGE ile bağlanarak barsak duvarında inflamatuvar olayları tetiklediği düşünülmektedir. Li ve ark., HMGB-1'in rekombinant B box bölgesinin, murine makrofaj hücre kültüründe, TNF- α salınımını indüklediğini göstermişler⁸⁰. Fiuza ve ark. ise, insan mikrovasküler endotel hücre kültüründe HMGB-1'in lökosit adezyon moleküllerinin upregulasyonunu, nötrofil ve monositlerden kemokinlerin sekresyonunu, proinflamatuvar sitokinlerin yapımını, fibrinoliz düzenleyicilerinin salınımını indüklediğini ve RAGE ekspresyonunu artırarak proinflamatuvar etkilerini gösterdiğini bildirmişler⁷⁹. HMGB-1'in diğer proinflamatuvar medyatörlere göre geniş terapötik pencereye sahip olması sepsis için anti-HMGB-1 tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutmuştur. HMGB-1'in aktivitesini (anti-HMGB-1 antikoru, HMG A box) veya salınımını (etil pirüvat) spesifik olarak inhibe eden tedavi seçeneklerinin mortaliteyi azalttıkları bildirilmiştir⁸.

Yang ve ark. in vitro hücre kültüründe HMGB-1 ve HMGB-1 B box parçasının makrofajlardan TNF- α salınımını indüklediğini, ancak HMGB-1 A box'ın ise TNF- α salınımını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca anti HMGB-1 antikoru (nötralizan antikor) uygulanan septik farelerde serum HMGB-1 düzeylerinin düşmediği ancak nötralize edilmiş HMGB-1'in aktivitesinin azalmasıyla survinin arttığını raporlamışlardır ⁷⁸. HMGB-1'in salınımını inhibe eden etil pirüvat, endojen bir metabolit olan pirüvik asitin basit alifatik esteridir. İn vivo ve in vitro modellerde, etil pirüvatın çeşitli mekanizmalarla proinflamatuvar medyatörlerin salınımını azaltarak antiinflamatuvar etkisini gösterdiği ortaya konmuştur. HMGB-1 dışında salınımını inhibe ettiği medyatörler arasında NO, TNF- α , siklooksijenaz-2 (COX-2), IL-6 yer alır ⁸¹. Ulloa ve ark., endotoksemi ve sepsiste etil pirüvatın hücre içi nükleer faktör- KB (NF-KB) ve p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) sinyal yollarını inhibe ettiğini öne sürmüşler ve bu etki ile TNF- α ve HMGB-1 salınımını önlediğini in vitro ve in vivo olarak göstermişlerdir ⁶⁵. NF-KB, intestinal epitelyal hücrede NOS'ı indükler ve kasılmayı inhibe eder. Etil pirüvatın, mezenter iskemi reperfüzyonu ve endotoksemi ile indüklenen barsak mukoza hasarını, mikrovasküler hipoperfüzyonu ve inflamasyonu düzeltici etkisi olduğu raporlanmıştır ^{82,83,84}. Harada ve ark., farelerde barsak manipulasyonu ile oluşturulan ileus tablosunun, laparatomiden önce ve sonra uygulanan etil pirüvat tedavisi ile postoperatif inflamatuvar değişiklikler azaltılarak düzeldiğini öne sürmüşler ve toplam 4 dozda etil pirüvat uyguladıkları farelerde in vivo ve in vitro barsak motilitesinin düzeldiğini göstermişlerdir. Etil pirüvatın 40 mg/kg/doz ve 80mg/kg/doz uygulandığı iki ayrı grupta barsak motilitesi yönünden farklılık saptanmaması nedeniyle maksimum etki gösteren en düşük dozun gerekli olacağını bildirmişler ⁶.

Çalışmamızda, HMGB-1'in önceki yayınlarda bildirilmiş olan salınım paternini ve etil pirüvatın etkisinin gösterildiği en düşük dozu temel alarak çekum ligasyonu ve perforasyonu oluşturulan ratlara, ligasyon ve perforasyondan sonraki 12. ve 24. saatte 40 mg/kg/doz, i.p. etil pirüvat uyguladık. Serum TNF- α düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını, doku MDA ve MPO düzeylerinde anlamlı düşme olduğunu ve bunun literatür verileri ile uyumlu olduğunu gözlemledik. Etil pirüvat, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin efektif toplayıcısı olan bir bileşiktir. Buna göre antiinflamatuvar

özelliklerine ek olarak etil pirüvatın lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar şaşırtıcı değildir^{81,85,87}. Bu çalışmada da, etanercept verilen gruba göre etil pirüvat grubunda ileal doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna yakın değerlerde bulunmasını etil pirüvatın bu etkisi ile açıklayabiliriz. Etil pirüvatın, intestinal doku ve serumda peritonitle artan MDA ve MPO düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir⁸⁶. Bizim çalışmamızda da, literatür verileri ile uyumlu olarak etanercept uygulanan gruba göre etil pirüvat uygulanan grupta ileal doku MPO düzeyleri kontrol grubuna daha yakın değerlerde bulunmuştur.

Etil pirüvat uygulanan ratlarda ileum duvarında mukoza hasarının, lamina propriada ödemin, konjesyonun, nötrofilik infiltrasyonun ve epitel hasarının kontrol grubu ile korelasyon gösterecek şekilde azaldığını saptadık. Etanercept uygulanan gruba göre daha belirgin düzelme saptanan etil pirüvat grubunda sonuçların istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu ve bulgularımızın literatür verileri ile uyumlu olduğunu gözlemledik. İntestinal mukozal bariyer geçirgenliğinde artışa neden olduğu, nötrofil kemotaksisini arttırdığı bilinen HMGB-1'in inhibisyonunun etil pirüvat uygulanan grupta gözlenen histopatolojik bulguların düzelmesinden sorumlu olduğunu düşünmekteyiz. Biyokimyasal incelemelerde de nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan doku MPO düzeylerinin etil pirüvat uygulanan grupta azalmış olması bu görüşümüzü desteklemektedir.

Gastrointestinal sistemde kasılma fonksiyonu kolinerjik, nitrerjik, peptiderjik, taşikininerjik yolakların oluşturduğu bir harmonidir. Bu harmoni içinde Ach kasılma üzerine uyarıcı etkili iken, NO, VIP inhibitör etki gösterir^{88,89}. Taşikininerjik yolak daha çok duysal sinir uçları üzerinde etkili olmasına rağmen uyarıcı etki gösterdiği bildirilmiştir⁸⁸. CCh de, muskarinik reseptör agonisti olup incebarsakta klasik eksitatör etkili nörotransmitterdir⁸⁸. Gastrointestinal düz kaslara, düşük frekansta elektriksel uyarı verilmesi ise, otonom sinirleri uyararak kolinerjik yolak üzerinden kasılmayı sağlar. Organ banyosu deneylerinde kullandığımız KCl düz kas hücrelerinde voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarını açarak hücre içine Ca^{+2} akımını arttırdığı ve kasılmayı uyardığı bilinmektedir^{70,71}. Gastrointestinal düz kasları inhibe eden nonadrenerjik, nonkolinerjik nörotransmitter olan NO, hücre içi ve hücreler arası sinyal ileti molekülü olarak fizyolojik ve inflamatuvar olaylarda önemli rol oynar. Düz kas hücresinde guanilat siklazı aktive ederek siklik guanozin 3',5' monofosfat

(cGMP) konsantrasyonunu artırır⁹⁰. cGMP'in iyon kanallarını direk etkilediği düşünülür. NO'in düz kas hücrelerinde cGMP konsantrasyonunu artırarak ya da direk K⁺ kanallarını aktive ederek düz kasta gevşemeyi sağladığı bildirilmiştir⁹⁰. Birçok çalışmada da NO'in hücre içi Ca⁺² miktarını ya da Ca⁺²'un kontraktıl elemanlara sensitivitesini azaltarak düz kasta gevşemeye neden olduğu gösterilmiştir⁹⁰.

Çalışmamızda, gastrointestinal sistem düz kaslarının kasılma mekanizmalarını ve peritonitten etkilenen yolları değerlendirmek amacıyla dokulara elektriksel uyarı, KCl ve CCh verilerek organ banyosu deneyleri yapıldı. Elektriksel uyarı verildiğinde frekans arttıkça dokunun verdiği kasılma yanıtının arttığı ve peritonitle bu yanıtın değişmediği görüldü. Buna göre peritonitin nöronal cevaplar üzerinden gelişen kasılmayı azaltmadığı ve barsakları innerve eden sinirsel mekanizmalar üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı sonucuna varılabilir. İlginç olarak etanercept verilen grupta kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre güçlendiği görülürken, etil pirüvatın önemli bir etkisi izlenmedi. Kümülatif CCh uygulaması ile yine etanerceptin kasılmayı kontrol grubuna göre güçlendirdiği gözlemlendi. Bu etkinin nedeni olarak etanerceptin CCh reseptörlerinin duyarlılığını ve kolinerjik yolak üzerinden kasılmaya duyarlılığı arttırdığını öne sürebiliriz. Ancak bunu belirleyebilmek için peritonit oluşturmaksızın etanerceptin uygulandığı bir deney modeline ihtiyaç vardır.

Çalışmada KCl uygulamalarında ise, peritonitin yüksek doz KCl'e verilen kasılma yanıtlarını anlamlı olarak azalttığı, etil pirüvatın ise bozulan kasılma yanıtlarının düzelttiği görülmüştür. Peritonitte voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarının aktivitesinin etkilendiği, düz kas fonksiyonlarının bozulduğu bilinmektedir⁷⁰. Bizim çalışmamızda da peritonitte KCl ile oluşan kasılma yanıtlarındaki azalma muhtemelen aynı mekanizma ile oluşmaktadır. Etanerceptin reseptör aracılı kasılmaları güçlendirdiğini, Ca⁺² kanalları üzerinden gelişen kasılmaları etkilemediğini, etil pirüvatın ise Ca⁺² kanalları üzerinden kasılmaları düzenlediği sonucuna varabiliriz. Elektriksel uyarı, CCh ve KCl uygulamalarına verilen kasılma yanıtları değerlendirildiğinde değişik konsantrasyon ve frekanslara göre her değer istatistiksel olarak anlamlı olmasa da etanercept ve etil pirüvatın ileum kasılma yanıtlarını düzelttiğini söyleyebiliriz. HMGB-1'in inflamasyon

sürecinde Ca^{+2} kanallarını etkilediğini, TNF- α 'nın ise parasempatik uyarıyı azalttığını ileri sürebiliriz.

Sonuç olarak inflamasyonun erken döneminde ana medyatörünün TNF- α olduğunu, HMGB-1'in da ana medyatör olmamakla birlikte geç dönemde etki gösterdiğini, tüm inflamatuvar süreci yöneten temel medyatörün TNF- α olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda HMGB-1'in etkileri indirekt belirteçlerle ortaya konmuştur. Etanercept ve etil pirüvatın peritonitte gelişen barsak motilite bozukluklarını bu mekanizmalar üzerinden düzelttiğinin kesinleşebilmesi için, çalışmamızın HMGB-1'in serum ve doku düzeylerinin de ölçüldüğü deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çekum ligasyonu ve perforasyonu deneysel peritonit ve sepsis oluşturmak için uygun bir deney modelidir. Peritonitin barsak hasarı ve ileus oluşturduğu biyokimyasal, histopatolojik ve kontraktilite çalışmaları ile gösterilmiştir.
2. Deneysel olarak oluşturulan peritonitte biyokimyasal, histopatolojik ve farmakolojik çalışmalarla gösterildiği gibi incebarsak hasarı ve motilite bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Bu da kliniğe ileus ve sepsis olarak yansımaktadır.
3. Peritonit ile gelişen barsak hasarı ve ileus tablosunda TNF- α ve HMGB-1 önemli rol oynar.
4. Peritonitte serumda TNF- α , ileal dokuda MDA ve MPO seviyeleri artmış, barsak morfolojisi bozulmuş ve kasılma yanıtları azalmıştır.
5. Etanercept ile serum TNF- α , doku MDA ve MPO düzeyleri, etil pirüvat ile doku MDA ve MPO düzeyleri azalmıştır.
6. Etanercept ve etil pirüvat, oluşan barsak hasarını azaltmış ve morfolojideki bozulmaları düzeltmiştir.
7. Etanercept ve etil pirüvat farklı mekanizmalar üzerinden ileal kasılma yanıtlarını düzeltmiştir.
8. Etanercept elektriksel uyarı ve CCh'e verilen kasılma yanıtlarını güçlendirmiştir. Etil pirüvat KCl'e verilen kasılma yanıtlarını düzeltmiştir.
9. Peritonitteki inflamatuvar süreçte TNF- α parasempatik uyarıyı azaltırken, HMGB-1'in Ca^{+2} kanallarını etkilediği düşünülebilir.
10. Erken dönemde salınan TNF- α 'nın inflamatuvar süreci yöneten temel medyatör olduğu, HMGB-1'in ana medyatör olmamakla birlikte geç dönemde etkili olduğu düşünülebilir.
11. Gelecekte etanercept ve etil pirüvat gibi sitokin inhibitörleri peritonit ve sepsiste ortaya çıkan barsak hasarı ve ileusun tedavisinde kullanılabilir. Ancak bunun için daha çok sayıda deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1- Lodato RF, Khan AR, Zembowicz MJ, et. al. Roles of IL-1 and TNF in the decreased ileal muscle contractility induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 1):G1356-62.
- 2- Spates ST, Cullen JJ, Ephgrave KS, Hinkhouse MM. Effect of endotoxin on canine colonic motility and transit. *J Gastrointest Surg.* 1998; 2: 391-8.
- 3- Ulloa L, Tracey KJ. The cytokine profile: a code for sepsis. *Trends Mol Med.* 2005;11(2):56-63.
- 4- Sayek İ. *Temel Cerrahi, 2. Baskı* Ankara: Güneş Kitabevi, 1996:920-2.
- 5- Overhaus M, Togel S, Pezzone MA, Bauer AJ. Mechanism of polymicrobial sepsis-induced ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(3):G685-94.
- 6- Harada T, Moore BA, Yang R. Ethyl pyruvate ameliorates ileus induced by bowel manipulation in mice. *Surgery.* 2005;138(3):530-7.
- 7- Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 15:164(10 Pt 1):1768-73.
- 8- Czura CJ, Yang H, Tracey KJ. High mobility group box-1 as a therapeutic target downstream of tumor necrosis factor. *J Infect Dis.* 2003;15:187 Suppl 2:S391-6.
- 9- Hermann GE, Tovar CA, Rogers RC. LPS-induced suppression of gastric motility relieved by TNFR:Fc construct in dorsal vagal complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(3):G634-9.
- 10- Fink M.P. Ethyl pyruvate: A novel treatment for sepsis and shock. *Minerva anesthesiol* 2004;70:365-71.
- 11- Sayek İ. *Temel Cerrahi, 2. Baskı* Ankara: Güneş Kitabevi, 1996:895-96.
- 12- Wittmann DH, Walker AP, Condon RE. Peritonitis and Intraabdominal Infection. In Schwartz SI, editors: *Principles of Surgery, 6th ed.* New York. Mc Graw Hill; 1994:1449-83.

- 13-Sayek İ. Temel Cerrahi, 2. Baskı Ankara: Güneş Kitabevi, 1996:899-901.
- 14-Guyton AC. Tıbbi Fizyoloji, 7. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1986:1088-1129.
- 15-Berna RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Gastrointestinal regulation an motility. In: Physiology 5nd ed. Philadelphia: Mosby; 2004:539-65.
- 16-Randlich A, Tyler WJ, Cox JE. Responses of celiac and cervical vagal afferents to infusions of lipids in the jejunum or ileum of the rat. *Am J Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278 (1):34-43.
- 17-Watkin DFL.: *Brit. J. Surg.* 57:142. 1970.
- 18-Streeten DHP. : *Brit. J. Med.* 2:587, 1952.
- 19-Brooke BN. : *Metabolic dearrangements in GIS surgery.* Springfield Ill. Thomas 1967.
- 20-Sayek İ. Temel Cerrahi, 2. Baskı Ankara: Güneş Kitabevi, 1996:1408-33.
- 21-Balk RA. Severe sepsis and septic shock: definitions, epidemiology, and clinical manifestations *Crit Care Clin* 2000; 16:179–192.
- 22-Bone RC: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med.* 24: 163-72, 1996.
- 23-Freeman BD, Buchman TG. Gene in a haystack: tumor necrosis factor polymorphisms and outcome in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 3090-1.
- 24-van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intens Care Med* 2000; 26: Suppl 1: S98-102.
- 25-Matzinger P. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961: 341-2.
- 26- Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *JAMA* 1995; 273:117–123.
- 27- Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Berghe GV; Report on a roundtable meeting 4th International Conference on Sepsis in ICU, London. *J Crit Care Forum* Volume 6: Suppl. 3, 2002.
- 28- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM Consensus Conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101:1481-2, 1992.

- 29- Smith DW, Nagler-Anderson C.. Preventing intolerance: The induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol.* 2005;1:174(7):3851-7.
- 30-Cinel İ. Sepsis patofizyolojisi. www.tard.org.tr/uludag/ozetler/icinel.htm
- 31- Başaklar AC. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006:1001-2.
- 32-Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji, 5. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1995:25-47.
- 33- Mollay RG, Monnick JA, Rodrick ML. Cytokines, sepsis and immunomodulation. *Br J Surg* 1993 80:289-297.
- 34- Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol.* 1992;1:148(9):2724-30.
- 35- Coley WB The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas with a report of ten original cases. *Am J Med Sei* 1893;105:487-511.
- 36- Carwell EA, Old LJ, Kassel RL et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3666-70.
- 37- Beutler B, Makoney J, Le Trang et al. Purification of cachectin, a Lipoprotein Lipase- suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 Cells. *J Exp Med* 1985;161:984-95.
- 38- Aggarwal BB, Eessalu TE, Haas PE. Characterisation of the receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by interferon. *Nature* 1985;318:665-7.
- 39- Bagliani C, Mc Candless S, Tavernier J et al. Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on Hela and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *J Biol Chem* 1985;260:13395-7.
- 40- Tsujimoto M, Vilcek J. Tumor necrosis factor receptors in Hela Cells and their regulation by interferon gamma. *J Biol Chem* 1986; 261: 5384-8.
- 41- Kriegler M, Perez C, De Fay KA et al. A novel form of TNF- cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein; ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988;53:45-53.

- 42- Cybulsky MI, Colditz IG, Movat HZ. The role of interleukin-1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. *Am J Pathol* 1986;124:367-72.
- 43- White CW, Ghezzi P, Dinarello CA et al. Recombinant tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 pretreatment decreased lung oxidized glutathione accumulation, lung injury and mortality in rats exposed to hyperoxia. *J Clin Invest* 1987;79:1868-73.
- 44- Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T et al. Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988;163:378-85.
- 45- Everaerd B, Brouckaert P, Shaw A, Fiers W. Four different interleukin-1 species sensitize to the lethal action of tumor necrosis factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:378-85.
- 46- Michie HR, Wilmore DW. Sepsis and tumor necrosis factor- bed fellows cannot be ignored (Editorial). *Ann Surg* 1990;210:653-4.
- 47- Girardin E, Gram G, Dayer J et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *New Engl J Med* 1988;319:397-400.
- 48- Grame GE, Taylor TE, Molyneux ME et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *New Engl J Med* 1989;320:1586-91.
- 49- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234:470-4.
- 50- Evans D, Jacobs D, Revhaug A, Wilmore D. The effects of tumor necrosis factor and their selective inhibition by ibuprofen. *Ann Surg* 1989;209:312-21.
- 51- Tracey KJ, Font Y, Hese D et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330:662-4.
- 52- Mathison J, Wolfson E, Ulevitch R. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury rabbits. *J Clin Invest* 1988;81:1925-37.
- 53- Beutler B, Corami A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320:584-8.

- 54- Wolff SM. Biological effects of bacterial endotoxin in man. *J of Infect Dis* 1973;163:378-85.
- 55-Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 1988;164:280-86.
- 56-Beutler B, Milsark W, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor production, distribution and metabolic fate in vivo. *J Immunol* 1985;134:3972-7.
- 57-Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ III et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 1987;164:415-22.
- 58- Gaskill HV III. Continuous infusion of interferon tumor necrosis factor mechanisms of toxicity in the rat. *J Surg Res* 1988;44:664-71.
- 59-Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 1990;161:79-84.
- 60- Calendra T, Baumgartner JD, Gram GE et al. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, interferon gamma in the serum of patient with septic shock. *J Infect Dis* 1990;161:982-7.
- 61-Offner F, Philipe J, Vogelaers D et al. Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. *J Lab Clin Med* 1990; 116:100-5.
- 62-Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med.* 2004;255(3):320-31.
- 63-Andersson UG, Tracey KJ. HMGB1, a pro-inflammatory cytokine of clinical interest: introduction. *J Intern Med.* 2004;255(3):318-9.
- 64- Avunduk MC, Avunduk AM, Oztekin E, Baltaci AK, Ozyazgan Y, Mogolkoc R. Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. *Exp Eye Res.* 2004;79(3):357-65.
- 65-Ulloa L, Ochani M, Yang H et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;17:99(19):12351-6.

- 66-Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*. 1983;94(2):331-5.
- 67-Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. Edited by D.Armstrong. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Plenum Press, New York, 1994 :1-15.
- 68-Golowich SP, Kaplan SD: *Methods in enzymology*, Aca.Press Inc, vol II, New York, 1955:769.
- 69-Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow state. *Arch Surg* 1970; 101:478-483.
- 70- Kaya TT, Koyluoglu G, Soydan AS, Arpacik M, Karadas B. Effects of nimesulide and pentoxifylline on decreased contractile responses in rat ileum with peritonitis. *Eur J Pharmacol*. 2002;3:442(1-2):147-53.
- 71- Kaya TT, Koyluoglu G, Karadas B. Effect of peritonitis on gallbladder smooth muscle contractility in guinea pigs. *J Surg Res*. 2004;120(2):219-24.
- 72-Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation. *Shock* 4: 193-199,1995.
- 73- Nieuwenhuijzen GAP, Deitch EA, Goris JA. Infection, the gut and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *Eur J Surg* 162:259-273, 1996.
- 74-Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49: 186-196,1990.
- 75-Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock- a review of laboratory models and a proposals. *J Surg Res* 29:189-201,1980.
- 76-Geier A, Zollner G, Dietrich C et. al. Cytokine-independent repression of rodent Ntcp in obstructive cholestasis. *Hepatology*, 2005,41(3):470-7.
- 77-Roderfeld M, Geier A, Dietrich C et. al. Cytokine blockade inhibits hepatic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and up-regulates matrix metalloproteinase-9 in toxic liver injury. *Liver International* 2006: 26: 579-586.

- 78-Yang H, Ochani M, Li J et. al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;6:101(1):296-301.
- 79- Fiuza C, Bustin M, Talwar S et. al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2003;1:101(7):2652-60.
- 80-Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S et. al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med.* 2003;9(1-2):37-45.
- 81- Sappington PL, Cruz RJ Jr, Harada T et. al. The ethyl pyruvate analogues, diethyl oxaloproprionate, 2-acetamidoacrylate, and methyl-2-acetamidoacrylate, exhibit anti-inflammatory properties in vivo and/or in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2005;25:70(11):1579-92.
- 82- Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med.* 2003;29(11):2050-8.
- 83-Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med.* 2001;29(8):1513-8.
- 84- Sappington PL, Han X, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated caco-2 enterocytic monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(1):464-76.
- 85-Song M, Kellum JA, Kaldas H, Fink MP. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308:307-16.
- 86-Zhongguo W, Zhong B. Effect of ethyl pyruvate on peroxidation injury of intestinal mucosa in rats with severe abdominal infection. *Ji Jiu Yi Xue.* 2006;18(3):154-6.
- 87-Tawadrous ZS, Delude RL, Fink MP. Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and

ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock* 2002;17:473-7.

88-Matsui M, Motomura D, Fujikawa T. et.al. Mice lacking M₂ and M₃ muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci.* 2002;15:22(24):10627-32.

89-Serio R, Mule F, Postorino A. Non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory responses to nerve stimulation in rat colonic circular muscle. *Exp Physiol.* 1992;77(1):119-27.

90-Grasa L, Rebollar E, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. The role of NO in the contractility of rabbit small intestine in vitro: effect of K⁺ channels. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(3):407-19.

SİMGELER VE KISALTMALAR

TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör- α
HMGB-1	High Mobility Group Box-1
IL-1β	İnterlökin-1 β
MDA	Malondialdehit
MPO	Myeloperoksidaz
KCl	Potasyum Klorür
CCh	Karbakol
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
PP	Peyer Plakları
Ach	Asetilkolin
VIP	Vazoaktif İntestinal Polipeptit
NO	Nitrik Oksit
ATP	Adenin Trifosfat
SIRS	Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
MODS	Multiorgan Disfonksiyonu Sendromu
IgA	İmmünglobulin A
APC	Antijen Sunulan Hücre
TLR	Toll Like Receptors
IL-6	İnterlökin – 6
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
i.p.	İntraperitoneal
i.m.	İntramüsküler
HETAAB	Hekza Adezil Trimetil Amonyum Bromid
H-E	Hemotoksilen Eozin
TNFbp	Tümör Nekrozis Faktör Bağlayıcı Protein
IL-1ra	İnterlökin-1 Reseptör Antagonisti
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
COX-2	Siklooksijenaz-2

NF-κB

Nükleer Faktör-κB

MAPK

Mitogen Activated Protein Kinase

cGMP

Siklik Guanozin 3',5' Monofosfat

ŞEKİLLER VE RESİMLER

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Batın içi enfeksiyonda, bakteri invazyonundan multi-sistem organ yetmezliğine kadar olan patofizyolojik olaylar)	17
Şekil 2 (Serum TNF- α düzeyleri)	36
Şekil 3 (Doku MDA düzeyleri)	37
Şekil 4 (Doku MPO düzeyleri)	38
Şekil 5 (İleumda Chiu ve barsak duvar hasarı skorlama ortalamalarının gruplara göre dağılımı)	41
Şekil 6 (Elektriksel uyarı kasılma yanıtları)	43
Şekil 7 (KCl kasılma yanıtları)	44
Şekil 8 (CCh kasılma yanıtları)	45
Resimler	
Resim 1 (Çekum ligasyonu ve perforasyonu)	31
Resim 2 (Organ banyosu düzeneği)	34
Resim 3 (Kontrol grubuna ait ileum örnekleri)	39
Resim 4 (Peritonit grubuna ait ileum örnekleri)	39
Resim 5 (Etanercept grubuna ait ileum örnekleri)	40
Resim 6 (Etil pirüvat grubuna ait ileum örnekleri)	40

TABLULAR

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Serum TNF- α , doku MDA ve MPO düzeyleri)	36
Tablo 2 (İleumda Chiu ve barsak duvar hasarı skorlaması bulguları)	41
Tablo 3 (Elektriksel uyarı kasılma yanıtları)	42
Tablo 4 (KCl kasılma yanıtları)	43
Tablo 5 (CCh kasılma yanıtları)	44
Tablo 6 (CCh'e ait EC ₅₀ değerleri)	45