

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL TIKANMA SARILIĞI MODELİNDE  
İNFLİXİMAB'IN AKCİĞER HASARI ÜZERİNE OLAN  
ETKİNLİĞİ**

**Dr. Mustafa Tevfik BÜLBÜL**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. İbrahim BARUT**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon  
Birimi tarafından 4727-TU2-16 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA - 2016**

## ÖNSÖZ

Bu tezde, infliximab' ın tıkanma sarılığında akciğer hasarı üzerine olan etkinliği araştırılmıştır.

Doğduğum günden bugüne kadar maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında çalışmaya başladığım andan bugüne kadar geçen süre içinde her türlü yardımı benden esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında değerli katkıları olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. İbrahim Barut' a, Genel Cerrahi Anabilim Dalındaki çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Mahmut Bülbül olmak üzere, Prof. Dr. Hasan Erol Eroğlu, Prof. Dr. Ömer Rıdvan Tarhan, Doç. Dr. Mehmet Zafer Sabuncuoğlu, Yrd. Doç. Dr. Yavuz Savaş Koca'ya, bu tezin hazırlanmasında değerli katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Şirin Başpınar'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Duygu Kumbul Doğuç'a, Biyokimya Anabilim Dalı asistanlarından Dr. Halil İbrahim Büyükbayram'a, Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ersin Uskun'a, asistanlık sürem içinde geçirdiğim acı ve tatlı anları paylaştığım asistan dostlarıma, değerli yardımlarını esirgemeyen Genel Cerrahi Anabilim Dalı çalışanlarına ve hayatta herşeyi paylaştığım eşim Pınar Talip Bülbül' e teşekkürü borç bilirim.

**Dr. Mustafa Tefik BÜLBÜL**

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1- Safra Fizyolojisi ve Safra Asitlerinin Oluşumu: .....	4
2.2- Tıkanma Sarılığı:.....	5
2.2.1- Tıkanma Sarılığında; Bakteriye Translokasyon, Endotoksemi ve Akciğer Hasarı .....	6
2.3- İnfliximab.....	8
2.3.1-Molekül Özellikleri .....	8
2.3.2- Etki Mekanizması.....	9
2.4- Tıkanma Sarılığında İnflamatuvar Süreçte Yer Alan Sitokinler, Akut Faz Proteinleri ve Antioksidanlar.....	9
2.4.1- Serbest Radikal Oluşumunu Önleyen Antioksidanlar .....	10
2.4.2- Sitokinler ve Akut Faz Proteinleri.....	10
2.4.3-Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye, Oksidatif Stres İndeksi .....	11
2.4.3.1- Total Antioksidan Seviye/Status (TAS) .....	11
2.4.3.2- Total Oksidan Seviye/Status (TOS).....	12
2.4.3.3- Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	12
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>13</b>
3.1- Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	13
3.2- Çalışmanın Yürütüldüğü Laboratuvarlar ve Proje Desteği.....	13
3.3- Deney Hayvanlarının Temini ve Seçimi .....	13
3.4- Deney Hayvanlarının Bulunduğu Ortam Koşulları.....	14
3.5- Deney Gruplarının Oluşturulması .....	14
3.6- Anestezi ve Cerrahi İşlem .....	14
3.7- Tedavi.....	15

3.8- Akciğer Dokusunun ve Kan Örneklerinin Alınması.....	16
3.9- Biyokimyasal Analizler.....	16
3.9.1- Doku Homojenatı ve Serum Örneklerinin Hazırlanması .....	16
3.9.2- TAS (Total Antioxidant Status) ve TOS (Total Oxidant Status) Düzeylerinin Analizi.....	17
3.9.3- TNF $\alpha$ , IL-6 ve IL-8 Düzeylerinin Analizi.....	18
3.10- Patolojik Değerlendirme .....	18
3.11- İstatistiksel Analizler.....	19
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>20</b>
4.1- Biyokimyasal Bulgular.....	20
4.1.1- TNF- $\alpha$ (Serum).....	21
4.1.2- TNF- $\alpha$ (Doku) .....	22
4.1.3- IL-6 (Serum).....	22
4.1.4- IL-6 (Doku) .....	23
4.1.5- IL-8 (Serum).....	23
4.1.6- IL-8 (Doku) .....	24
4.1.7- TAS (Serum) .....	24
4.1.8- TAS (Doku).....	25
4.1.9- TOS (Serum) .....	26
4.1.10- TOS (Doku).....	27
4.1.11- OSI (Serum) .....	27
4.1.12- OSI (Doku) .....	28
4.2- Histopatolojik Bulgular.....	29
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>33</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>37</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>38</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>40</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>TS</b>	: Tıkanma sarılığı
<b>ARDS</b>	: Akut Respiratuvar Distres Sendromu
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	: Okside Glutasyon
<b>GSSG-R</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>MPO</b>	: Miyeloperoksidaz
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: İnterferon gama
<b>NAC</b>	: N-Asetilsistein
<b>PMNL</b>	: Polimorfonükleer lökosit
<b>GİS</b>	: Gastrointestinal sistem
<b>AC</b>	: Akciğer
<b>KC</b>	: Karaciğer
<b>ROS</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>SDÜ</b>	: Süleyman Demirel Üniversitesi
<b>DEHATAM</b>	: Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları ve Uygulama Merkezi
<b>IL-1</b>	: İnterlökin – 1
<b>IL-6</b>	: İnterlökin – 6
<b>IL-8</b>	: İnterlökin – 8
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Seviye/Status
<b>TOS</b>	: Total Oksidan Seviye/Status
<b>OSI</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>İB</b>	: İnterlökin – 1
<b>RES</b>	: Retiküloendoteliyal Sistem
<b>Ig G</b>	: İmmünglobulin G
<b>Ig A</b>	: İmmünglobulin A
<b>ADCC</b>	: Antikor Bağımlı Hücrel Toksikite
<b>SİYS</b>	: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>PAF</b>	: Trombosit Aktive Edici Faktör
<b>NK</b>	: Doğal Öldürücü
<b>Fe</b>	: Demir

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 1.</b> Verilerin gruplara göre median (min-maks) değerleri.....	20
<b>Tablo 2.</b> Grupların birbirleriyle karşılaştırılmaları ve p değerleri.....	21
<b>Tablo 3.</b> Grupların histopatolojik bulgularının vaka sayılarına göre değerlendirilmesi.....	30
<b>Tablo 4.</b> Histopatolojik bulguların istatistiksel karşılaştırılması.....	30



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnfliximab Molekül Özellikleri.....	8
--	---



**RESİMLER DİZİNİ**

<b>Resim 1.</b> Ana safra kanalının diseksiyonu ve bağlanması.....	15
<b>Resim 2.</b> Çalışmanın 7. gününde dilate ana safra kanalı. ....	16
<b>Resim 3.</b> Normal akciğer parankimine ait morfolojik görünüm.....	31
<b>Resim 4.</b> Alveol duvarlarında ve lümeninde seyrek nötrofil lökosit infiltrasyonu.....	31
<b>Resim 5.</b> Alveol duvarlarında ve lümeninde orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu ve parankimde kısmi destrüksiyon .....	32
<b>Resim 6.</b> Akciğer parankiminde tam destrüksiyon, yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu, abse oluşumu .....	32





## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafik 1.</b> TNF- $\alpha$ (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.....	21
<b>Grafik 2.</b> TNF- $\alpha$ (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	22
<b>Grafik 3.</b> IL-6 (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	22
<b>Grafik 4.</b> IL-6 (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	23
<b>Grafik 5.</b> IL-8 (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	24
<b>Grafik 6.</b> IL-8 (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	24
<b>Grafik 7.</b> TAS (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	25
<b>Grafik 8.</b> TAS (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.....	26
<b>Grafik 9.</b> TOS (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	26
<b>Grafik 10.</b> TOS (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	27
<b>Grafik 11.</b> OSI (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı. ....	28
<b>Grafik 12.</b> OSI (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.....	28

## 1.GİRİŞ

Tıkanma sarılığı (TS) operatif teknikler ve etkin antibiyotiklerdeki gelişmelere karşın, pek çok sisteme olumsuz yönde etkileri olması, sık görülmesi, yüksek morbidite ve mortalite oranları olması nedeniyle Genel Cerrahi ve Gastroenteroloji'nin en önemli problemlerinden biridir. Kardiyovasküler disfonksiyon, periferik vazokonstriksiyon, gastrointestinal kanama, koagülopati, renal ve hepatik disfonksiyon ve sepsis bu morbidite ve mortaliteye etki eden major komplikasyonlardandır (1).

Mortaliteye etki eden önemli faktörlerden biri oluşan Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SİYS)' dur. Ayrıca oluşan sitokin fırtınası ve sepsisin oluşturduğu organ hasarı bu sürece etki eder. SİYS' de etkili olan; ilk olarak salgılanan ve en etkin olan madde TNF-alfa dır, ayrıca IL-1 dir. Uzak organ hasarına sebep olan mediatörler ise IL-6 ve IL-8 dir. Oluşan sitokin fırtınası, bakteriyel translokasyona ve sepsise neden olur. Sepsisin oluşturduğu organ disfonksiyonu da (bu organlar böbrek, akciğer, karaciğer ve kalp olabilir) çoklu organ yetmezliğine ve ölüme neden olur. Deneysel olarak tıkanma sarılığı modeli, deney hayvanının ana safra kanalı bağlanıp kesilerek oluşturulabilir.

Yapılan çalışmalarda tıkanma sarılıklı hastalarda oluşan postoperatif komplikasyonlar; portal ve sistemik endotoksemi, bakteriyel translokasyon ve sepsis sendromuna neden olan inflamatuvar kaskatın aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur (2).

Tıkanma sarılığındaki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek bir çok sitokinlerin üretimini artırır. Böylece kontrol edilemeyen inflamatuvar sürece, multiorgan disfonksiyonuna, respiratuvar distress sendromuna ve ölüme neden olur (3, 4, 5).

Endotoksemisinin de TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu bilinmektedir. Dolaşımdaki bu sitokinler ROS' un aşırı üretilmesine duyarlıdır.

Tsan-Zon Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tıkanma sarılığında dolaşımdaki proinflamatuvar sitokinlerden TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL-1'in arttığı gösterilmiştir (6).

Tıkanma sarılıklı hastalarda doku hasarı patogeneziyle lipid peroksidasyonu ilişkili bulunmuştur. Lipid peroksidasyonu hücre membranındaki oksidatif hasarın ve hücre ölümünün önemli bir nedeni olarak bilinmektedir. Doku hasarı oluşumunda ROS (Serbest O<sub>2</sub> radikalleri) ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik ana nedendir (7).

Serbest oksijen radikalleri bu patolojide rol oynar gözükmemektedir. Serbest oksijen radikal temizleyicileri tıkanma sarılıklı ratlarda azalır. Böylece oksijen radikallerinin yaptığı organ hasarına duyarlılık artar. Glutasyon, oksijen radikallerine karşı hücresel savunmada büyük rol oynar. Glutasyonun azalmasında direkt olarak glutasyon peroksidaz enzimi rol alır. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Oksidatif stres için iyi bir belirteçdir. Lipid peroksidasyonu ile hasarlanan dokuda MDA, MPO düzeyleri artar (6, 8).

Ana safra kanalı bağlanmış deney hayvanlarında serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştıran glutasyon, katalaz ve superoksit dismutaz gibi enzimlerin aktivitesi azalır, böylece serbest oksijen radikallerinin oluşturacağı doku hasarına duyarlılık artar (9).

Rahman ve MacNee' ye göre aktive olmuş ve küçük hava yollarında birikmiş olan inflamatuvar hücreler reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını artırırken bu radikallerin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlayan faktörleri de azaltır. Böylece akciğer hasarını ve fibrozisini gerçekleştirir (10).

Erişkin tipi solunum zorluğu sendromunda (ARDS) alveolar epitel hasarı, mikrosirkülatuvar hasar ve alveolar interstisyel ödem önemli özelliklerdir. Erken dönemde nötrofil geç dönemde mononükleer hücre infiltrasyonu sonucunda bu hücrelerden açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ARDS' den sorumlu tutulmaktadır (11).

İnfliximab spesifik olarak tümör nekroz faktörü alfa (TNF  $\alpha$ ) hedef alan bir şimerik IgG, monoklonal antikorudur (12).

Kurt ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada infliximabın, anti-TNF- $\alpha$  etkinliği ve ROS oluşumunu azaltması yoluyla karbon tetraklorid kaynaklı akciğer hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir (13).

Güzel ve ark.'nın çalışmasında ise infliximabın, anti-inflamatuar ve antioksidan etkileri sayesinde intestinal iskemi/reperfüzyon modelinde gelişen akciğer hasarına karşı koruyucu etkilerinin olabileceğini saptamışlardır (14).

İnfliximab, anti-TNF-alfa etkinliği bilinen ve klinikte Ülseratif Kolit, Crohn, Romatoid Artrit, Ankilozan Spondilit, Psöriazis, Hepatosplenik T-Cell Lenfoma gibi durumlarda kullanılan bir ajandır. Anti TNF-alfa etkinliği ile sitokin cevabının engellenebilmesi, bakteriyel translokasyon, organ hasarı ve çoklu organ yetmezliğinin önüne geçerek sistemik inflamasyonun kontrolünü sağlayabilir.

Anti-TNF-alfa etkinliği kanıtlanmış olan infliximabın, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş tıkanma sarılığı modelinde, sitokin cevabını azaltabileceği buna ilintili olarak da bakteriyel translokasyon ve sepsisi önleyebileceği hipoteziyle, mortaliteye etkili olan akciğer hasarını azaltıp azaltmayacağını araştırılması amaçlanarak bu çalışma planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1- Safra Fizyolojisi ve Safra Asitlerinin Oluşumu:

Bilirubin, toksik bir maddedir ve safra yolu ile atılması karaciğerin en önemli fonksiyonlarından biridir. Günlük total safra sekresyonu 700-1400 ml dir. Günde yaklaşık 4 mg/kg bilirubin yapılır. Bunun %80-85' i yaşlanmış eritrosit hücresi içindeki hemoglobulinin hem grubunun katabolizmasından kaynaklanır. Bilirubinün %15-20' si de kemik iliğinde olgunlaşmakta olan eritrosit hücrelerinin yıkımından ve sitokrom P-450 ve sitokrom-C gibi eritrosit kökenli hemoproteinlerin hem gruplarından oluşur (15). Hemoglobin ilk olarak globin ve hem'e ayrılır. Hem halkası açılarak serbest demir kanda transferinle taşınır, dört pirol çekirdeği düz bir zincir yaparak safra pigmentlerini oluşturur. Oluşan safra pigmentlerinden ilki olan yeşil pigment, biliverdindir. Biliverdin indirgenerek sarı-kırmızı renkteki bilirubini oluşturur. Bilirubin plazmada hafifçe çözünür ve albumine kovalent olmayan bağlarla bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğer hücre membranınca absorbe edilen bilirubin, plazma membranından ayrılarak, karaciğer hücrelerindeki Y ve Z proteinleri adı verilen iki proteinden biri ile birleşir. Ancak, hemen sonra bilirubin bu proteinden ayrılır ve yaklaşık %80' i glukuronik asit ile birleşerek bilirubin glukuronat, %10' u sülfat ile birleşerek bilirubin sülfatı yapar, %10' u ise çeşitli maddelerle birleşir.

Nonkonjuge bilirubin yağda eriyebilir, toksiktir ve albumine sıkı bir şekilde bağlanarak yüksek kan düzeylerinde bile idrarla atılmayan bir form oluşturur. Yüksek kan düzeylerinde dokulara özellikle insanlarda beyine girebilir ve toksik hasara neden olur (15).

Konjuge bilirubin suda eriyebilir, toksik değildir ve sadece gevşek olarak albumine bağlıdır. Plazmada normalden yüksek oranda bulunduğu (tıkanma sarılıklarında olduğu gibi) idrarla atılabilir. Bilirubin bu bileşikler halinde aktif transportla safra kanalcıklarına çıkarılır (15).

Bağırsaklara geçen bilirubinün yaklaşık yarısı bakteriler tarafından suda kolay eriyen ürobilinojene çevrilir. Ürobilinojenin bir kısmı bağırsaktan geri emilerek portal dolaşıma geçer ve böbreğe gelerek burada sarı renkli ürobiline çevrilir. İdrara rengini bu madde verir. Dışkıdaki ürobilinojenin çoğu bağırsak bakterileri tarafından

okside edilerek sterkobiline döner ve dışkının tipik rengini verir (15).

Safranın kuru içeriği kolesterol, safra asitleri, bilirubin ve fosfolipidden oluşmaktadır. Safra asitleri hepatositlerde kolesterolden sentezlenen steroid moleküllerdir. Taurin ve glisin ile konjuge edilerek safra yollarına itrah edilirler.

Safrada primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere 3 tip safra asidi bulunmaktadır.

Primer safra asitleri: Kolik asit, Kenodeoksikolik asit

Sekonder safra asitleri: Deoksikolik asit, Litokolik asit, 7-ketokolik asit

Tersiyer safra asitleri: Ursodeoksikolik asit

Primer safra asitleri, bağırsakta anaerop bakteriler tarafından sekonder safra asitlerine dönüştürülmektedir. İnsanda safra asitlerinin % 38-54' ü kenodeoksikolik asit, % 26-39' u kolik asit ve % 16-33' ü deoksikolik asitten oluşmaktadır. Ursodeoksikolik asit ve litodeoksikolik asit % 0.1-5 gibi daha az oranlarda bulunur. Safra asitlerinin, kolesterolün taşınması ve taş oluşumlarının engellenmesinin yanında, yağların emiliminde de katkıları olmaktadır. Safra asitleri bağırsak içindeki endotoksinleri ve bakterileri deterjan etki ile bağlamakta, emilimlerini ve bakterilerin aşırı üremesini engellemektedir (16).

## **2.2- Tıkanma Sarılığı:**

İkter (sarılık) teriminin anlamı vücut dokularının sarıya boyanmasıdır. Böylece deri ve derin dokular sararır. Normalde serbest ve bileşik şekilleri içeren plazma bilirubin konsantrasyonu 0.5 mg/100 ml kadardır. Deri, bilirubin konsantrasyonu normalin üç katına yani, 2 mg/100 ml'ye çıktığı zaman sararmaya başlar. Sarılığın en çok rastlanan iki tipi hemolitik nedeni olan ve obstrüktif nedeni olanıdır. Tıkanma ikteri, safra kanallarının tıkanması veya karaciğer hücrelerinin haraplanmasıyla normal miktardaki bilirubin bile gastrointestinal sisteme çıkarılamamasıdır (17).

Karaciğerde safra önce hepatositler tarafından üretilir ve hepatik hücrelerin arasındaki küçük safra kanaliküllerine salgılanır, daha sonra, interlobüler septumlara doğru akar. Burada kanaliküller terminal safra kanallarına dökülür ve daha sonra giderek daha büyük kanallara dökülerek sonunda hepatik kanal ve koledok kanalına ulaşır. Buradan da ya doğrudan duodenuma ya da sistik kanal yoluyla safra kesesine yönelir (18).

Karaciğerin safra sekretuar basıncı 120-250 mm H<sub>2</sub>O' dur. Safra kesesi kontraksiyonu olduğunda bu basınç 300 mm H<sub>2</sub>O' e kadar yükselir. Bu basınç 300 mm H<sub>2</sub>O üzerine çıktığında karaciğerden safra salgısı inhibe olur. Basınç yükselince başta kolesterol olmak üzere safra tuzları ve fosfolipidlerin karaciğerden salınımı azalır. Normal bir safra akımının olabilmesi için ekstrahepatik safra yolu basıncının 10-15 cm H<sub>2</sub>O olması gerekir (19).

Ekstrahepatik safra yollarının bir nedenle tıkanması sonucu ortaya çıkan, hiperbilirubinemi ve bağırsakta safra asitlerinin yokluğuyla karakterize olan tıkanma sarılığında safra yolları cerrahisi yüksek mortalite ve morbidite riski taşır (17, 20).

### **2.2.1- Tıkanma Sarılığında; Bakteriyel Translokasyon, Endotoksemi ve Akciğer Hasarı**

Tıkanma sarılığı olan hastalarda morbidite ve mortaliteden sorumlu olan endotoksemi başlıca 2 ana faktör sonucu oluşmaktadır. Bunlardan birincisi, bağırsak bariyer fonksiyonunda bozukluk, bunun sonucu bakteri ve toksinlerinin portal dolaşıma geçmeleri; ikincisi de mononükleer fagositik fonksiyonda bozukluktur (21).

Retiküloendotelyal sistem, doku makrofajları olarak tanımlanır. Başlıca KC, dalak, akciğer ve kemik iliğinde bulunurlar. Bakteri, endotoksin, immun kompleks ve hücre debrisleri gibi partiküler materyallerin temizlenmesinden sorumludurlar (22).

KC' deki Kupffer hücreleri retiküloendotelyal sistem aktivitesinin %80-90' ından sorumludur. RES fonksiyonu obstüktif sarılık, travma, cerrahi ve sepsis gibi durumlarda deprese olur. RES fonksiyonunun bozulması bağırsaktan endotoksin absorpsiyonunun artması ile sonuçlanır (22).

Safra tuzlarının luminal akımı antibakteriyel etki ve endotoksinler üzerinde direkt deterjan etkisine sahiptir (23). Deneysel ve klinik çalışmalarda sarılıklı hayvan ve insanlarda oral safra tuzları verilmesinin endotoksin absorpsiyonunu azaltarak postop renal yetmezlikten koruduğu gösterilmiştir (24, 25). İntraluminal safra akımının olmaması bağırsakta değişikliklere ve mukozal hasara yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda enterositlerin bakterilerce invazyonuna karşı safranin inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir.

Sekretuar IgA eksternal vücut sıvılarındaki predominant Ig' dir. IgA selektif olarak safra içine verilir (26). Tıkanma sarılığı olan hastalarda endotokseminin nedenlerinden biri de bu fonksiyonun bozulmasıdır (21).

Safra yolu tıkanıklığı olan hastalarda kan-safra bariyeri bozulmuştur. Bu da safrada gram(-) bakterisi olan hastalarda endotoksemiye neden olabilmektedir. (4).

Tıkanma sarılığı modeli, bir sepsis modelidir ve multiple organ hasarı ile sonuçlanmaktadır. Tıkanma sarılığı, ratlarda pulmoner intravasküler fagositozu ve endotoksin sensitivitesini artırır. Chang ve Ohara'nın yaptığı bir çalışmada tıkanma sarılığı olan ratların akciğer parankiminde pulmoner kapillerlerde latex partikülü içeren büyük mononükleer makrofaj benzeri hücreler saptanmıştır. Tıkanma sarılığı olan bu ratlarda pulmoner intravasküler fagositozun arttığı, akciğer ödeme neden olduğu, bunun da sarılıklı hastalarda sepsis ve ARDS ye yatkınlığa sebep olduğu bildirilmektedir (27).

Yapılan çalışmalarda tıkanma sarılıklı hastalarda bulunan nötrofillerde oksidatif cevabın arttığı ve buna bağlı olarak dolaşımdaki IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  gibi uyarıcı sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (28, 29).

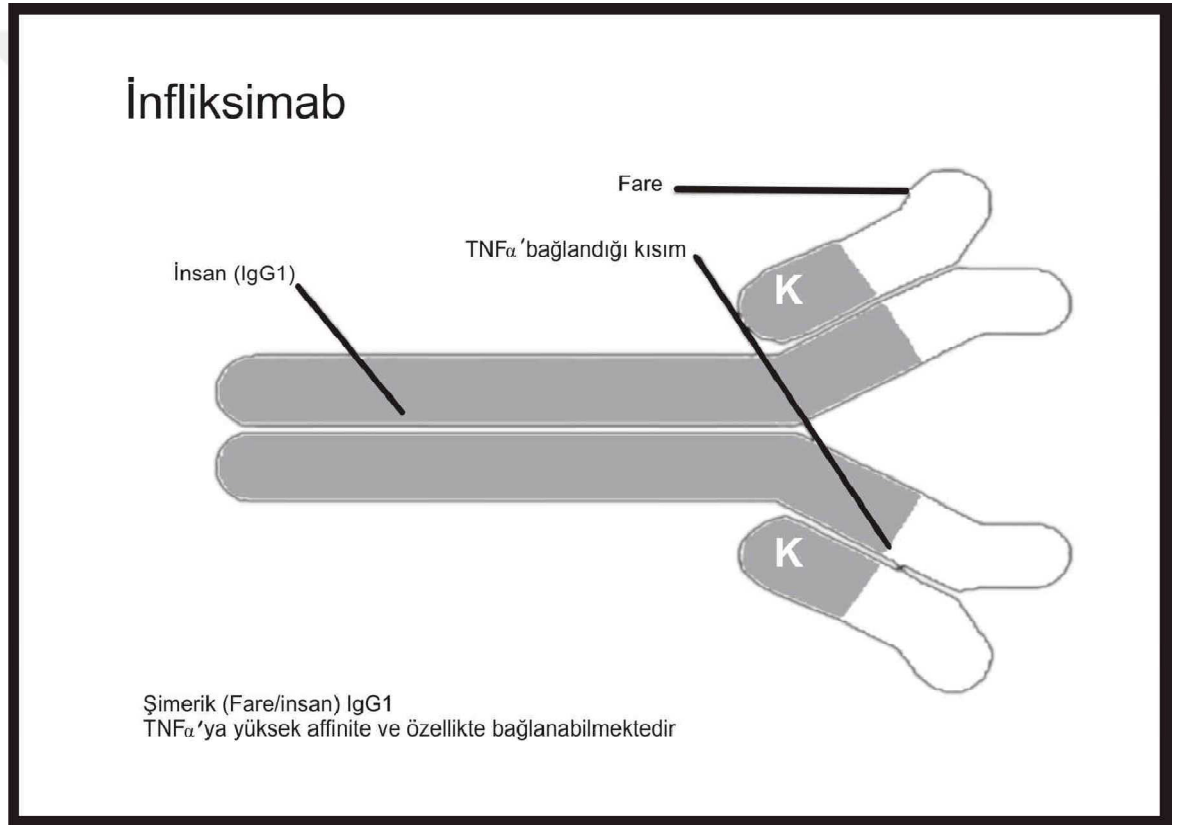
Kaya ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; deneysel tıkanma ikteri modelinde L-karnitin' in, meydana gelen akciğer hasarını azalttığı saptanmıştır (30). Gul ve ark.'nın çalışmasında deneysel tıkanma sarılığı modelinde meydana gelen akciğer hasarına karşı ellagic asidin koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (31).

Özdülger ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; çekum ligasyonu ve ponksiyonu sonrası sepsis modelinde meydana gelen akciğer apoptotik hasarında, bir antioksidan olan NAC (N-Asetil Sistein)'in koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla akciğer dokusunda MPO ve MDA seviyeleri nitrit /nitrat seviyeleri ölçülmüştür. Sonuç olarak antioksidan olan NAC' in endotoksemi ve sepsisli ratlarda akciğer dokusunda lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği, akciğer histopatolojisini koruduğu tespit edilmiştir (32). Bu çalışmalar ve diğerleri rehber alınarak deneysel TS modelinde; İnfliximab' in antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinden dolayı serbest oksijen radikallerine ve endotoksinlere bağlı oluşan akciğer hasarı üzerine etkinliğinin araştırılması için akciğer dokusunda ve kanda (serumda); TAS (Total Antioxidant Status), TOS (Total Oxidant Status), OSI (Oksidatif Stress Index), IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  bakılması planlandı.



## 2.3- İnfliximab

İnfliximab spesifik olarak tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) hedef alan bir şimerik IgG, monoklonal antikorudur ve %75 insan %25 murin proteininden oluşur. Murin bölümü TNF- $\alpha$ 'ya bağlanma bölgesini taşır, insan kısmı ise efektör fonksiyonlardan sorumludur. İnfliximab eriyik haldeki ve membrana bağlı TNF- $\alpha$ 'ya bağlanır ve TNF- $\alpha$ 'nın geniş bir alana yayılı biyolojik aktivitelerini inhibe eder. Genetik yöntemlerle oluşturulan bu antikor, insan TNF- $\alpha$ 'sına yüksek bir afinite, kuvvet ve spesifite ile bağlanır. Yüksek spesifite, diğer yollar üzerinde non-spesifik etkilerde bulunma potansiyelini azaltır (Şekil 1) (12).



Şekil 1. İnfliximab Molekül Özellikleri

### 2.3.1-Molekül Özellikleri

Murin-insan (şimerik) monoklonal antikorunu infliximab, insan TNF spesifik murin monoklonal antikorunun antijen bağlayan farklı bölgeleri (A2 olarak biçimlendirilen) ile insan IgG1k immünglobulinin sabit bölgelerinin biraraya gelmesiyle oluşmuştur. İnfliximabın yaklaşık molekül ağırlığı 149,000 daltondur.

Murin monoklonal antikor A2 TNF için yüksek afinite ve spesifite nedeniyle seçilmiştir.

İnfliximab hem doğal hem de rekombinan insan TNF- $\alpha$ 'nın sitotoksik etkilerini nötralize eder. İnflksimabın TNF- $\alpha$  için spesifitesi lenfotoksinin sitotoksik etkilerini nötralize edememesiyle doğrulanmıştır. İnflksimab ve rekombinan insan TNF'in bağlanma ölçümlerinden, infliximabın afinite sabitinin  $10^{10}$  M<sup>-1</sup> olduğu hesaplanmıştır. Benzer afinite sabiti, infliximabın transmembranöz TNF'e bağlanmasına dayanarak yapılan ölçümlerden de sağlanmıştır (33).

### 2.3.2- Etki Mekanizması

İnfliximab transmembran TNF- $\alpha$ 'yı ve yanısıra çözelti içindeki, eriyik halde bulunan TNF- $\alpha$ 'yı yüksek afiniteyle spesifik olarak bağlar ve TNF- $\alpha$ 'nın reseptörleriyle etkileşimini bloke ederek TNF- $\alpha$ 'nın biyolojik aktivitesini nötralize eder. Ek olarak infliximabın kompleman fiksasyonu ya da antikorbağımlı sitotoksisite (ADCC) yoluyla, TNF- $\alpha$  üreten hücrelerin lizisine neden olduğu, in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. İnfliximab TNF- $\alpha$ 'nın fonksiyonel aktivitesini insan fibroblastlarının, endotel hücrelerinin, nötrofillerin, B ve T lenfositlerin ve epitel hücrelerinin kullanıldığı çeşitli in vitro biyo ölçümlerde inhibe etmektedir (34).

## 2.4- Tıkanma Sarılığında İnflamatuvar Süreçte Yer Alan Sitokinler, Akut Faz Proteinleri ve Antioksidanlar

Tıkanma sarılığındaki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek bir çok sitokinlerin üretimini artırır. Tıkanma sarılıklı hastalarda bulunan nötrofillerde oksidatif cevabın arttığı ve buna bağlı olarak dolaşımdaki IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  gibi uyarıcı sitokinlerin arttığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir.

Kompleman fragmanları, radikal özellikli bileşikler ve sitokinler gibi uyarıcı ajanlarla aktive olan nötrofillerden; MPO, elastaz, proteaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimler hücre dışına salınır. Bu enzimlerin olumlu etkilerinin yanında doku hasarını artırıcı ve serbest radikal oluşturucu etkileride bulunmaktadır.

Ana safra kanalı bağlanmış deney hayvanlarında serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştıran glutatyon peroksidaz, katalaz ve superoksit dismutaz gibi enzimlerin aktivitesi azalır, böylece serbest oksijen radikallerinin oluşturacağı doku hasarına duyarlılık artar.

#### 2.4.1- Serbest Radikal Oluşumunu Önleyen Antioksidanlar

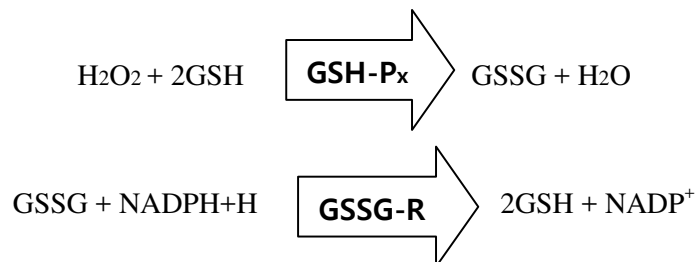
**Süperoksit Dismutaz**, süperoksit serbest radikalini, iki hidrojen iyonu ile reaksiyona sokarak hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür (35).



**Katalaz**, hücre içinde, peroksidomlar içinde yer alan bir antioksidan enzimdir. Hidrojen peroksidi, su ve oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler (36).



**Glutatyon peroksidaz**, hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. İntrasellüler lipidleri ve membran lipidlerini peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Tepkime sonucunda okside glutatyon (GSSG) oluşmaktadır. Oluşan okside glutatyon, glutatyon reduktazın (GSSG-R) etkisi ile tekrar glutatyona dönüşür (37).



#### 2.4.2- Sitokinler ve Akut Faz Proteinleri

**Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**, sitokin ailesi içerisinde yer alan polipeptid moleküllerdir. İnflamasyon sürecinde mononükleer fagositlerden ve T lenfositlerden sentez edilmektedir. Makrofajlardan sentezlenmesinde en kuvvetli uyarıcı

lipopolisakaritlerdir (LPS). T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) salgılayarak TNF- $\alpha$  salınımını artırırlar. TNF- $\alpha$ , inflamasyon bölgesine fagositer hücreleri çeker ve IL-1 salınımını artırır. Endotel hücrelerinden adezyon molekülü sentezini artırır ve kemokin salınımını düzenler. Yarılma ömrü 15-20 dk' dır. Koagulan mekanizmaları aktive edici etkisi mevcuttur. Eikozanoidlerin ve PAF'ın salınımını artırır (38).

**IL-6**, mononükleer fagositer hücreler, vasküler endotelial hücreler, fibroblastlar ve daha birçok hücre tarafından sentezlenir. IL-1 ve TNF-  $\alpha$ ' nın etkisi ile salgılanır ve bu sitokinlerle sinerjistik etkilere sahiptir. IL.6, inflamasyon sürecinde PMNL aktivasyonunu artırır ve PMNL aktivasyonuna sekonder uzak organ hasarını artırır (38).

**IL-8**, güçlü bir kemokin ajandır. Başlıca nötrofilleri aktive eder. IL-1 ve TNF-  $\alpha$ ' ya cevap olarak aktive olmuş makrofajlardan, endotelden ve fibroblastlardan salınır (38).

### **2.4.3-Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye, Oksidatif Stres İndeksi**

#### **2.4.3.1- Total Antioksidan Seviye/Status (TAS)**

Total antioksidan kapasiteyi gösterir. Normal koşullarda organizma, endojen ve eksojen serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücutta oluşan oksidan durumların tamponize edilmesinde kan çok önemli bir rol oynamaktadır. Kan, antioksidanların tüm vücuda dağıtılmasını sağlar (39).

TAS'a en büyük katkı plazmada bulunan antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest Fe' yi toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Albümin, ürikasit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin % 85' inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, indirgenmiş glutation (GSH), flavanoidler, alfa-tokoferol ve beta-karoten gibi antioksidan maddelerin miktarının albümin, ürik asit ve askorbik asit miktarından az olmasından kaynaklanmaktadır. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu

etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir antioksidan etki oluşmaktadır. Bu sinerjik etkiye örnek olarak; glutationun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesi verilebilir.

Total antioksidan seviyesinin ölçümü, antioksidanların tek tek seviyelerinin ölçümünden daha değerli bilgiler verir. Bu yüzden kanın antioksidan düzeyi durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (40, 41).

#### **2.4.3.2- Total Oksidan Seviye/Status (TOS)**

Oksidatif stres; vücudumuzda mevcut oksidatif-antioksidatif dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durumdur. Oksidatif stresin toplam değeri; total oksidatif stres veya total oksidan status/seviye (TOS) olarak ifade edilir. Bu fenomen, aşırı reaktif oksijen ve/veya nitrojen türlerinin üretimi veya antioksidan tampon mekanizmasının eksikliği sonucu oluşur. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri toksiktir ve hücrenin lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerine zarar verir. Damar endoteli de bu durumdan kısmen etkilenmektedir (42).

#### **2.4.3.3- Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)**

Total oksidanların seviyelerinin, total antioksidanların seviyelerine bölünmesiyle elde edilen oransal bir indekstir ve OSI değerinin yüksek olması oksidatif stresin arttığı durumlarda ortaya çıkar (43, 44).

$$\text{OSi (arbitrary unit)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol Trolox Eq/L})} \times 100 \quad (45)$$

### 3.MATERYAL VE METOD

#### 3.1- Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R)  
Derin dondurucu (Indesit, -20°C)  
Hassas terazi (Shimadzu AY220)  
Vorteks (Velp Scientifica ZX Classic)  
Otomatik pipetler (Brand transferpette)  
Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Labart SH-5)  
Homojenizatör (ika ultra turrax t25)  
Sonikatör (Bandelin Sonopuls)  
Microplate reader (Rayto RT 6000 microplate reader)  
Otomatik mikroplate yıkayıcı (Bio-tek Instruments, Inc., EL<sub>x</sub>50)  
IL-8 rat elisa kiti (Fine Test)  
IL-6 rat elisa kiti (Fine Test)  
TNF- $\alpha$  rat elisa kiti (Fine Test)  
Total Antioxidant Status Assay Kit (Sunred)  
Total Oxidant Status Assay Kit (Sunred)

#### 3.2- Çalışmanın Yürütüldüğü Laboratuvarlar ve Proje Desteği

Bu çalışmada TS modelinin oluşturulması, İnfliximab uygulaması ve hayvanların barındırılması Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Araştırma ve Uygulama Merkezi (DEHATAM)' nde gerçekleştirildi. Diğer deneysel uygulamalar ise SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütüldü. Çalışmamız SDÜ Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından 4727-TU2-16 proje numarası ile desteklendi.

#### 3.3- Deney Hayvanlarının Temini ve Seçimi

Deneysel çalışmamızda 7-10 aylık, 250-350 gram ağırlığında, 57 adet, sağlıklı, erkek, Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Tüm deney hayvanları, SDÜ

DEHATAM' dan temin edildi. Bu çalışma SDÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu' nun 07.01.2016 tarihli ve 04 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

### 3.4- Deney Hayvanlarının Bulunduğu Ortam Koşulları

Çalışmamızdaki tüm deney gruplarındaki hayvanlar  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında, rölatif nemi % 55 olan, 12 saat gündüz - 12 saat gece döngüsünün uygulandığı kontrollü odaya alındı. Çeşme suyu ve standart pellet yem (*ad libitum*) ile beslendi.

### 3.5- Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle üç farklı grup aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

**Grup 1: Laparotomi Kontrol (K) Grubu (SHAM Grubu) (n= 11);** 11 adet rattan oluşan kontrol grubu. Laparotomi yapılarak ana safra kanalı ortaya konulup batın kapatıldı.

**Grup 2: Tıkanma Sarılığı (T) Grubu (n=23);** 23 adet rattan oluşan TS oluşturulan grup. Laparotomi yapılarak ana safra kanalı ortaya konup 4/0 ipekle bağlanıp kesilerek TS oluşturuldu ve batın kapatıldı.

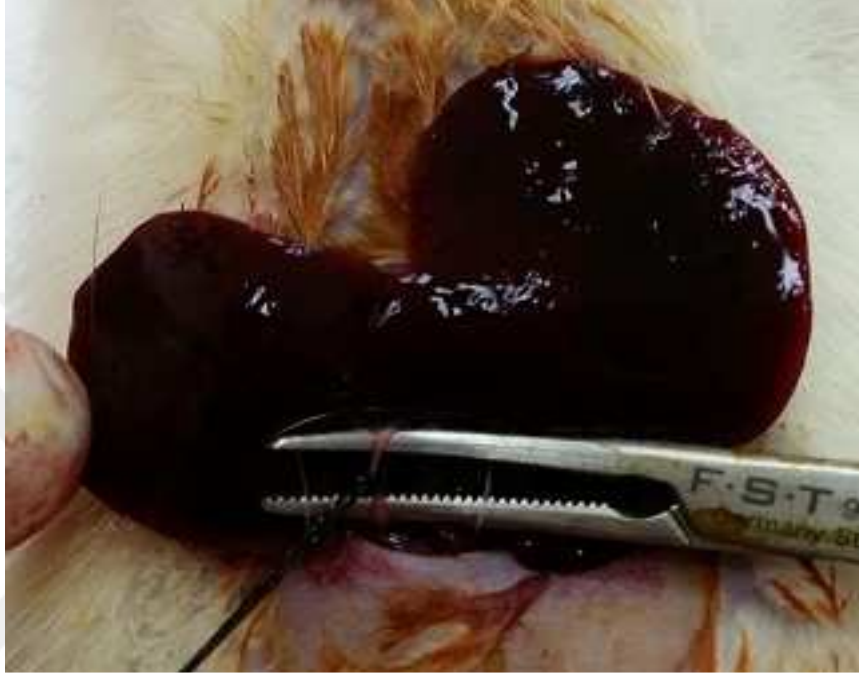
**Grup 3: Tıkanma Sarılığı + İnfliximab (T+İB) Grubu (n=23);** 23 adet rattan oluşan ve TS oluşturup 10 mg/kg/gün kuyruk veninden (i.v.) İnfliximab verilen grup.

### 3.6- Anestezi ve Cerrahi İşlem

Her üç gruba da yapılacak bütün cerrahi işlemler öncesi genel anestezi oluşturmak amacıyla sağ arka bacaklarından intramuskuler olarak 50 mg/kg ketamin HCL ve 15 mg/kg ksilazin HCL uygulandı. Anestezik etki başladıktan sonra tüm hayvanların batın bölgesindeki kılları tıraş edildi. Ratlar supin pozisyona getirildi ve ekstremiteler ile boynun üst kısmı hariç tutulmak şartıyla tamamen % 10 povidon iyot ile boyanarak dezenfekte edildi. Steril örtüler batın orta hattı açıkta kalacak şekilde örtülerek cerrahiye hazırlık tamamlandı.

Batında ksifoid çıkıntıdan aşağıya doğru uzanan yaklaşık 2- 2,5 cm'lik bir orta hat kesisi yapıldı. Mide ve pilor takip edilerek duodenum bulundu. Duodenum

hafifçe öne ve aşağı çekilerek karaciğer hilusundan duodenuma doğru uzanan ve ince bir tubuler yapı olarak izlenen ana safra kanalı görüldü. Ana safra kanalı, çevresindeki yağlı dokulardan tutularak asıldı ve ucu ince olan bir disektör ile diseke edilerek ortaya kondu. (Resim 1)



**Resim 1.** Ana safra kanalının diseksiyonu ve bağlanması.

K grubundaki ratlarda ana safra kanalı ortaya konduktan sonra batinları kapatıldı. T grubunda ve İnfliximab grubunda ise disektörle ana safra kanalı izole edildi ve 4/0 ipekle bağlanıp kesilerek TS oluşturuldu. İşlemler tamamlandıktan sonra her üç grupta da batin katları uygun olarak 3/0 prolenle kapatıldı.

### **3.7- Tedavi**

Bütün grupların örnekleme işlemine kadar istedikleri kadar standart fare yemi ve çeşme suyu almalarına izin verildi. Kontrol grubuna ve tıkanma sarılığı grubuna herhangi bir tedavi uygulanmadı. Diğer tıkanma sarılığı oluşturulan gruba, operasyondan sonra 7 gün süre ile günde bir kez, sabahlar, 10 mg/kg dozunda İnfliximab kuyruk veninden paranteral yoldan verildi.



### 3.8- Akciğer Dokusunun ve Kan Örneklerinin Alınması

Her üç gruba da çalışmanın 1. ve 7. gününde olacak şekilde iki kere laparotomi uygulandı.



**Resim 2.**Çalışmanın 7. gününde dilate ana safra kanalı.

Çalışmanın 7.gününde her üç gruptan; histopatolojik ve biyokimyasal analizler için akciğer dokuları, biyokimyasal analizler için ise vena kava inferiordan kan örnekleri alındı. Bu işlemleri takiben hayvanlar sakrifiye edildi.

### 3.9- Biyokimyasal Analizler

#### 3.9.1- Doku Homojenatı ve Serum Örneklerinin Hazırlanması

SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. laboratuvarında postoperatif 7. gününde alınan kan örnekleri jelli biyokimya tüplerine alınarak soğuk ortamda laboratuvara transfer edildi. Laboratuvarda pıhtılaşması tamamlanan kanlar, soğutmalı santrifüj cihazında (Nüve NF1200R,Türkiye) 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Böylece elde edilen serumlar her numuneden 4 porsiyon olacak şekilde porsiyonlanarak çalışma gününe kadar -20°C' de saklandı.

Ratlar sakrifiye edildikten sonra akciğer dokuları cam tüplere alınarak üzerlerine 10 mMpH 7,4 olan fosfat tamponu eklendi. Soğuk ortamda laboratuvara transfer edilen akciğer dokuları soğuk fosfat tamponu ile yıkanarak dokuların kan vb. artıklardan temizlenmesi sağlandı. Daha sonra hassas terazi ile ağırlıkları tartıldı ve 10 kat 10 mMpH 7,4 fosfat tamponu eklenerek homojenizasyon işlemine başlandı. Homojenizasyon işleminde dokular önce doku parçalayıcı ile (Janke&Kunkel IKA Ultra Turrax T25, Almanya) parçalandı, daha sonra ultrasonic homojenizatör ile (Bandelin Sonopuls HD 2070, Almanya) 30 sn sonike edildi. Elde edilen doku homojenatları, 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi (Nüve NF1200R, Türkiye), daha sonra süpernatantları eppendorf tüplerine her numuneden 4 örnek olacak şekilde porsiyonlanarak çalışma gününe kadar -20°C' de saklandı.

### **3.9.2- TAS (Total AntioxidantStatus) ve TOS (Total OxidantStatus) Düzeylerinin Analizi**

Serum ve doku örneklerinin TAS ve TOS düzeyleri RelAssayDiagnostics Marka kitlerle otoanalizörde (Beckman Coulter AU 680, Japonya) spektrofotometrik olarak çalışıldı.

TAS düzeyi çalışılırken numunede bulunan antioksidan maddeler, kit içindeki reaktiflerden biri olan koyu mavi-yeşil renkteki ABST radikal solüsyonunu renksiz forma redüklemiştir ve reaksiyon karışımının 660 nm deki absorbans değişimi ölçülmüştür. Absorbans değişimi, numunede bulunan TAS düzeyi ile doğru orantılıdır. Yöntem, stabil antioksidan standart solüsyonu (E vitamini analogu) Trolox Equivalent ile kalibre edilmiştir.

TOS düzeyi ölçümü için numunede bulunan oksidan maddeler, ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyon haline okside etmiştir. Ferrik iyon formu, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirmiştir. Renk oluşumu; numunedeki oksidan moleküllerin miktarı ile doğru orantılı olduğundan, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve TOS değeri elde edilmiştir. Yöntem, hidrojen peroksit ile kalibre edilmiştir.

Elde edilen TAS ve TOS değerleri kullanılarak OSi (Oxidative Stress Index) değerleri hesaplanmıştır.

OSi (arbitrary unit) =TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ ) / TAS ( $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ ) x 100  
(45)

### 3.9.3- TNF $\alpha$ , IL-6 ve IL-8 Düzeylerinin Analizi

Serum ve akciğer örneklerinin TNF  $\alpha$ , IL-6 ve IL-8 düzeylerinin analizi ELISA yöntemi ile, 'Fine Test' marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü (Wuhan Fine Biological Technology Co., Ltd., C6-323 Biolake, No.666 Gaoxin AVE. Eastlake High-tech Development District, Wuhan, China). Mikroplate 2 okutma için Rayto RT 6000 Microplate Reader (Çin) kullanıldı. Her bir parametre için 7 standart solüsyonu kullanılmıştır. Standart-absorbans grafiği elde edilmiş, her bir parametre için numunelerin konsantrasyonu bu grafik kullanılarak saptanmıştır. Standartlar ve numuneler duplike çalışılmıştır. TNF  $\alpha$ , IL-6 ve IL-8 için hassasiyet sınırları sırasıyla; <9.375 pg/ml, <37.5pg/ml ve <9.375 pg/ml'dir.

### 3.10-Patolojik Değerlendirme

Formaldehid solüsyonunda fikse edilen akciğere ait doku örnekleri 5 mm' lik parçalara bölünerek histopatolojik inceleme için, standart laboratuvar takiplerinden sonra parafine gömülerek 5 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlandı ve hemotoksilen-eozin ile boyandı. Dokuların histopatolojik incelemesi, örneklerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen tek bir patolog tarafından yapıldı. Gerek kontrol gerekse tıkanma sarılığına ait preparatlar ışık mikroskopi ile incelenerek akciğer dokusunda histopatolojik değerlendirme için Özdülger ve ark' nın yayınında belirtilmiş olduğu şekilde doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanılmıştır. Bu ölçekte:

**Grade 1:** Normal akciğer histolojisi

**Grade 2:** Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu

**Grade 3:** Orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında kısmi destrüksiyon

**Grade 4:** Yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu, pulmoner yapıda tam destrüksiyonu tanımlar.

### 3.11- İstatistiksel Analizler

Gruplardaki denek sayılarının belirlenmesinde Güç Analizi (Power Analysis) kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS 22 programı kullanılarak yapılmış olup, çalışmada kullanılan değişkenler olan TNF- $\alpha$  serum, TNF- $\alpha$  doku, IL-6 serum, IL-6 doku, IL-8 serum, IL-8 doku, TAS serum, TAS doku, TOS serum, TOS doku, OSI serum ve OSI doku değerlerinin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi ve normal dağılıma uymadıkları (Kolmogorov-Smirnov testi  $p < 0,05$ ) görüldü. Grup sayıları  $n < 30$  olduğundan parametrik testlerin ön şartları sağlanamamıştır. Bu nedenle analizlerde parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Bağımsız üç grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasında farklılık belirlenmesi halinde Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak iki grup arasındaki farklar incelenmiş ve farkın hangi gruptan kaynaklandığı belirlenmiştir. Bonferroni düzeltmesinde istatistiksel anlamlılık değeri  $p$ , karşılaştırma sayısına (3) bölünerek belirlenmiş ve  $p < 0,016$  olan değerler anlamlı farklı kabul edilmiştir. Patolojik evrenin gruplara göre farklı olup olmadığı Ki-Kare (Chi-Square) testi ile analiz edilmiştir ve istatistiksel anlamlılık değeri  $p < 0,05$  kabul edilmiştir. Non-parametrik testler, ortanca (median) üzerinden analiz yaptıklarından değerlerin dağılım ölçütü olarak ortanca (median) (En küçük değer [min]-En büyük değer [maks]) olarak sunulmuştur.  $p$  değerinin 0,001' den küçük olduğu durumlar  $p < 0,001$  olarak verilmiştir.

## 4.BULGULAR

### 4.1- Biyokimyasal Bulgular

Tablo 1' de biyokimyasal parametrelerin median değerleri görülmektedir.

**Tablo 1.** Verilerin gruplara göre median (min-maks) değerleri.

Tablo-1	Grup 1 (Kontrol Grubu) (n=11) Median (Min-Maks)	Grup 2 (Tıkanma Grubu) (n=23) Median (Min-Maks)	Grup 3 (İnfliximab Grubu) (n=23) Median (Min-Maks)
TNF- $\alpha$ (Serum)	47,9 (25,2-67,1)	56,7 (24,5-165,8)	42,6 (23,6-92,8)
TNF- $\alpha$ (Doku)	104,1 (65,4-199,9)	96,5 (49,6-140,1)	98 (63,6-196,6)
IL-6 (Serum)	257,5 (227,3-348,4)	274,5 (214,2-531,6)	295,4 (214,2-521)
IL-6 (Doku)	885 (685,5-1568,7)	840,1 (287,9-1310,3)	1000 (681,3-1285,7)
IL-8 (Serum)	60 (18,2-122,5)	87,3 (17,3-248,6)	42,7 (1,2-100,8)
IL-8 (Doku)	78 (43,9-177,9)	63,4 (30,9-139,8)	79 (49,4-176,5)
TAS (Serum)	2,3 (1,2-3,2)	1,6 (1,2-2,4)	2,1 (1,2-2,8)
TAS (Doku)	1,3 (1,1-1,4)	1,1 (1-1,4)	1,1 (0,8-1,4)
TOS (Serum)	21 (9,9-42,4)	11,2 (5,9-113,9)	23,4 (8,8-225,8)
TOS (Doku)	30,1 (13,8-49,1)	23,7 (11,9-34,8)	26,4 (16,6-41,1)
OSI (Serum)	0,8 (0,4-1,9)	0,8 (0,3-5)	1,6 (0,5-14,3)
OSI (Doku)	2,4 (1,1-3,9)	2,1 (0,9-3)	2,5 (1,7-3)

Tüm gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis testi ile çalışıldı ( $p<0,05$ ). Grupların kendi arasındaki istatistiksel değerlendirme ise Mann-Whitney U testi ile yapıldı ( $p<0,016$ ). Bu karşılaştırmalar ve p değerleri tablo 2' de gösterilmiştir. Bu sonuçlara baktığımızda Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında TAS (Serum) açısından, Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında TAS (Doku), OSI (Serum) açısından, Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında IL-6 (Doku), IL-8 (Serum), TOS (Serum), OSI (Doku) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü.

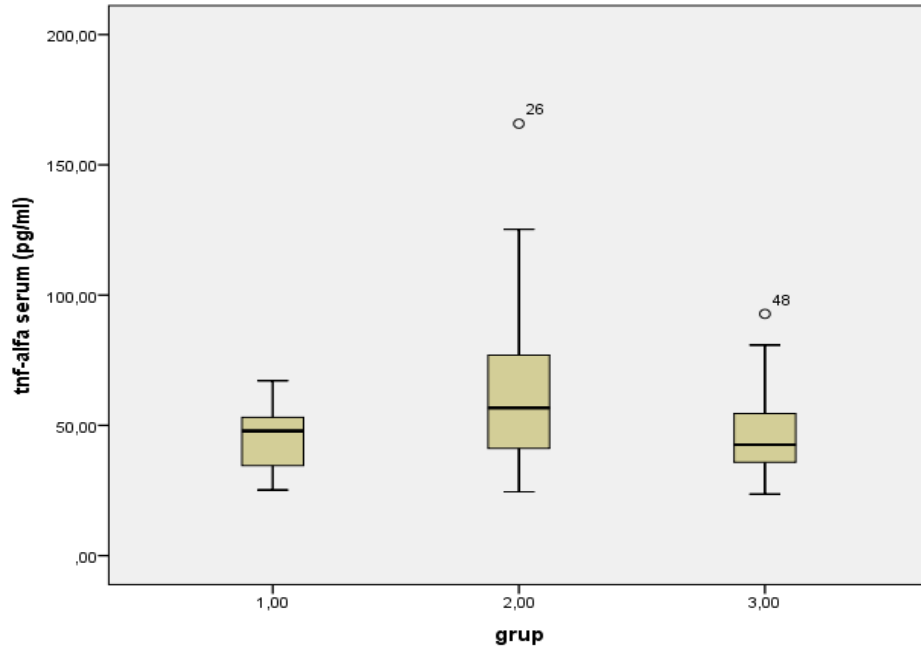
**Tablo 2.** Grupların birbirleriyle karşılaştırılmaları ve p değerleri.

Tablo 2	Tüm gruplar arası fark Kruskal-Wallis P	Grup 1-2 arası fark Mann-Whitney U p	Grup 1-3 arası fark Mann-Whitney U p	Grup 2-3 arası fark Mann-Whitney U p
TNF- $\alpha$ (Serum)	0,086	0,084	0,971	0,052
TNF- $\alpha$ (Doku)	0,503	0,445	0,214	0,818
IL-6 (Serum)	0,327	0,403	0,143	0,461
IL-6 (Doku)	0,055	0,424	0,383	<b>0,014</b>
IL-8 (Serum)	<b>0,012</b>	0,084	0,537	<b>0,004</b>
IL-8 (Doku)	0,077	0,153	1000	0,029
TAS (Serum)	<b>0,007</b>	<b>0,005</b>	0,243	0,018
TAS (Doku)	<b>0,015</b>	0,038	<b>0,007</b>	0,141
TOS (Serum)	<b>0,012</b>	0,214	0,143	<b>0,004</b>
TOS (Doku)	0,279	0,326	0,744	0,121
OSI (Serum)	<b>0,021</b>	0,885	<b>0,015</b>	0,019
OSI (Doku)	<b>0,026</b>	0,637	0,424	<b>0,003</b>

(Kruskal-Wallis testi için  $p < 0,05$  olan değerler, Mann-Whitney U testi için  $p < 0,016$  olan değerler anlamlı farklı kabul edilmiştir)

#### 4.1.1- TNF- $\alpha$ (Serum)

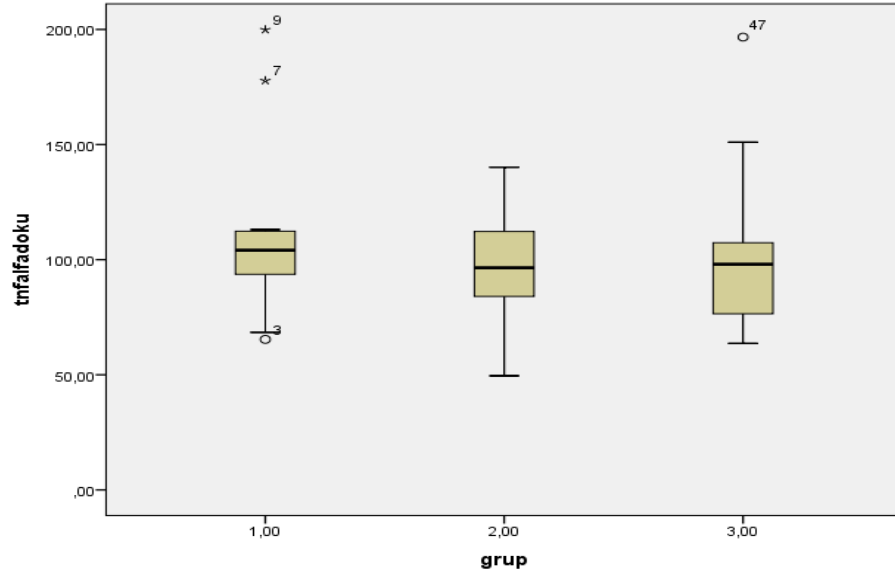
TNF- $\alpha$  (Serum) sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 1)



**Grafik 1.** TNF- $\alpha$  (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.2- TNF- $\alpha$ (Doku)

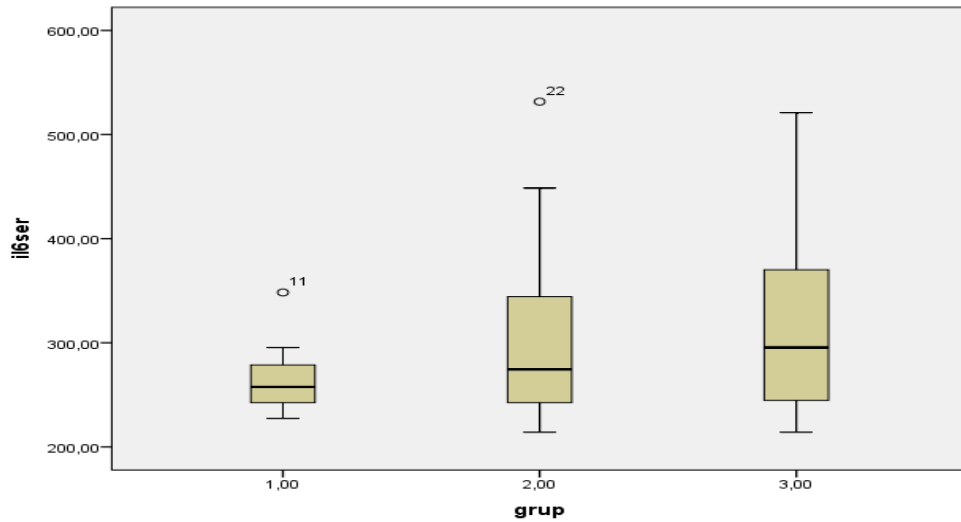
TNF- $\alpha$  (Doku) sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 2)



**Grafik 2.** TNF- $\alpha$  (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.3- IL-6 (Serum)

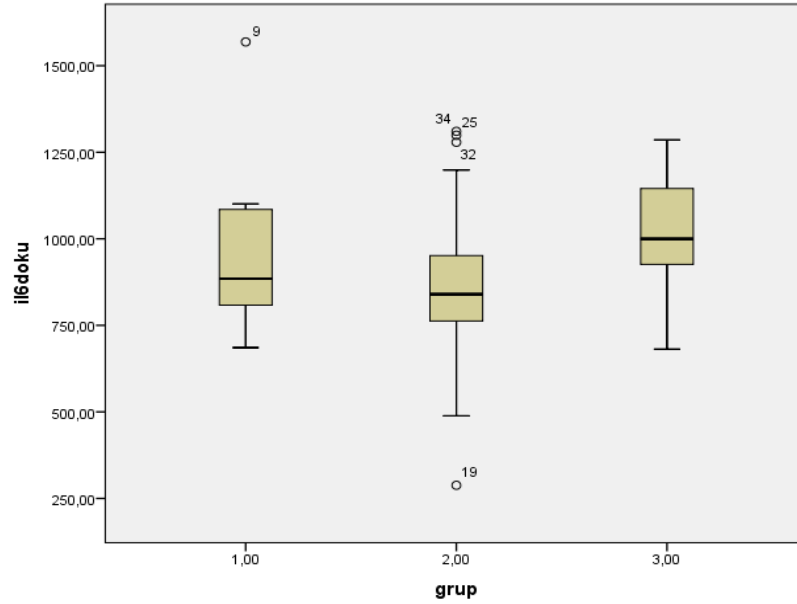
IL-6 (Serum) sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 3)



**Grafik 3.** IL-6 (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.4- IL-6 (Doku)

IL-6 (Doku) sonuçlarını karşılaştırdığımızda Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında ve Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk (Tablo 2, Grafik 4).

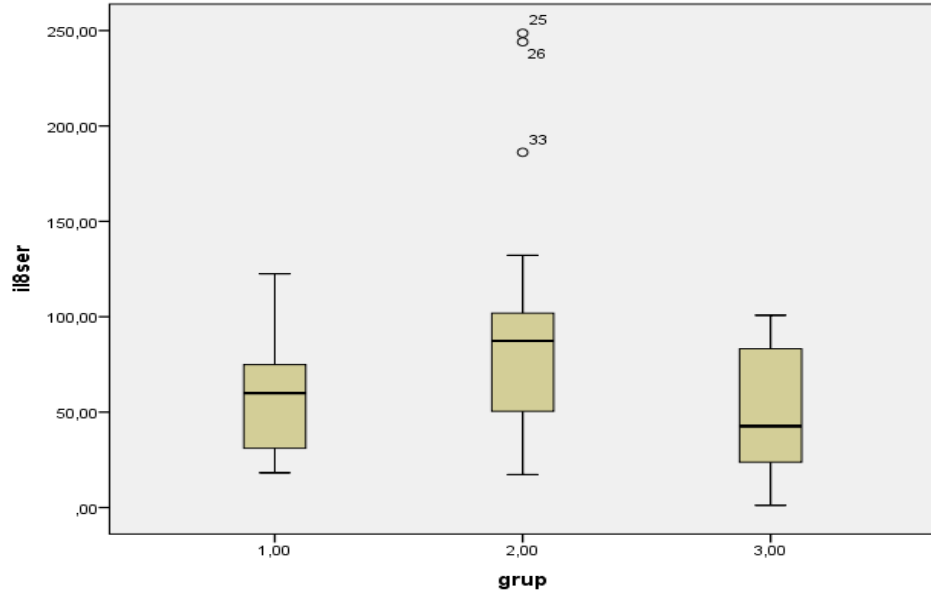


**Grafik 4.** IL-6 (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.5- IL-8 (Serum)

IL-8 (Serum) sonuçlarını karşılaştırdığımızda Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında ve Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk (Tablo 2, Grafik 5).

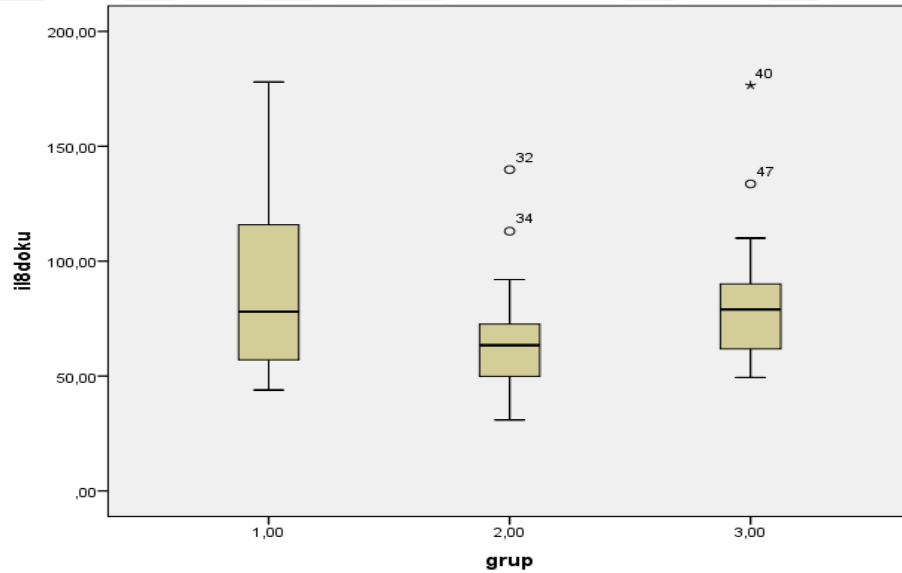




**Grafik 5.** IL-8 (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.6- IL-8 (Doku)

IL-8 (Doku) sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 6)

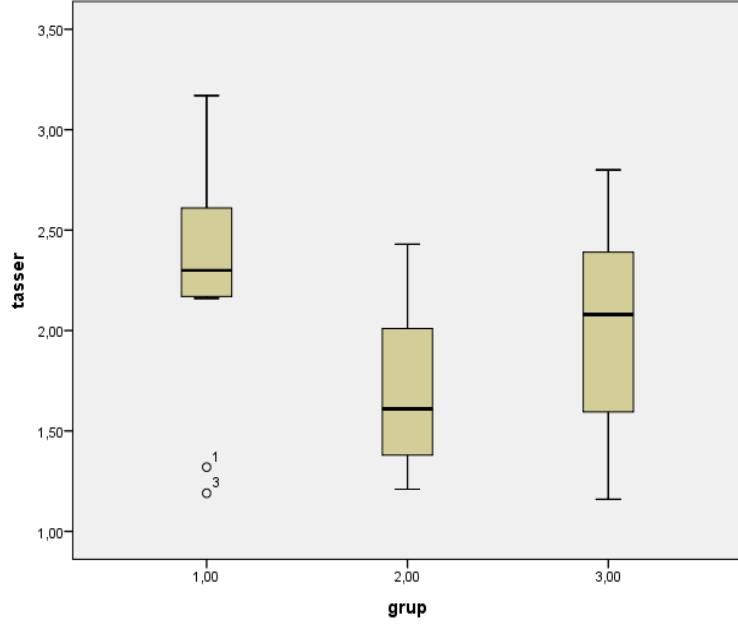


**Grafik 6.** IL-8 (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.7- TAS (Serum)

TAS (Serum) sonuçlarının karşılaştırılmasında Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3

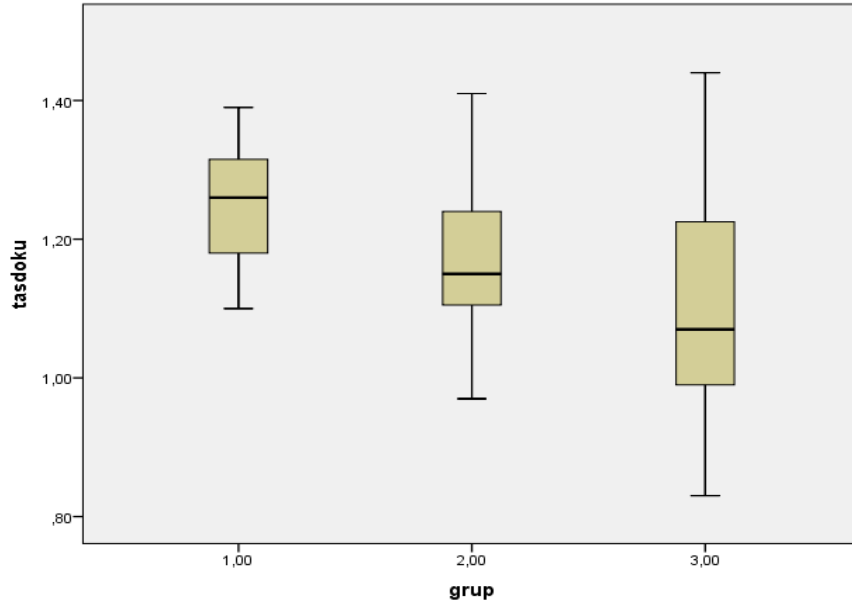
(İnfliximab Grubu) arasında ve Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık (Tablo 2, Grafik 7).



**Grafik 7.** TAS (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.8- TAS (Doku)

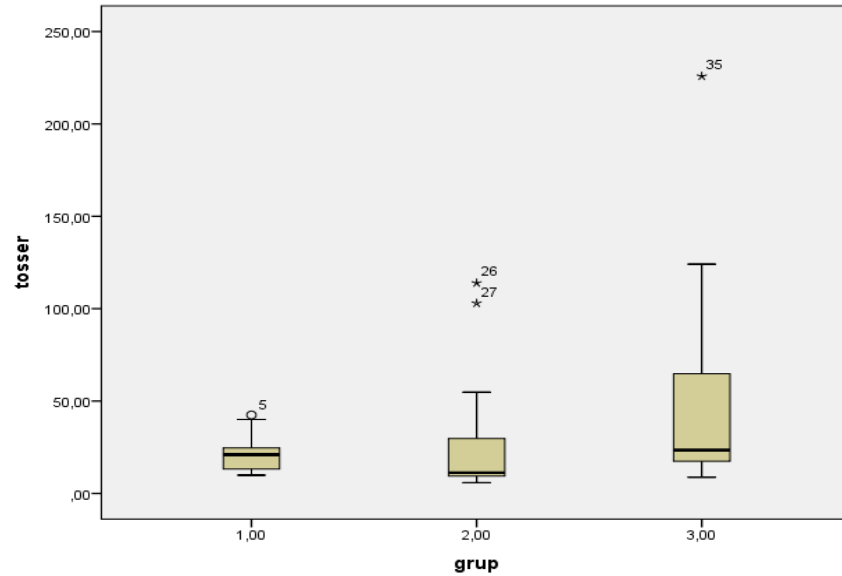
TAS (Doku) sonuçlarını karşılaştırdığımızda Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında ve Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk (Tablo 2, Grafik 8).



**Grafik 8.** TAS (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.9- TOS (Serum)

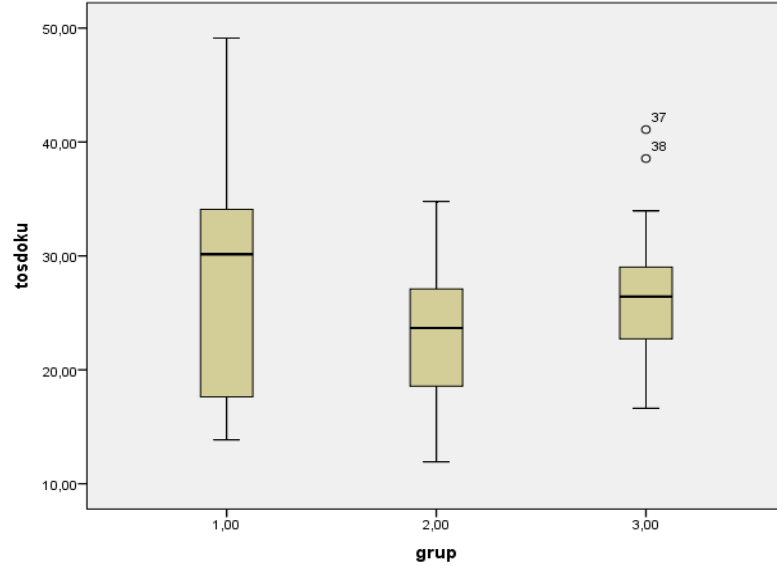
TOS (Serum) sonuçlarını karşılaştırdığımızda Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında ve Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk (Tablo 2, Grafik 9).



**Grafik 9.** TOS (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.10- TOS (Doku)

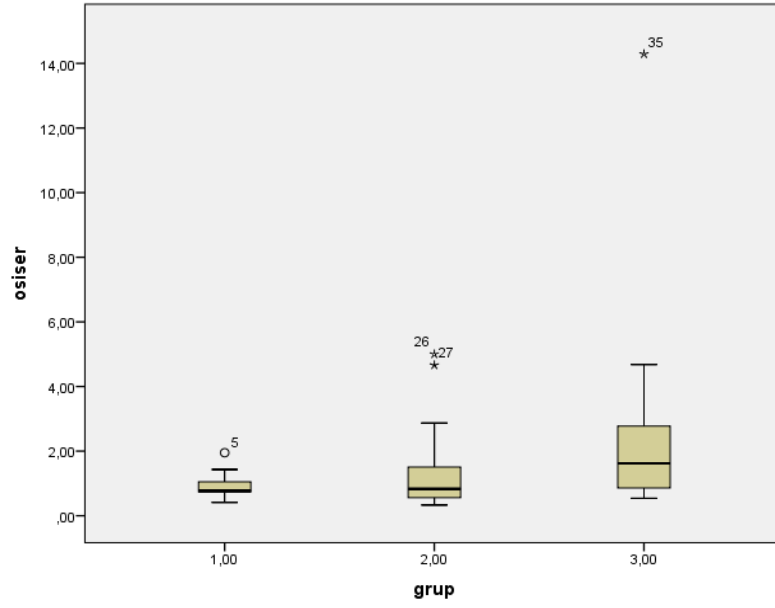
TOS (Doku) sonuçlarını karşılaştırdığımızda her 3 grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. (Tablo 2, Grafik 10)



**Grafik 10.** TOS (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.11- OSI (Serum)

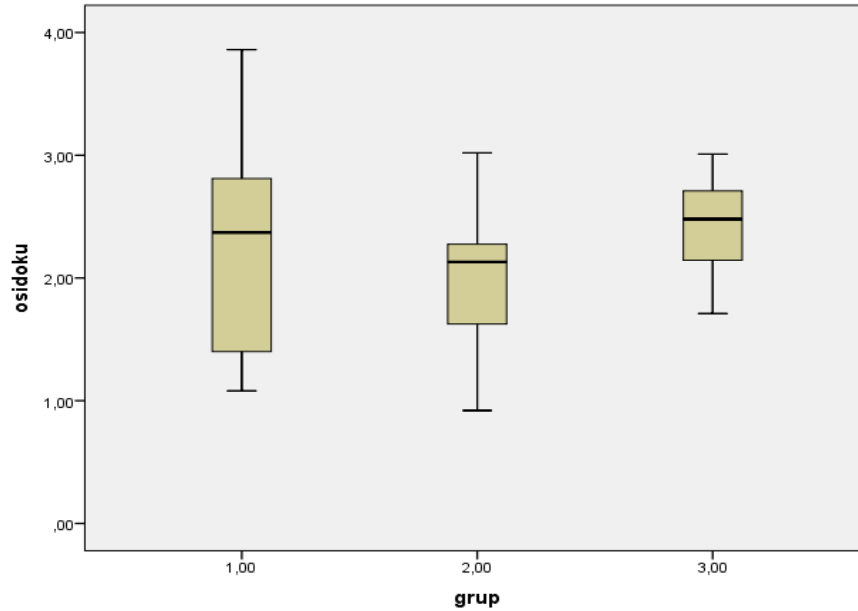
OSI (Serum) sonuçlarını karşılaştırdığımızda Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında ve Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk (Tablo 2, Grafik 11).



**Grafik 11.** OSI (Serum) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

#### 4.1.12- OSI (Doku)

OSI (Doku) sonuçlarını karşılaştırdığımızda Grup 1 (K Grubu) ile Grup 2 (T Grubu) arasında ve Grup 1 (K Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık. Grup 2 (T Grubu) ile Grup 3 (İnfliximab Grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulduk (Tablo 2, Grafik 12).



**Grafik 12.** OSI (Doku) median değerlerinin gruplar arası dağılımı.

## 4.2- Histopatolojik Bulgular

AC histopatolojik değerlendirme için Özdülger ve ark.'nın (32) yayınında belirtmiş olduğu şekilde doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanılmıştır. Bu ölçekte:

**Grade 1;** Normal akciğer histolojisi

**Grade 2;** Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu

**Grade 3;** Orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında kısmi destrüksiyon

**Grade 4;** Yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu, pulmoner yapıda tam destrüksiyon tanımlar.

Her üç grupta ratların akciğer dokuları histopatolojik inceleme sonucunda:

Kontrol grubunun 8'inde (% 72,7) akciğer histopatolojisi grade 1 (normal akciğer histolojisi), 3'ünde (% 27,3) akciğer histopatolojisi grade 2 (hafif derecede alveolar nötrofil lökosit infiltrasyonu) olarak değerlendirildi.

Tıkanma sarılığı grubunun 14'ünde (% 60,9) akciğer histopatolojisi grade 2 (hafif derecede alveolar nötrofil lökosit infiltrasyonu), 3'ünde (% 13) akciğer histopatolojisi grade 3 (orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında kısmi destrüksiyon), 6'ında (% 26,1) akciğer histopatolojisi grade 4 (yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu, pulmoner yapıda tam destrüksiyon) olarak değerlendirildi.

İnfliximab verilen tıkanma sarılığı grubunda 5'inde (% 21,7) akciğer histopatolojisi grade 1 (normal akciğer histolojisi), 11'inde (% 47,8) akciğer histopatolojisi grade 2 (hafif derecede alveolar nötrofil lökosit infiltrasyonu), 4'ünde (% 17,4) akciğer histopatolojisi grade 3 (orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında kısmi destrüksiyon), 3'ünde (% 13) akciğer histopatolojisi grade 4 (yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu, pulmoner yapıda tam destrüksiyon) olarak değerlendirildi.

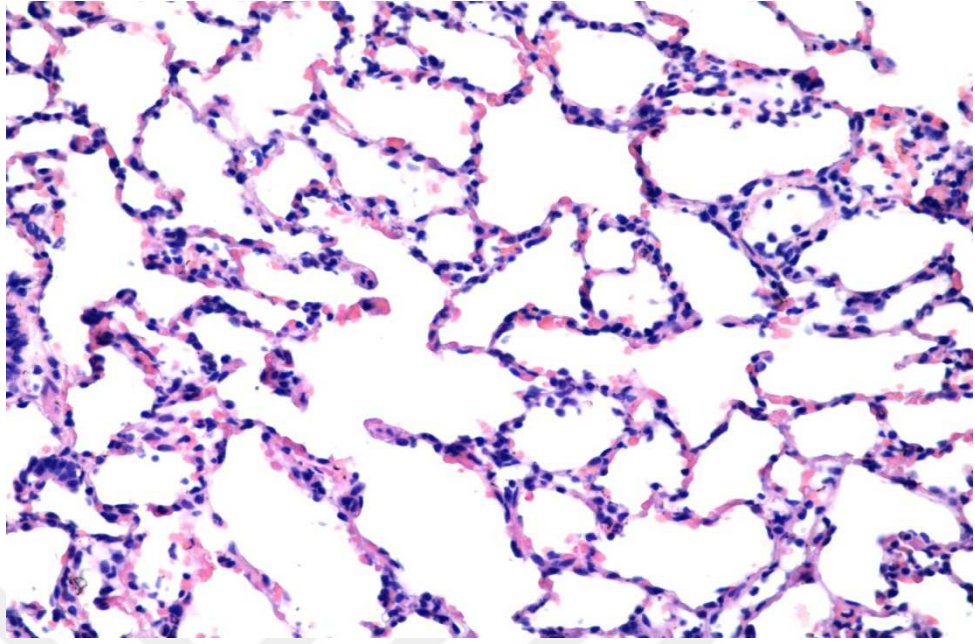
**Tablo 3.** Grupların histopatolojik bulgularının vaka sayılarına göre değerlendirilmesi.

Tablo 3	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Total
Grup 1 (n=11)	8 (% 72,7)	3 (% 27,3)	0 (% 0,0)	0 (% 0,0)	11 (% 100)
Grup 2 (n=23)	0 (% 0,0)	14 (% 60,9)	3 (% 13)	6 (% 26,1)	23 (% 100)
Grup 3 (n=23)	5 (% 21,7)	11 (% 47,8)	4 (% 17,4)	3 (% 13)	23 (% 100)
Total	13 (% 22,8)	28 (% 49,1)	7 (% 12,3)	9 (% 15,8)	57 (% 100)

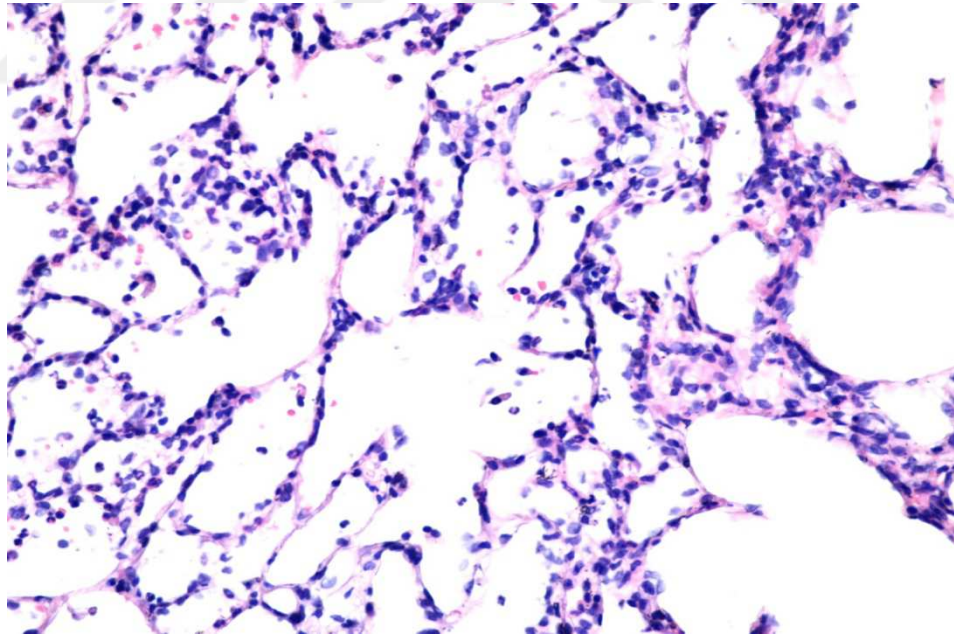
Kontrol grubu ile tıkanma ikteri oluşturulan her iki grup karşılaştırıldığında nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında destrüksiyonun tıkanma ikteri gruplarında belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı. Tıkanma sarılığı oluşturulan iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında infliximab verilen grubun histopatolojik değerlendirmesinde diğer gruba göre, nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu, akciğer yapısında destrüksiyonun daha az geliştiği gözlemlendi. Ancak iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı.

**Tablo 4.** Histopatolojik bulguların istatistiksel karşılaştırılması (Gruplar arası patolojik evre farkı tablosu,  $p < 0,05$ )

Tablo 4	Ki-Kare ( $X^2$ ) değeri	p değeri
Grup 1-2	22,711	<b>0,001</b>
Grup 1-3	9,171	<b>0,027</b>
Grup 2-3	6,503	0,090

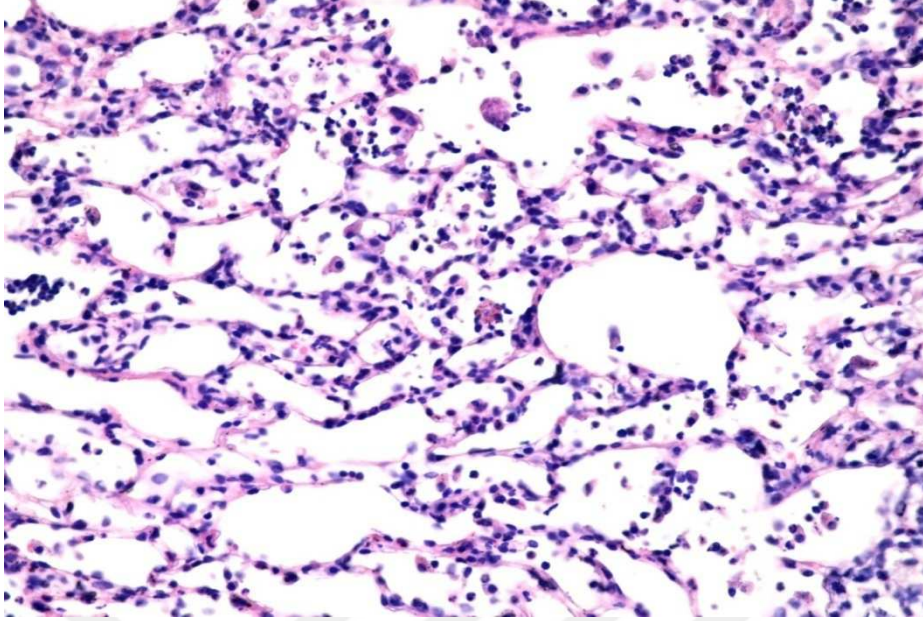


**Resim 3.** Normal akciğer parankimine ait morfolojik görünüm (HEx400)

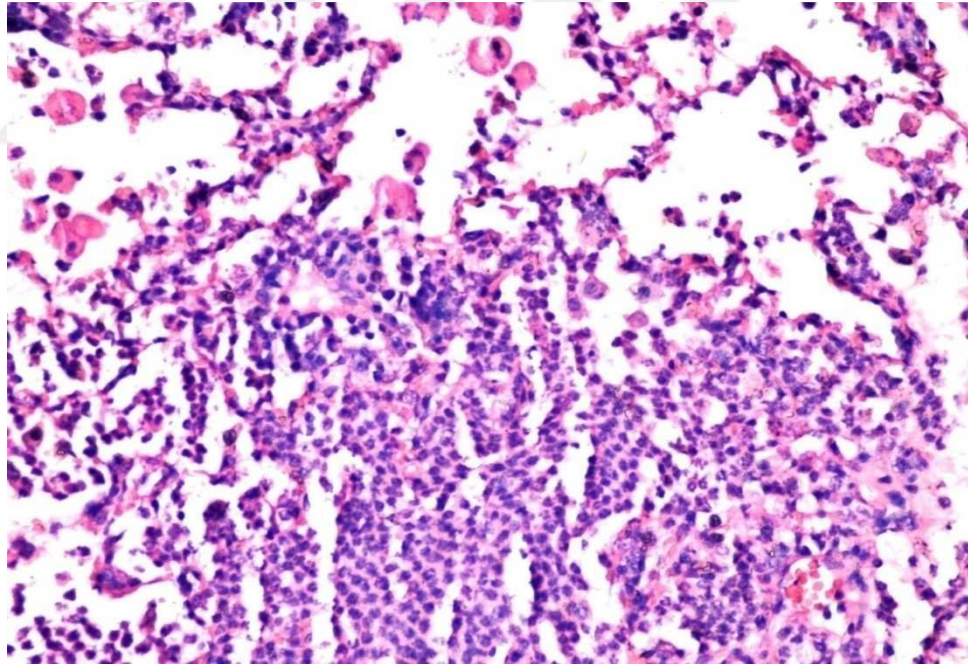


**Resim 4.** Alveol duvarlarında ve lümeninde seyrek nötrofil lökosit infiltrasyonu (HEx400)





**Resim 5.** Alveol duvarlarında ve lümeninde orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu ve parankimde kısmi destrüksiyon (HEEx400)



**Resim 6.** Akciğer parankiminde tam destrüksiyon, yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu, abse oluşumu (HEEx400)

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; tıkanma sarılığı AC hasarına neden olmaktadır, İnfliximab oluşan bu AC hasarını histopatolojik olarak düzeltmektedir. Tıkanma sarılığında gelişen akciğer hasarını önlemede antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği olan İnfliximab' ın bazı biyokimyasal parametreler açısından etkinliği vardır, fakat istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bu etkinlik gösterilememiştir. Histopatolojik etkinliği de gözlenmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak gösterilememiştir.

Tıkanma sarılığındaki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek bir çok sitokinlerin üretimini artırır. Papakostas ve ark. (3) tavşanlarda yaptıkları bir çalışmada, tıkanma sarılığı olan tavşanlarda yüksek sıklıkla portal ve sistemik endotoksinemi, GIS' e safra tuzu akışının olmaması nedeniyle artmış endotoksinin bağırsak lümeninden portal ve sistemik dolaşıma geçmesini kolaylaştırdığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda TS olan ratların akciğer histopatolojisinde TS olmayan ratlara oranla artmış nötrofil lökosit infiltrasyonu tespit ettik. İnfliximab, artmış nötrofil infiltrasyonunu azaltarak oluşmuş AC hasarını azaltmaktadır.

Jiang ve arkadaşları tıkanma sarılıklı hastalarla yaptıkları klinik bir çalışmada dolaşımdaki nötrofillerin oksidatif cevaplarını ölçmüşler ve oksidatif cevabın kontrol grubuna göre sarılıklı hastalarda arttığını bulmuşlardır. Kanda IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  gibi uyarıcı sitokinler yüksek bulunmuş ve bu sitokinler aracılığıyla nötrofillerin oksidatif cevabının arttığı düşünülmüştür (28). Endotoksemnin TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu yapılan birçok araştırma sonucunda bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 gibi inflamasyon şiddetini gösteren sitokinlerin serum ve doku düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırması yapıldı. Çalışmamızda; TNF-  $\alpha$  serum ölçümlerinde; her üç grup arasında sayısal farklılık olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadık. Bu durum İnfliximab'ın anti-TNF-alfa etkinliğini göstermekle beraber istatistiksel anlamlı fark oluşmaması, grupların örneklem büyüklüklerinin istatistiksel anlamlı fark oluşturacak boyutta olmamasına

bağlanabilir. Doku düzeyinde ise hem rakamsal hem de istatistiksel fark oluşmamıştır. Bu ise, tıkanma sarılığının (deneyde 7 gün) doku düzeyinde TNF alfa düzeyini yükseltecek kadar bir süre olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

IL-6 serum düzeylerinde anlamlı fark oluşmaması da, grupların örneklem büyüklüklerinin istatistiksel anlamlı fark oluşturacak boyutta olmamasına bağlanabilir.

IL-6 doku ölçümlerinde; grup 2 (T grubu) ile grup 3 (İnfliximab grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı, Grup 2 ile grup 3 arasındaki istatistiksel farkı oluşturan IL-6 (doku) değerleri beklediğimiz tersine grup 3' te daha yüksek bulundu. Oysa ki infliximab' ın etkinliği sonucu grup 3' te IL-6 (doku) düzeylerinin grup 2' ye göre daha düşük olmasını beklerdik. Bu sonucu bilimsel olarak yorumlayabilme olanağı yoktur.

IL-8 serum ölçümleri dikkate alındığında, grup 2 (T grubu) ile grup 3 (İnfliximab grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı, İnfliximab verilen Grup 3' teki median IL-8 (serum) değeri, ilaç almayan grup 2' deki median değerden düşük bulundu. Bu da infliximab' ın etkinliğini destekleyen bir sonuç olarak karşımıza çıktı. Yani, infliximab, IL-8 düzeyini azaltarak antisitokin etkinliği ile organ hasarını azaltmaktadır.

IL-8 doku düzeylerinde anlamlı fark oluşmaması, yukarıda belirtildiği gibi, tıkanma sarılığının (deneyde 7 gün) doku düzeyinde IL-8 düzeyini yükseltecek kadar bir süre olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Karakoç ve arkadaşları, ankilozan spondilitli hastalarda yaptıkları bir klinik araştırmada serum total oksidan ve antioksidan seviyelerini, oksidatif stres indekslerini ölçmüşler ve ankilozan spondilitli hastalarda kontrol grubuna göre serum TOS ve OSI değerlerinin daha yüksek, TAS değerlerinin ise daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Bunu da; artmış oksidan seviyeleri ve azalmış antioksidan seviyelerinin, yoğun oksidatif strese maruziyetin bir sonucu olduğunun kanıtı olarak değerlendirmişlerdir (46).

Çalışmamızda TAS Serum ölçümlerinde; grup 1 (Kontrol grubu) ile grup 2 (T grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Grup 1' de grup 2' ye göre TAS Serum değerleri beklediğimiz gibi daha yüksek bulundu, fark istatistiksel olarak

da anlamlıydı. İnfliximab verilen grup 3' teki değerlerin ilaç almayan grup 2' den yüksek olduğunu gözlemledik. İnfliximab, istatistiksel olarak gösterilememiş olsa da, serum TAS seviyesini artırarak, antioksidan etkinlik göstermektedir.

TAS Doku ölçümlerinde; grup 1 (Kontrol grubu) ile grup 3 (İnfliximab grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Grup 1' de en yüksek TAS (doku) değerlerinin olması beklediğimiz bir durumdu, fakat grup 3' teki TAS (doku) değerlerinin grup 2' den yüksek olmasını bekliyorduk ki bu gerçekleşmedi. Bunu da; deneyimizdeki tıkanma sarılığı süresinin, TAS (doku) düzeyini yükseltecek kadar yeterli bir süre olmadığı şeklinde yorumladık.

TOS Serum ölçümlerinde; grup 2 (T grubu) ile grup 3 (İnfliximab grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı, Saptanan istatistiksel farkı oluşturan değerler beklediğimiz doğrultuda değil; tam tersine TOS (serum) değeri en yüksek grup 2' de olması gerekirken, aksine en düşük değerler bu grupta saptandı. Bu sonucu bilimsel olarak yorumlayabilme olanağı yoktur.

TOS Doku düzeylerinde anlamlı fark oluşmaması da; deneyimizdeki tıkanma sarılığı süresinin, TOS (doku) düzeyini yükseltecek kadar yeterli bir süre olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

OSI serum ve doku ölçümlerinde; Grup 2' de yüksek bulmayı beklediğimiz OSI serum ve doku değerleri en düşük bu grupta saptandı. Grup 3' te ise en yüksek değerler saptandı. İlaç verilen grup 3' te, ilaç verilmeyen grup 2' ye nazaran daha düşük değerler bulmayı beklerken bu sonuca ulaşamadık. Bu sonucu da bilimsel olarak yorumlayabilme olanağı yoktur.

Yapılan birçok çalışmada tıkanma sarılığı modelinin bir sepsis modeli olduğu ve multiple organ hasarı ile sonuçlandığı bilinmektedir (3, 4, 5). Çalışmamızda İnfliximab' ın tıkanma sarılığında akciğer hasarına etkisini, histopatolojik olarak da değerlendirdik. Akciğer dokusunda histopatolojik değerlendirme için Özdülger ve ark. 'nın yayınında belirtmiş olduğu şekilde doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanıldı (32). Kurt ve arkadaşlarının, infliximabın metotreksata bağlı akciğer hasarı üzerine koruyucu etkisi konulu çalışmalarında metotreksata bağlı akciğer hasarı meydana getirilen iki grup arasında infliximab verilen grubun histopatolojik bulgularının, ilaç verilmeyen gruba göre daha iyi olduğu, daha az hasar gözlendiği

belirtilmiştir (47). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre tıkanma sarılığı oluşturulan iki grupta infliximab verilen grubun histopatolojik grade dağılımının ilaç verilmeyen gruba göre çok az fark olmak üzere daha iyi olduğunu söylemek mümkün olsa da bu farkı istatistiksel olarak anlamlı bulmak mümkün olmamıştır. Bunu da şöyle açıklamak mümkündür ki; istatistiksel anlam oluşmaması, grupların örneklem büyüklüklerinin istatistiksel anlam oluşturacak boyutta olmamasına bağlanabilir.



## 6. SONUÇLAR

Tıkanma sarılığında İnfliksimab' ın akciğer hasarı üzerine olan etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada varılan sonuçlar şöyle özetlenebilir;

1. Tıkanma sarılığına bağlı akciğer hasarı oluşmaktadır.
2. Bu akciğer hasarının gelişmesinde; lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ve nötrofil migrasyonu etkilidir.
3. İnfliximab, TS ile artmış TNF-alfa serum değerini azaltarak, antisitokin etkinlik göstermektedir. Böylece antinflamatuar etki göstererek AC hasarını azaltmaktadır.
4. İnfliximab, serum IL-8 düzeylerini azaltarak AC hasarını azaltıcı etki göstermektedir.
5. İnfliximab, istatistiksel olarak gösterilememiş olsa da, serum TAS seviyesini artırarak, antioksidan etkinlik göstermektedir.
6. İnfliximab, istatistiksel olarak gösterilememiş olsa da, TS ile oluşan akciğer hasarını azaltmada histopatolojik düzeyde etkindir.
7. Kan ve doku düzeyinde biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmelerde, istatistiksel anlam oluşturmeyen değişimler görülmüş olup, bu konuda yapılacak çalışmalarda örneklem büyüklüğü daha geniş denek grupları oluşturulması gerekliliğini ve TS süresinin de daha uzun tutulması gerekliliğini ortaya koymuştur.

## ÖZET

### **Deneysel Tıkanma Sarılığı Modelinde İnfliximab' ın Akciğer Hasarı Üzerine Olan Etkinliği**

Tıkanma sarılığı, mortalitesi yüksek olan bir klinik durumdur. Mortaliteye etki eden önemli faktörlerden biri oluşan Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SİYS)' dur. Ayrıca oluşan sitokin fırtınası ve sepsisin oluşturduğu organ hasarı bu sürece etki eder. SİYS' de etkili olan; ilk olarak salgılanan ve en etkin olan madde TNF-alfa dır, ayrıca IL-1 dir. Uzak organ hasarına sebep olan mediatörler ise IL-6 ve IL-8 dir. Oluşan sitokin fırtınası, bakteriyel translokasyona ve sepsise neden olur. Sepsisin oluşturduğu organ disfonksiyonu da çoklu organ yetmezliğine ve ölüme neden olur.

İnfliximab, anti-TNF-alfa etkinliği bilinen ve klinikte Ülseratif Kolit, Crohn, Romatoid Artrit, Ankilozan Spondilit, Psöriazis, Hepatosplenik T-Cell Lenfoma gibi durumlarda kullanılan bir ajandır. Anti-TNF-alfa etkinliği kanıtlanmış olan infliximabın, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş tıkanma sarılığı modelinde, sitokin cevabını azaltabileceği buna ilintili olarak da bakteriyel translokasyon ve sepsisi önleyebileceği hipoteziyle, mortaliteye etkili olan akciğer hasarını azaltıp azaltmayacağını araştırılması amaçlanarak bu çalışma planlanmıştır.

Elli yedi adet Sprague-Dawley rat, laparotomi kontrol (n=11), tıkanma sarılığı (n=23) ve tıkanma sarılığı + İnfliximab (n=23) grubu olmak üzere üçe ayrıldılar. I. gruba sadece laparotomi uygulandı. II. gruba ana safra kanalı ligasyonu yapıldı. III. gruba ise ana safra kanalı ligasyonu yapıldı ve günde 1 kez, 10 mg/kg dozunda İnfliximab 7 gün boyunca i.v. verildi. Sakrifikasyon sırasında inceleme için kan ve akciğer dokusu alındı.

Kanda (serumda) ve akciğer dokusunda TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TAS (Total Antioksidan Seviye), TOS (Total Oksidan Seviye) ve OSI (Oksidatif Stres İndeksi) çalışıldı.

Tıkanma sarılığına bağlı akciğer hasarı oluşmaktadır. Bu akciğer hasarının gelişmesinde; lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ve nötrofil migrasyonu etkilidir. İnfliximab, tıkanma sarılığı ile artmış serum TNF-alfa ve IL-8 serum değerlerini azaltarak, antisitokin etkinlik göstermektedir. Böylece antinflamatuvar etki göstererek akciğer hasarını azaltmaktadır. Ayrıca, serum TAS seviyesini artırarak, antioksidan etkinlik göstermektedir. İnfliximab, tıkanma sarılığı ile oluşan akciğer hasarını azaltmada histopatolojik düzeyde etkin bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Tıkanma sarılığı, infliximab, akciğer hasarı, oksidatif stres.

## SUMMARY

### **The Effects of Infliximab on The Lung Injury in Experimental Obstructive Jaundice Model**

Obstructive jaundice is a clinical condition with a high mortality rate. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is one of the important factors affecting mortality. In addition, the cytokine storm and the organ damage caused by sepsis affect this process. The first secreted and most effective substance in SIRS is TNF-alpha and also IL-1 is effective. The mediators that cause distant organ damage are IL-6 and IL-8. The cytokine storm causes to bacterial translocation and sepsis. The organ dysfunction that produced by sepsis also causes multiple organ failure and death.

Infliximab is an agent known for its anti-TNF-alpha activity and used clinically in cases such as Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, Psoriasis, Hepatosplenic T-Cell Lymphoma. This study was planned to investigate whether infliximab, has a proven anti-TNF-alpha activity, would reduce mortality-effective lung injury in the experimental obstructive jaundice model in rats based on the hypothesis that infliximab may reduce the response to cytokines and that it may prevent bacterial translocation and sepsis.

Fifty-seven Sprague-Dawley rats were divided into three groups as laparotomy control (n=11), occlusion (n=23), and occlusion + infliximab (n=23). Only laparotomy was performed to Group I. The main bile duct ligation was done in Group II. The main bile duct ligation was done and i.v. infliximab was given at a dose of 10 mg / kg once a day for 7 days to Group III. Blood and lung tissue were taken for examination during sacrifice.

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TAS (Total Antioxidant Status), TOS (Total Oxidant Status) and OSI (Oxidative Stress Index) were studied in blood (serum) and lung tissue.

Lung injury occurs due to obstructive jaundice. Lipid peroxidation, oxidative stress, and neutrophil migration are effective in the development of this lung damage. Infliximab shows anticytokine activity by decreasing TNF-alpha serum and IL-8 serum levels which increased by obstructive jaundice. Thus, it reduces lung damage by anti-inflammatory effect. Infliximab was found effective in reducing lung damage caused by obstructive jaundice at the histopathological level.

**Key Words:** Obstructive jaundice, infliximab, lung injury, oxidative stress.



## KAYNAKLAR

1. Su CH, P'eng FK, Lui WY. Factors affecting morbidity and mortality in biliary tract surgery. *World J Surg.* 1992; 16(3):536-40.
2. Kimmings AN, Van Deventer SJH, Obertop H et al. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. *Gut* 2000; 46, 725-731
3. Papakostas C, Bezirtzoglou E, Pitiakoudis M, Polychronidis A, Simopolulos C. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice. *Clin Exp Med.*2003 ;3(2):124-8.
4. Sakrak O, Akpınar M, Bedirli A, Akyurek N, Arıtas Y. Short and long-term effects of bacterial translocation due to obstructive jaundice on liver damage. *Hepatogastroenterology.* 2003;50(53):1542-6.
5. Padillo FJ, Muntane J, Montero JL, Briceno J, Mino G, Solarzano G, Sitges-Serra A, Pera Madzaro C. Effect of internal biliary drainage on plasma levels of endotoxin cytokines and C-reactive protein in patients with obstructive jaundice. *World J Surg.* 2002;26(11):1328-32.
6. Liu TZ, Lee KT, Chern CL et al. Free Radical-Triggered Hepatic Injury of Experimental Obstructive Jaundice of Rats Involves Overproduction of Proinflammatory Cytokines and Enhanced Activation of Nuclear Factor B. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2001: 31,383-390
7. Wang P, Gong G, Wei Z et al. Ethyl Pyruvate Prevent Intestinal Inflammatory Response and Oxidative Stress in a Rat Model of Extrahepatic Cholestasis. *Journal of Surgical Research* 2009: 1-8
8. Akca T, Canbaz H, Tatarolu C vd. The Effect of N-Acetylcysteine on Pulmonary Lipid Peroxidation and Tissue Damage. *Journal of Surgical Research* 2005: 129, 38-45
9. Ogetman Z, Dirlik M, Caglikulekci M, Canbaz H, Karabacak T, Yaylak F, Tamer L, Kanik A, Aydin S. The effect of aminoguanidine on blood and tissue lipid peroxidation in jaundiced rats with endotoxemia induced with LPS. *J Invest Surg.* 2006;19(1):19-30.
10. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lunginflammation. *Eur Respir J.*2000;16(3):534-54
11. Dr.Çavdar C, Dr. Sifil A, Dr. Çamsarı T. Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar 1997;3-4: 96-101.
12. Knight DM, Trinh H, Le J et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF $\alpha$  antibody *Mol. Immunol.* 1993;30:1445-1453
13. Kurt A, Tumkaya L, Yuce S, Turut H, Cure MC, Sehitoglu I, Kalkan Y, Pusuroglu G, Cure E. The protective effect of infliximab against carbon tetrachloride-induced acute lung injury. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(6):685-91.

14. Guzel A, Kanter M, Guzel A, Pergel A, Erboga M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab on acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion. *J Mol Histol.* 2012;43(3):361-9.
15. Andreoli T, Bennett J.C, Carpenter C.J, Plum F, Smith L.H: jaundice. *Cecil Essentials of medicine Türkçesi* 2000; bölüm 6,324-328.
16. Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Willen R, Bengmark S: The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* 1993;25:11-19.
17. Tontuş O, Coşkun S, Erengül C, Pişkinpafla M. Obstrüktif sarılıklı hastalarda cerrahi morbidite ve mortaliteyi etkileyen risk faktörleri. *Klin Den Cerrahi Derg* 1993;1:228-31.
18. Yüzen Y, Öncel T, Engin S, Aldemir S, Akyıldız A: Tıkanma sarılıklarında mortalite ve morbiditeyi etkileyen faktörler. *Ulusal Cerrahi Derg* 1993;9:238-43.
19. Guyton A. C. , Hall J. E. *Tıbbi Fizyoloji Bolum 64: 9th de.* 1996; 827-829
20. Greig JD, Krukowski ZH, Matheson NA. Surgical morbidity and mortality in one hundred twenty-nine patient with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1988;75:216-9.
21. Güngör S, Kurultay N, Şener G.A, Er H.H, Çökmez A, Türker M: Deneysel olarak tıkanma ikteri geliştirilen ratlardabakteriyel translokasyonun Gösterilmesi *Klimik Derg, Cilt 16, Sayı:3, 2003, s:121-125*
22. Kadioğlu M.B Tıkanma Sarılığı Oluşturulan Modelde Ursodeoksikolik Asit ve Glutamin' in Bakteriyel Translokasyon, Karaciğer Fonksiyon Testleri ve Karaciğer Histopatolojisine Olan Etkileri. *Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. Genel Cerrahi Kliniği İstanbul-2005*
23. Erbil Y, Berber E, Ozarmagan S et al: The effects of sodium deoxycholate, lactulose and glutamine on bacterial translocation in common bile duct ligated rats. *Hepatogastroent* 1999; 46: 2791-2798
24. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R et al: Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepat* 2003; 37: 551-557
25. Parks RW, Clements WDB, Pope C et al: Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. *J Anat* 1996; 189: 561-565
26. Ogata Y, Nishi M, Nakayama H, Kuwahara T, Ohnishi Y, Tashiro S: Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J Surg Res.* 2003;115(1):18-23.
27. Çelikbas B Deneysel Tıkanma Sarılığı Modelinde Caffeic Asid Phenethyl Esterin Akciğer Hasarını Önlemedeki Etkinliği. *SDÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD Isparta- 2007*
28. Jiang W.G, Puntis M.C.A, Hallet M.B. Neutrophil priming by cytokines in patients with obstructive jaundice. *HPB Surg.* 1994; 7, 281.289.
29. Puntis M.C.A, Jiang W.G. Monocyte from obstructive Jaundice Patients Show Increased TNF and IL-6 production *Br. J. Surg.* 1992, 79,458

30. Kaya O, Koca YS, Barut I, Baspinar S, Sabuncuoğlu MZ. L-carnitine reduces acute lung injury in experimental biliary obstruction. *Saudi Med J.* 2015; 36(9):1046-52.
31. Gul M, Aliosmanoglu I, Uslukaya O, Firat U, Yüksel H, Gümüş M, Ulger BV. The protective effect of ellagic acid on lung damage caused by experimental obstructive jaundice model. *Acta Chir Belg.* 2013;113(4):285-9.
32. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L, Avlan D, Unlu A, Okcu H, Dikmengil M, Oral U. The protective effect of N-Acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. 336-372,2003.
33. Kasana H. Infliximab: Biological response modifier, chimeric IgG1 therapeutic recombinant monoclonal antibody. *EJBB* 2015. 3:9;47-50
34. Siegel SA, Shealy DJ, Nakada MT et al. The Mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. *Cytokine* 1995;7:15-25
35. Minami M, Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* 1979; 92: 337-342.
36. Luck H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods in enzymatic analysis.* New York (NY): Academic Press; 1971. p. 885.
37. Theodorus P, Akerboom M, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77: 373-383.
38. Badger SA, Jones C, McCaigue M, Clements BW, Parks RW, Diamond T, et al. Cytokine response to portal endotoxaemia and neutrophil stimulation in obstructive jaundice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 25-32.
39. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, et al. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res,* 1998; 31: 1-8.
40. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med,* 2000; 29: 1106-14.
41. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem,* 2004; 37: 112-9.
42. Nacar H. Akciğer kisthidatik operasyonlarında sevofluran ve desfluran anestezilerinin oksidatif stres ve prolidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Şanlıurfa.
43. Harma M, Erel O: Oxidative stres in women with preeclapsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192: 656-657.
44. Erol MK. Yoğun bakım hastalarında propofol, deksmedetomidin ve midazolam infüzyonlarının sedasyon, oksidan –antioksidan sistem üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi. Şanlıurfa 2011

45. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*2005;38:1103–1111.
46. Karakoc M, Altindag O, Keles H, Soran N, Selek S (2007) Serumoxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 27(12):1131–1134
47. Kurt A., Tümkaya L., Türüt H., Cure M.C., Cre E., Kalkan Y., et al., "Protective Effects of Infliximab on Lung Injury Induced by Methotrexate", *ARCHIVOS DE BRONCONEUMOLOGIA*, 2015 vol.51, pp.551-557

