

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA STEROİD VERİLİMİNİN PRINGLE MANEVRASI SONUCU
OLUŞAN BAKTERİ TRANSLOKASYONU VE ENDOTOKSEMİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ

Dr. Kerem KARAMAN

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanları

Öğr. Gör. Dr. M. Bülent Tırnaksız

Prof. Dr. İskender Sayek

ANKARA

2005

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. İskender Sayek ve Sayın Öğr. Gör. Dr. M. Bülent Tırnaksız'a,

Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji A.B.D.'dan Sayın Prof. Dr. Burçin Şener, Sayın Araş. Gör. Dr. İnci Fişenk ve Sayın Araş. Gör. Dr. Dolunay Gülmez'e

Hacettepe Üniversitesi Patoloji A.B.D'dan Sayın Doçent Dr. Cenk Sökmensüer ve Sayın Araş. Gör. Dr. Nazmiye Karaman'a,

Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Araştırma Ünitesi sorumlusu Sayın Öğr. Gör. Dr. Murat Koloğlu'na,

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlusu Sayın Vet., Dr. İlyas Onbaşlar'a,

Tez çalışmam süresince göstermiş oldukları katkı ve yardımlarından dolayı teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| TEŞEKKÜR | 2 |
| TABLO LİSTESİ | 4 |
| ŞEKİL LİSTESİ | 5 |
| ÖZET | 6 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. GİRİŞ | 10 |
| 1.1.Pringle manevrası | 10 |
| 1.2. Pringle manevrası sonucu oluşan hemodinamik değişiklikler | 12 |
| 1.3. İskemi reperfüzyon hasarı | 13 |
| 1.4. İntestinal bakteri translokasyonu | 16 |
| 1.5. Endotoksemi ve steroidler | 20 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 23 |
| 2.1. Deney tasarımı | 23 |
| 2.2. Bakteri translokasyonu çalışması | 25 |
| 2.3. Endotoksin çalışması | 26 |
| 2.4. İstatistiksel değerlendirme | 27 |
| 3. SONUÇLAR | 28 |
| 4. TARTIŞMA | 34 |
| 5. VARGI | 38 |
| 6. KAYNAKLAR | 39 |

TABLO LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Tüm gruplarda mezenter, karaciğer ve dalak kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar. | 28 |
| Tablo 2. Gruplardaki bakteri translokasyonu ve endotoksin görülme oranları | 29 |
| Tablo 3. Grupların nicel bakteri translokasyonu (CFU/g). | 31 |
| Tablo 4. Geç iskemi reperfüzyon grubunda alt grupların nicel bakteri translokasyonu (CFU/g) açısından karşılaştırılması | 31 |
| Tablo 5. Tüm gruplarda toplam nicel enterik bakteri translokasyonu ve kanda endotoksin varlığı | 33 |

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Endotoksin varlığı temel alındığında bakteri translokasyonu miktarı (CFU/mg) ... 30
- Şekil.2.** Tüm gruplarda toplam nicel enterik bakteri translokasyonu ve kanda endotoksin varlığı 33

ÖZET

Pringle manevrası, karaciğer nakli, hepatik rezeksiyonlar ve travmaya bağlı karaciğer yaralanmalarında kanamayı kontrol etmek amacıyla hepatoduodenal ligamentin kompresyonudur. Pringle manevrası sistemik hemodinamik değişiklikler oluşturmasının yanı sıra karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarı, intestinal bakteri translokasyonu ve endotoksemiye de yol açmaktadır. Fizyolojik stres dozunda steroidlerin sepsis ve septik şok tedavisinde kullanımı son yıllarda tekrar güncelleşmiştir. Bu çalışmada hem düşük (0,1 mg/kg) hem de yüksek doz (1,0 mg/kg) deksametazon veriliminin, Pringle manevrasının yol açtığı intestinal bakteri translokasyonu ve endotoksemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 64 adet 200-250 gram ağırlığında erkek Sprague-Dawley cinsi rat, her bir grup 8 hayvandan oluşmak üzere, 8 ayrı grupta çalışmaya dahil edildi. Bunlardan ilk dört grup erken iskemi reperfüzyon (İR) grupları (A1-sham, B1-kontrol, C1-düşük steroid, D1-yüksek steroid), diğer yarısı 24 saatlik geç İR grupları (A2-sham, B2-kontrol, C2-düşük steroid, D2-yüksek steroid) olarak oluşturuldu. Deney grupları C1 ve C2'ye düşük, D1 ve D2'ye ise yüksek doz deksametazon, Pringle manevrası öncesinde verildi. Erken İR gruplarında 20 dakika Pringle manevrası ve 15 dakika reperfüzyon sonrasında sıçanlar öldürülerek mezenter lenf nodları (MLN), karaciğer ve dalaktan bakteri translokasyonu tayini için doku örnekleri, kanda endotoksin tayini için aorttan 1 ml. kan alındı. 24 saatlik İR gruplarında farklı olarak Pringle manevrası sonrasında karınları kapatılıp, 24. saatte tekrar açılarak kan ve doku örnekleri alındı.

Sonuç: Düşük doz (0,1mg/kg) deksametazon'un geç İR grubunda bakteriyel translokasyonu anlamlı derecede azalttığı saptanmışken ($P<0,05$), yüksek doz (1,0mg/kg) deksametazonda anlamlı bir etki görülmedi. Kan endotoksin varlığı ile transloke olan enterik bakteri miktarı arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı ($P<0,01$).

ABSTRACT

Pringle Maneuver (PM) is a technique where the hepatoduodenal ligament is clamped including the portal vein, hepatic artery and the main bile duct, in order to reduce the current or potential bleeding. This technique is used especially in hepatic transplantation, hepatic resection and hepatic injuries.

Following PM, systemic haemodynamic changes lead to hepatic ischemia reperfusion (I/R) injury, bacterial translocation and endotoxemia. Currently, using steroid doses in physiologic amounts have become increasingly popular for the treatment of sepsis and septic shock . In the present study, we aimed to investigate the effects of both low dose (0.1 mg/kg) and high dose (1.0 mg/kg) dexametasone treatment on bacterial translocation and endotoxemia following PM.

Material and Methods: Sixty four male Sprague Dawley rats (200-250grs) were used in the study. The study consisted of 8 groups consisting of 8 animals in each group. Four groups were early I/R groups (A1-sham, B1-control, C1-low dose steroid, D1-high dose steroid) and the other four were 24 hour I/R groups (A2-sham, B2-control, C2-low dose steroid, D2-high dose steroid). In C1 and C2 groups low dose (0.1mg/kg) dexametasone, and in D1 and D2 groups high dose (1.0mg/kg) dexametasone were administered before PM. In the early I/R groups rats were sacrificed following 20 minutes of PM and 15 minutes of reperfusion. Tissue cultures were obtained from the mesenteric lymph nodes (MLN), liver and spleen for bacterial translocation analyses, and 1 ml. of blood was drawn from the aorta for detection of endotoxin in the blood. In 24 hour I/R groups following PM, the rats' abdomen were closed and at 24 hours, animals were sacrificed and blood and tissue culture samples were taken similarly.

Results: Low dose dexametasone (0.1 mg/kg) decreased the bacterial translocation significantly in the late period ($P < 0.05$). High dose (1,0 mg/kg) dexametasone did not cause any significant change. There was a significant positive association between the presence of endotoxin in the blood and the amount of translocated bacteria ($P < 0.01$).

I. GİRİŞ

Pringle manevrası, karaciğer rezeksiyonları, transplantasyonlar ve karaciğerin travmatik yaralanmalarında, kan kaybını önlemeye yönelik sıkça başvurulan bir yöntemdir. Pringle manevrasına bağlı, sistemik hemodinamik değişiklikler yanında karaciğerde iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı, intestinal bakteri translokasyonu ve endotoksemi meydana gelmektedir.

Son yıllarda, sepsis ve septik şok tedavisinde fizyolojik stres dozunda steroid kullanımı yeniden güncellik kazanmıştır. Bu konuda literatürde, çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmış ve halen de yapılmaktadır. Yaptığımız literatür taramasında, steroidlerin, Pringle manevrası sonrası oluşan intestinal bakteri translokasyonu ve endotoksemi üzerine olan etkilerini araştıran çalışmaya rastlamadık.

Araştırmamızın amacı, sıçanlarda Pringle manevrası öncesinde verilen düşük (0.1 mg/kg) ve yüksek (1,0 mg/kg) doz deksametazonun erken ve geç dönemde Pringle manevrası sonucu oluşan intestinal bakteri translokasyonu ve endotoksemi üzerindeki etkilerini saptamaktır.

1.1. Pringle Manevrası

Pringle manevrası, ilk kez 1908 yılında Pringle tarafından, karaciğerde travmaya bağlı kanamayı azaltmak amacıyla hepatoduodenal ligamentin geçici olarak klemplenmesi şeklinde uygulanmıştır (1).

Üzerinden bir asra yakın zaman geçmesine rağmen Pringle manevrası, günümüzde de karaciğer rezeksiyonu, transplantasyonu ve karaciğerin travmatik yaralanmalarında, kan kaybını önlemeye yönelik sıkça başvurulan bir yöntem olmaya devam etmektedir.

Pringle'nin orijinal tarifinde, normal bir karaciğerde, hepatic pedikülün oklüzyon süresi 15-20 dakikalık süreyi aşmamaktaydı.

Huguet ve ark.'nın yaptığı klinik çalışmalarda, karaciğerin daha uzun iskemik süreleri tolere edebileceği kanıtlandıktan sonra, bu alanda yapılan araştırmalar giderek yoğunlaşmış ve günümüzde sirotik bir karaciğer 30 dakikalık iskemiye rahatlıkla tolere edebilirken, normal bir karaciğerde bu süre 60 dakikayı bulmaktadır. Hepatic pedikülün 90 dakikaya kadar ulaşan sürekli oklüzyonunu bildiren çalışmalar mevcut olmakla birlikte, bunlarda geçici hepatic yetmezlik ve ensefalopati gibi majör komplikasyonların geliştiği gözlenmiştir (2, 3, 4).

İskemik ön alıştırma (*preconditioning*), ilk kez 1986 yılında Murray ve ark. tarafından tavşan miyokardında denenmiştir. Daha sonra çizgili kaslar, ince barsak, böbrek ve karaciğerde de iskemik ön alıştırma ile ilgili bir çok klinik ve deneysel çalışma yapılmıştır. İskemik ön alıştırma portal triadın 10 dakikalık klemplenmesi ve ardından 10 dakikalık reperfüzyonu sonrasında karaciğerin daha uzun süreli iskemiye maruz bırakılmasıdır (5).

İskemik ön alıştırmada karaciğerin daha uzun süreyle iskemiye dayanabilmesini ve daha az zedelenmesini sağlayan düzeneklerin başında, nitrik oksit'in (NO) reperfüzyon evresinde güçlü vazokonstriktörler olan endotelinlerin salınımını inhibe etmesi gelmektedir. İskemik ön alıştırmada, ksantin dehidrojenaz'ın ksantin oksidaz'a dönüşümü azalmakta, mitokondriyal redüksiyon kabiliyeti ve parankimal doku oksijenizasyonu muhafaza edilmektedir. Kupffer hücrelerinden TNF-alfa salınımındaki azalma iskemik ön alıştırma ile aktive olan NO'in inhibisyonuna bağlanmaktadır. Ayrıca adenosin monofosfat'la etkinleşmiş protein kinaz (*AMP-activated protein kinase, AMPK*) artışıyla iskemi boyunca ATP yıkımı ve laktat oluşumu azalmaktadır (5).

Her ne kadar Pringle Manevrası ile oluşan kan kaybı ve kan tranfüzyon gereksinimi azaltılmış olsa da karaciğerde birtakım hemodinamik değişikliklerin yanı sıra sıcak iskemik reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir.

1.2. Pringle Manevrasıyla Oluşan Hemodinamik Değişiklikler

Portal triadın klemplenmesi ile beraber kalbe olan venöz dönüş azalmakta, santral venöz basınç düşmektedir. Kan basıncının düşmesi sempatoadrenerjik uyarıma ve periferik vasküler rezistansın artmasına yol açmaktadır (6).

Portal triadın klemplenmesi aynı zamanda kanın splanknik alanda göllenmesine ve intestinal venöz konjesyona yol açmaktadır. İskeminin ilerleyen sürecinde meydana gelen venöz staza bağlı olarak proenflamatuar sitokinler aktive olmakta, azalan perfüzyonla birlikte iskemik kalan barsaklarda mukozal duvar bütünlüğü bozularak bakteriyel translokasyon meydana gelmektedir.

Hemostatik vasküler klempin açılmasıyla sağlanan reperfüzyon döneminde gözlenen hipotansiyon, prostaglandinler (PG-F1 α ve tromboksan) ya da adenosin gibi vazoaaktif maddelerin aktivasyonuna bağlı gelişmektedir. Hipotansiyon, karaciğere olan kan akımının azalmasına neden olarak iskemik dönem boyunca anoksik kalan karaciğerde hasarın daha da artmasına yol açmaktadır.

On dört hastadan oluşan bir klinik çalışmada, iç organ cerrahisi sırasında hipotansiyonu düzeltmek için verilen noradrenalin'in (60 ng/kg/dk), hepatic arter ve portal ven kan akımını önemli ölçüde azaltarak karaciğer zedelenmesini artırdığı, dopamin'in (7 μ g/kg/dk) ise hepatic arter kan akımını etkilememekle birlikte portal kan akımını artırarak hasarı azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, reperfüzyon döneminde

meydana gelen arteryel hipotansiyonu düzeltmek için verilen noradrenalin'in karaciğer hasarını artırabileceğini göstermektedir (7).

İskemik ön alıştırma sonrasında vazopressör tedavi için gereksinim duyulan noradrenalin miktarı 250 kat daha az olmaktadır. Bunun nedeninin, nitrik oksit'in (NO), endotelinlerin vasokonstriktör etkilerini baskılamasına bağlı olduğu düşünülmektedir (8).

1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

Karaciğerin iskemi reperfüzyon hasarı, transplantasyonlarda immünolojik greft rejeksiyonlarından sonra gelişen ikinci en sık organ kaybı nedenidir.

Ameliyatlarda, karaciğerin maruz kalabileceği üç tip iskemi vardır. Bunlar soğuk (veya hipotermik), sıcak (veya normotermik) ve yeniden ısınma (rewarming) şeklinde olmaktadır. Soğuk iskemi, genellikle transplantasyon öncesinde greftlerin çeşitli solüsyonlarda (*Euro Collins, University of Wisconsin*) bekletilme süresinde meydana gelmekte ve greftin metabolik etkinliğinde yavaşlamaya neden olmaktadır. Sıcak iskemi, transplantasyon, travma, şok, karaciğer cerrahisi, Pringle manevrası ve total vasküler eksklüzyon (Hepatik pedikül ve vena cavanın klemplenmesi) sırasında meydana gelmektedir. Yeniden ısınma iskemisi, greftin soğuk solüsyondan çıkarılıp oda sıcaklığı ve vücut sıcaklığına ulaştığı vasküler anastomozların yapıldığı dönemi kapsamaktadır (9).

Jaeschke ve ark., karaciğerdeki sıcak iskemi-reperfüzyon hasarının iki ayrı safhadan oluştuğunu tanımladılar. Birinci evre, serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı gelişen akut hücrel hasardır ve reperfüzyonun ilk 3-6 saatlik dönemini kapsamaktadır. Apoptozis ve hücrel nekroz sıklıkla bu dönemde oluşmaktadır. İkinci evre, 18-24.

saatlerde proenflamatuar sitokinler ve proteazların yol açtığı enflamatuar yanıtı bağlı, nötrofillerin hepatik vasküler endotele adezyonu ve karaciğer parenkimine transmigrasyonu ile sonuçlanan, organ hasarı gelişen dönemdir.

Hipoksik kalan karaciğer hücrelerinde ATP hızla tüketilerek AMP'ye indirgenmektedir. AMP yıkımını sırasıyla adenozin, inozin ve en son hipoksantin oluşumu izler. Reperfüzyonla birlikte hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla girdiği tepkime sonucunda süperoksit meydana gelir. Oluşan serbest oksijen radikalleri reperfüzyonla birlikte hızla artarak hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna neden oldukları gibi sitoplazmada, DNA yapısında ve mitokondriyal reduksiyon mekanizmasında hasara yol açarlar (10, 11).

Serbest oksijen radikalleri aynı zamanda hücre içi ikincil mesajcı görevi görerek Transkripsiyon Nükleer Faktör kappa B (NF κ B) ve Aktivatör Protein-1 (AP-1) uyarımına neden olmaktadır. NF κ B'nin karaciğer Kupffer hücrelerinden interlökin 12, TNF- α ve interlökin 1 salınımında rol oynadığı düşünülmektedir. AP-1 de iskemi reperfüzyon hasarında artmaktadır. Hipotermide azalan hepatik enflamatuar yanıtın AP-1 düzeylerindeki düşmeyle ilişkili olduğu savunulmaktadır.

İskemi reperfüzyon hasarında ilk artan proinflamatuar sitokin interlökin 12'dir. İnterlökin 12 olmadan TNF- α ve interlökin 1 salınımı gerçekleşmemektedir. Karaciğerin makrofajları olan Kupffer hücrelerinden salınan TNF- α , enflamatuar yanıt oluşumunda ana aracı rolü oynamaktadır. TNF- α 'nın blokajı, hepatik vasküler adezyon molekülünün ve nötrofiller için kemotaktik olan kemokinlerin inhibisyonuna yol açmaktadır (12).

Vasküler hücre adezyon molekülleri selektin, endotelin ve integrindir. Bu moleküller, nötrofillerin, vasküler endotele adezyonu ve sonrasında interstisyel parankimal alana transmigrasyonunu sağlarlar (13).

Nötrofillerin ve trombositlerin karaciğer sinuzoidlerin tutunması, tıkanıklığa yol açarak mikrodolaşımın bozulmasına ve "No-reflow" fenomeni olarak adlandırılan diğer bir çeşit karaciğer hasarına yol açabilmektedir (10).

İskemi reperfüzyon hasarında salınan sitokinlerden interlökin 6 , hepatosellüler hasarı sınırlamakta ve hepatosit rejenerasyonunda etkin rol oynamaktadır. Bu etkiyi TNF- α inhibisyonu ve C-reaktif protein artışına yol açarak gerçekleştirdiği varsayılmaktadır. İnterlökin 10'nun iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisi görülmemekle birlikte, eksojen verildiğinde proenflamatuar sitokin salınımını inhibe ettiği gözlenmiştir. İnterlökin 13'ün antienflamatuar etkisi tam aydınlatılamamakla beraber hepatositleri, serbest oksijen radikallerinin sitotoksik etkisine karşı koruduğu tahmin edilmektedir (14).

Diğer bir regülatör mediatör nitrik oksit (NO) olup, Endotelin inhibisyonu yoluyla ve nötrofillerin vasküler endotele adezyonunu engelleyerek, karaciğer hasarını azalttığı düşünülmektedir (15).

İskemi reperfüzyon hasarı Kupffer hücrelerinde intrasellüler Ca^{++} artışına neden olmaktadır. Ca^{++} , TNF- α ve PGE₂ sentezine yol açan fosfolipazları aktive etmektedir. Glisin, Kupffer hücrelerinde Klorür (Cl⁻) kanallarını aktive ederek, kalsiyum kanallarının açılmasını güçleştirmekte ve bu yolla, sitokin salınımını baskılamış olmaktadır. Ozaki ve çalışma arkadaşları Glisin'in lipid peroksidasyonunu inhibe ederek karaciğeri hasarını engellediğini göstermişlerdir (16).

1.4. İntestinal Bakteri Translokasyonu

Bakteri ve bakteriyel ürünlerin (endotoksinler), barsak lümeninden mezenterik lenf nodları ya da diğer ekstraintestinal organ ve bölgelere göçü olarak tanımlanan bakteriyel translokasyon, bozulan konakçı florasının varlığında, enflamatuvar yanıt gelişimine ve enfeksiyona yol açmaktadır

Gastrointestinal sistemden bakteriyel translokasyonu artıran üç temel mekanizma, bakteriyel çoğalma, konakçı immün yanıtının bozulması ve barsak mukozal geçirgenliğin artmasıdır.

Vücudun en geniş yüzey alanına sahip olan gastrointestinal sistem (GİS), sürekli mikroorganizmalarla yoğun bir etkileşime açık durumdadır. İntestinal mikroflora, gastrointestinal traktüs boyunca farklı kompozisyonlarda çeşitli mikroorganizmaların dinamik karışımından meydana gelmekte ve bireysel değişkenlik göstermektedir. Üst GİS'in mikrobiyal içeriği mililitrede 10^5 koloni oluşturan üniteden (CFU/ml) meydana gelirken, distal ileum ve çekumda miktar 10^8 CFU/ml, kolonda 10^{12} CFU/ml'ye çıkmaktadır (17).

En kolay transloke olabilen bakteriler, belirli bir dereceye kadar fagositoza direnç gösterebilen fakültatif hücre içi patojenlerdir (*Salmonella*, *Listeria*). Normal enterik bakteriler fagositozla kolayca yok edilebilirken, konakçı defans mekanizmaları bozulduğunda patojen çoğalma gösterebilirler. Gram negatif bakteriler (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, enterobakterler), enterokoklar ve diğer streptokoklar, translokasyon sırasında mezenterik lenf nodlarına en fazla geçiş gösteren mikroorganizmalardır. Özellikle *E. coli*'nin bazı şuşlarının çok daha etkin translokasyon göstermesi, intestinal mukozaya penetrasyon yeteneğinin çok iyi gelişmesine bağlanmaktadır (18).

Aerobik gram negatif bakteriler sağlam intestinal mukozaya rağmen transloke olabilirken, anaerobikler ancak mekanik intestinal hasar (radyasyon gibi) durumlarında transloke olabilmektedir. Anaerobik bakteriler, patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu ve artışıını sınırlamaktadır. Anaerobik bakterilerin selektif eliminasyonu, fakültatif bakterilerin translokasyonuna yol açmaktadır.

İntestinal mukozal bariyer, mikroorganizmaların penetrasyonuna karşı hem fiziksel hem de sekretuar savunma özelliklerine sahiptir. Mukoza epiteli, en önemli bariyerdir. Epitelyal goblet hücrelerinden lümene sekrete edilen visköz müsinoz salgı, mikrovillus membranı ile bakteri arasındaki teması engellemektedir. Barsak peristaltizmiyle sağlanan transit ve IgA'dan zengin mukozal sekresyonlar, patojen bakterilerin barsak yüzey epiteline yapışmasını önler. Barsak mukozal immun sistemi, vücudun en büyük immunolojik organıdır ve barsak lenfoid dokusu (*gut associated lymphoid tissue, GALT*), T ve B lenfositler, makrofajlar, paneth ve M hücreleri ve peyer plaklarından oluşmaktadır (19, 20).

Safra, barsak lümeninde bakteri ve endotoksinleri bağlayarak deterjan benzeri, emilimi güç kompleksler meydana getirir. Safra, aynı zamanda IgA'dan zengin, bakteristatik özellik taşımaktadır. Safra yapısında bulunan kolesterol intestinal mukozanın tamiri için gereklidir. Tıkanma sarılıklı hayvan deneylerinde, barsağa safra akışının kesilmesi bakteriyel translokasyona neden olmaktadır (21, 22, 23,24).

Hepatosplanknik alan, vücut kan hacminin % 20-35'ini barındırmaktadır. Yanık, travma, şok gibi aşırı kan ve sıvı kaybıyla seyreden hipovolemik durumlarda, beyin, kalp ve böbreklerin yaşamsal önemi nedeniyle vücut, splanknik alandaki kanın önemli kısmını bu organlara kaydırmaktadır. Sempatik reseptörlerden zengin olan splanknik alan, hipotansiyon düzeltilene kadar sempatoadenerjik uyarımın etkisi altında

vazokonstriksiyona bağlı hipoksik kalmaktadır. Süreç uzadıkça mukozal iskemi ve harabiyet, barsak duvar bütünlüğünde bozulmaya ve bakteri translokasyonuna yol açmaktadır.

Major hepatektomi ameliyatlarından sonraki erken dönemlerde, safra üretimini azalması, rezeksiyonla birlikte Kupffer hücrelerinin sayısal azlığı ve yavaşlayan intestinal transit zamanı, bakteriyel translokasyona neden olmaktadır.

Transplantasyonlarda meydana gelen bakteri translokasyonu, splanknik hipoperfüzyon, cerrahi manplasyona ikincil veya anhepatik fazdaki portal oklüzyona bağlı gelişmektedir.

Pringle manevrası'nda, portal oklüzyonla venöz kan, splanknik alanda birirmektedir. Venöz staza bağlı oluşan perfüzyon bozukluğu, mukozal harabiyetle birlikte bakteriyel translokasyona, serbest oksijen radikalleri oluşumuna ve enflamatuar sitokin salınımına neden olmaktadır (25, 26).

Xing ve ark., Pringle manevrası uyguladıkları ratlardan aldıkları ileal doku örneklerini elektron mikroskopisinde incelediklerinde, belirgin mukozal harabiyet geliştiğini tespit etmişlerdir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, Pringle Manevrası uygulanan grupta -istatistiksel olarak anlamlı olmasa da- mezenterik lenf nodları, karaciğer ve dalakta daha fazla bakteriyel translokasyon saptamışlardır. Böbreklere transloke olan bakteri miktarı, Pringle manevrası uygulanan grupta anlamlı artış gstertermiştir (18).

Filos ve ark. ratlarda Pringle Manevrası uygulayarak endotoksin, apoptosis ve bakteriyel translokasyon araştırmışlardır. Kontrol grubuna göre Pringle manevrası uygulanan grupta mezenterik lenf nodları ve karaciğerde anlamlı bakteriyel translokasyon

artışı saptamışlardır. Ayrıca portal ve aortik kan örneklerinde Pringle manevrası uygulanan grupta endotoksin düzeylerinde anlamlı artış tespit etmişlerdir (26).

Son yıllarda intestinal bakteri translokasyonunu önlemeye yönelik probiyotikler, ve enteral immünonutrientlerin (glutamin, arjinin, ω-3 yağ asitleri, RNA destekli enteral besinler) kullanımı ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Travma ya da majör cerrahi sonrası erken dönemde enteral beslenme, bakteriyel translokasyonu azaltmaktadır. Glutamin, enterositler için en önemli enerji kaynağı olup, mukozal yapının bütünlüğünü koruyarak, translokasyon ve endotoksemi düzeyini azaltmaktadır. Büyüme hormonu ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), intestinal mukozanın yapısal bütünlüğü ve gelişimi yanında, yara iyileşmesinde de etkin rol almaktadır. Yine bazı deneysel çalışmalarda, kan somatostatin düzeylerindeki artışın bakteriyel translokasyon düzeyiyle paralellik gösterdiği saptanmıştır. Antioksidan etkisi olan melatonin'in, serbest oksijen radikallerini bağlaması yanında, intestinal mukozal kan akımını artırarak, mukozal bariyer fonksiyonlarını korumak suretiyle bakteriyel translokasyona karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (27, 28, 29,30).

Steroidlerin bakteriyel translokasyonla olan ilişkisi en çok ilgi çeken araştırma konularından biridir. Sepsis ve septik şokta steroidlerin terapötik yararı halen tartışma konusu olmaya devam etmektedir.

Jones ve ark. % 30 yanık oluşturulan ratlarda yanık sonrası glukokortikoid artışına bağlı bakteriyel translokasyonda artma ve mezenterik lenf nodlarında bakterilerin daha uzun süreli tutulumunu saptamışlardır (31).

Gianotti ve ark. % 20 yanık oluşturulan Bulb/C farelerinde yaptıkları çalışmada yüksek doz prednizolon'un (10 mg/kg) bakteriyel translokasyonu artırdığı ve transloke *E.*

Coli'lerin fagositozunu önlediği, buna karşılık dehidroepiandrostenidion'un (25 mg/kg), bakteriyel translokasyon üzerine anlamlı etki gösterememekle birlikte fagositoz yeteneğinde artış sağladığını gözlemlemişlerdir (32).

Wenzl ve ark. 9 günlük ratlarda, prenatal hidrokortizon (20 mg/ 100gr) kullanımının spontan bakteriyel translokasyonu azalttığını, ancak ekstraintestinal organlara transloke olan bakteri konsantrasyonu üzerine bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir (33).

Bakteriyel translokasyon oluşum mekanizmaları ve tedavi yöntemleri gelecekte de bilim dünyasında en çok araştırılan konulardan biri olmaya devam edecek gibi gözükmektedir.

1.5. Endotoksemi ve Steroidler

Gram negatif bakteri duvarında bulunan lipopolisakkarit, bakterinin makrofajlar ve monositler tarafından parçalanması sonucu açığa çıkarak toksik etki göstermekte ve aynı zamanda proenflamatuar sitokin salınımına neden olmaktadır. Pringle manevrasıyla oluşan splanknik venöz konjesyona bağlı olarak meydana gelen bakteriyel translokasyon, bakterilerin sistemik dolaşıma geçmesiyle endotoksemiye yol açmaktadır.

Kortikosteroidler, immün sistemin güçlü supresörüdür. Bu etkilerini, kompleman aktivasyonunu önleyerek, membran fosfolipidlerinden araşidonik asit ve platelet aktive edici faktör (PAF) formasyonunu azaltarak, mononükleer hücrelerden TNF- α ve diğer proinflamatuar sitokinlerin transkripsiyonunu azaltarak ve nötrofil kemotaksisini inhibe ederek göstermektedir. Kortikosteroidler, intrasellüler adezyon molekülü (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) salınımı azaltmakta, α ve β adrenerjik

reseptörlerin sayısı ve duyarlılığını artırarak lizozomal membranların stabilizasyonunu sağlamaktadır. Kortikosteroidlerin bir diğer etkisi de indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibisyonudur (34, 35).

21-aminosteroidlerin, oksijen radikallerinin nötralizasyonu ya da demir bağımlı lipid peroksidasyonunun inhibisyonu yoluyla sitoprotektif etki gösterdiği hayvan deneylerinde gözlenmiştir (36).

Bir sentetik glukokortikod olan deksametazon, fosfolipaz-A2 ve siklooksijenaz-2 (COX-2)'yi inhibe etmektedir. İnhibitör protein IκB, Tanskripsiyon nükleer Faktör NF-κB'nin sitoplazmik inhibitörüdür. Deksametazon, IκB transkripsiyonunu artırmak suretiyle NF-κB'yi inhibe ederek enflamatuvar sitokinlerin salınımını suprese etmektedir. Deksametazon ayrıca iNOS oluşumunu engellemektedir (37).

Son 35 yıldır, sepsis ve septik şok tedavisinde kortikosteroid kullanımının terapötik yararı, tartışma konusu olmaya devam etmektedir. *E. coli* veya lipopolisakkarit (LPS) infüzyonuyla oluşturulan sepsis ve septik şok modelli hayvan deneylerinde, steroid kullanımının yararına dair elde edilen sonuçlar, tartışmayı alevlendirmektedir. Steroidlerin yararını destekleyen görüşlerden biri de vaskülit, kollajen doku hastalıkları gibi sistemik hastalıklardaki immün baskılayıcı etkisi ve menenjit, tifoid ateş, *Pneumocystis carini* ve varicella pnömonisi tedavisindeki gözlenen faydalarına bağlanmakta. Her ne kadar literatürde, prospektif randomize klinik çalışmalarda, sepsis ve septik şokta yüksek doz steroid kullanımının yararı olmadığı gibi zararlı etkileri görülse de, fizyolojik dozlarda faydalı olabileceğini destekleyen çalışmalar mevcuttur (37,38,39,40,41).

Kortikosteroidler yüksek farmakolojik dozlarda, lenfositoliz yoluyla bakterisidal aktiviteyi azaltmakta, enfeksiyona eğilimi artırmaktadırlar; düşük dozlarda ise, konakçıyı oluşturan hiperimmün yanıtın zararlı etkilerinden korudukları düşünülmektedir.

Tsao ve ark. endotoksemik ratlarda düşük doz deksametazon (0,1 mg/kg) kullanarak, renal fonksiyonlarda düzelme gözlemlemişlerdir (37). Glaneman ve ark. hepatik pedikül oklüzyonlu parsiyel hepatektomi uygulanan ratlarda, metilprednizolon'un, iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığını ancak hepatik rejenerasyona herhangi bir etkisinin olmadığını saptadılar (39).

di Villa Bianca ve ark. endotoksemik ratlarda deksametazon'un (8 mg/kg) fenilefrin'e olan vasküler hiporeaktif cevabı, Ca⁺⁺ bağımlı K-ATP'az kanallarının modülasyonu yoluyla artırdığını saptamışlardır (40).

Duma ve ark., endotoksemik ratlarda LPS'den önce deksametazon verildiğinde, indüklenbilir nitrik oksit (iNOS) aktivitesini ve artmış plazma nitrit, nitrat düzeylerini baskıladığını ancak LPS sonrasında verildiğinde bu etkinin görülmediğini gözlemlemişlerdir (41). Kortikosteroidlerin fizyolojik stres dozlarında yararlı etkileri konusunda kesin bir hükme varabilmek için daha fazla sayıda araştırmaya gereksinim vardır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Tasarımı

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı ile Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Araştırma Ünitesi'nde yapılmıştır.

Deneylerde, 200-250 gram ağırlığında, Hacettepe Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nce üretilmiş, Sprague-Dawley cinsi, spesifik patojenden arınmış erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, standart laboratuvar yemi ve su ile *ad libitum* beslenmiş, denetimli sıcaklık (22⁰C), nem ve aydınlatmanın uygulandığı ortamlarda barındırılmıştır. Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi ve Mikrobiyoloji anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Sıçanlara uygulanan tüm cerrahi işlemler periton içine ketamin hidroklorür (90 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) karışımının verilmesi yoluyla sağlanan anestezi altında yapılmıştır. Cerrahi işlemlerde steril teknik uygulanmış, deri antisepsisi için % 2,5'lük povidon-iyodin kullanılmıştır.

Çalışmada her biri sekiz sıçandan oluşan toplam sekiz grup kullanılmıştır. Denek gruplarından dördü erken iskemi-reperfüzyon, diğer dördü de geç (24 saat) iskemi-reperfüzyon grubu olarak tasarlanmıştır.

Her bir rattan, deney süresinin bitiminde ve ötenazi öncesinde;

1. intestinal bakteri translokasyonu için mezenter, karaciğer ve dalaktan doku kültür örnekleri alındı.

2. endotoksemi için aortadan 1 mL kan örneği alındı; kan örneği santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Elde edilen serum endotoksin çalışması yapılınca dek -80°C 'de saklandı.

Ötenazi işlemi yüksek doz anestetik madde verilerek gerçekleştirildi.

Erken iskemi-reperfüzyon grupları:

- Grup A-1 (*sham* cerrahi, S-E). Anestezi ardından laparotomi ve hepatoduodenal ligament diseksiyonu yapıldı. Otuzbeş dakika (diğer erken iskemi-reperfüzyon gruplarındaki 20 dakika Pringle manevrası ve 15 dakika reperfüzyona karşılık) sonra doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.
- Grup B-1 (iskemi-reperfüzyon, İR-E). Anestezi ardından 20 dakika süreyle Pringle manevrası uygulandı. Ardından, 15 dakika süreyle reperfüzyon yapıldı. Doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.
- Grup C-1 (düşük doz steroid, DS-E). 0,1 mg/kg deksametazon periton içine enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra anestezi verildi ve laparotomi yapıldı. Yirmi dakika süreyle Pringle manevrası, ardından da 15 dakika süreyle reperfüzyon uygulandı. Doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.
- Grup D-1 (yüksek doz steroid, YS-E). 1,0 mg/kg deksametazon periton içine enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra anestezi verildi ve laparotomi yapıldı. Yirmi dakika süreyle Pringle manevrası, ardından da 15 dakika süreyle reperfüzyon uygulandı. Doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.

Geç iskemi-reperfüzyon grupları:

- Grup A-2 (*sham* cerrahi, S-G). Anestezi ardından laparotomi ve hepatoduodenal ligament diseksiyonu yapıldı. Otuzbeş dakika (diğer geç iskemi-reperfüzyon gruplarındaki 20 dakika Pringle manevrası ve 15 dakika reperfüzyona karşılık) sonra karın insizyonu kapatıldı. Yirmi dört saat sonra yeniden laparotomi yapıldı, doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.
- Grup B-2 (iskemi-reperfüzyon), İR-G). Anestezi ardından 20 dakika süreyle Pringle manevrası uygulandı. Ardından, 15 dakika süreyle reperfüzyon yapıldı. İnsizyon kapatıldı. Yirmi dört saat sonra yeniden laparotomi yapıldı, doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.
- Grup C-2 (düşük doz steroid, DS-G). 0,1 mg/kg deksametazon periton içine enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra (42) anestezi verildi ve laparotomi yapıldı. Yirmi dakika süreyle Pringle manevrası, ardından da 15 dakika süreyle reperfüzyon uygulandı. İnsizyon kapatıldı. Yirmi dört saat sonra yeniden laparotomi yapıldı, doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.
- Grup D-2 (yüksek doz steroid, YS-G). 1,0 mg/kg deksametazon periton içine enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra anestezi verildi ve laparotomi yapıldı. Yirmi dakika süreyle Pringle manevrası, ardından da 15 dakika süreyle reperfüzyon uygulandı. İnsizyon kapatıldı. Yirmi dört saat sonra yeniden laparotomi yapıldı, doku ve kan örnekleri alındı. Sıçanlar öldürüldü.

2.2. Bakteri Translokasyonu Çalışması

Mezenter lenf düğümleri, karaciğer ve dalaktan alınan yaklaşık birer gramlık doku örnekleri steril cam homojenizatörler içine yerleştirilerek tartıldı. Örnekler Brain Heart Infusion (BHI) besiyeri içinde homojenize edildikten sonra, 0.1 mL'lik homojenizat kanlı agar ve Eosine Methylene Blue agar (EMB) içeren besiyerlerine ekildi. Bütün besiyerleri 24-48 saat süreyle aerob ortamda 37⁰C'de enkübe edildi. Birim doku başına üreyen bakteri sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Colony Forming Unit (CFU) / g} = \frac{\text{koloni sayısı} \times \text{dilüsyon} \times 10}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

Üreme saptanan mikroorganizmaların koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz oluşturmaları değerlendirildi. Gram boyama yöntemi kullanılarak mikroskopik morfolojileri incelendi. Gram negatif enterik bakterilerin belirlenebilmesi amacıyla izolatların indol, oksidaz, katalaz, üreaz aktiviteleri, sitrat ve *triple sugar iron* (TSI) besiyerlerinde göstermiş oldukları tepkiler standart mikrobiyolojik yöntemlerle değerlendirildi. Bu yöntemlerle tanımlanamayan gram negatif bakterilerin kimliklenebilmeleri için API-E otomatize sisteminden yararlanıldı.

2.3. Endotoksin Çalışması

SIGMA firmasından temin edilen endotoksin kitleri (E-Toxate) kullanılarak *Limulus Amebocyte Lysate Test* (LAL) ile kanda endotoksin varlığı araştırıldı. 0,1 ml'lik

serum örneği, 0,1 mL endotoksin standart dilüsyonu ve 0,1 mL E-Toxate solüsyonu 10x75 mm'lik silikonsuz steril cam tüplere konulduktan sonra 37⁰C derecede bir saat enkübe edildi. Bir saatlik enkübasyondan sonra, tüpler 180 derece ters çevrilerek jel formasyonuna bakıldı. Pıhtılaşmış, sert ve tüpün 180 derece ters çevrilmesine olanak veren jel formasyonu pozitif, sıvı halde kalmış jel hali negatif test sonucu olarak değerlendirildi (43).

2.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel hesaplamalar için bilgisayarda SPSS v13.0 (SPSS Inc., 2005) istatistik programı kullanıldı. Grupların dağılımlarına bakıldı ve ortanca (minumum-maksimum) değerleri verilerek grupları karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

3. SONUÇLAR

| Tablo.1 Tüm gruplarda mezenter, karaciğer ve dalak kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar. | | | |
|--|---|--|---|
| Gruplar | Mezenter | Karaciğer | Dalak |
| S-E (n=8) | E.Coli (1) | Stafilokok (1) Streptokok (1) | |
| İR-E (n=8) | E.Coli (2) Enterokok (2) Stafilokok (2) Streptokok (1) | Enterokok (1) | Enterokok (1) Stafilokok (1) |
| DS-E (n=8) | E.Coli (2) Enerokok (1) | Stafilokok (2) Streptokok (1) | Streptokok (1) |
| YS -E (n=8) | E.Coli (2) Enterokok (1) Stafilokok (1) | E.Coli (1) Stafilokok (2) | E.Coli (2) |
| | | | |
| S-G (n=8) | E.Coli (3) Stafilokok (2) | E.Coli (1) Stafilokok (3) Streptokok (1) | Stafilokok (2) |
| İR-G (n=8) | E.Coli (6) Enterokok (3) Proteus (3) Stafilokok (3) | E.Coli (3) Enterokok (2) Proteus (2) Stafilokok (4) Streptokok (2) | E.Coli (4) Proteus (1) Stafilokok (1) Streptokok (1) |
| DS-G (n=8) | E.Coli (4) Proteus (2) Stafilokok (2) Streptokok (1) | E.Coli (1) Enterokok (1) Stafilokok (3) Streptokok (2) | E.Coli (1) Enterokok (1) |
| YS-G (n=8) | E.Coli (5) Enterokok (3) Proeus (2) Stafilokok (3) Streptokok (3) | E.Coli (2) Enterokok (1) Proteus (1) Stafilokok (4) Streptokok (1) | E.Coli (1) Stafilokok (3) Streptokok (1) |

* Pozitif kolonik kültür sayıları 1×10^4 ile 10×10^4 arasındaydı.

S-E (Grup A-1, sham cerrahi)

İR-E (Grup B-1, iskemi-repefüzyon)

DS-E (Grup C-1, düşük doz steroid)

YS-E (Grup D-1, yüksek steroid)

S-G (Grup A-2, sham cerrahi)

İR-G (Grup B2, iskemi-reperfüzyon)

DS-G (Grup C-2, düşük doz steroid)

YS-G (Grup D-2, yüksek doz steroid)

Mezenter, karaciğer ve dalaktan alınan doku örneklerindeki bakteri translokasyonu oranları her doku için ayrı ayrı ve her grup için toplam olarak Tablo 1’de gösterilmiştir. Tablo 2’de deneklerin aort’undan alınan kandaki endotoksin görülme oranları da belirtilmiştir.

Tablo 2. Gruplardaki bakteri translokasyonu ve endotoksin görülme oranları

| Gruplar | Bakteri translokasyonu | | | | | | | | Endotoksin | |
|---------------------------------------|------------------------|-------|-------|------|----------|------|---------|-------|------------|------|
| | Karaciğer | | Dalak | | Mezenter | | Toplam* | | N | % |
| | N | % | N | % | N | % | n | % | | |
| Erken iskemi-reperfüzyon grubu | | | | | | | | | | |
| S-E | 1 | 12,5 | 0 | 0 | 1 | 12,5 | 2 | 25,0 | 1 | 12,5 |
| İR-E | 2 | 25,0 | 2 | 25,0 | 3 | 37,5 | 4 | 50,0 | 4 | 50,0 |
| DS-E | 2 | 25,0 | 1 | 12,5 | 2 | 25,0 | 3 | 37,5 | 2 | 25,0 |
| YS-E | 2 | 25,0 | 2 | 25,0 | 3 | 37,5 | 3 | 37,5 | 4 | 50,0 |
| Geç iskemi-reperfüzyon grubu | | | | | | | | | | |
| S-G | 3 | 37,5 | 2 | 25,0 | 3 | 37,5 | 4 | 50,0 | 3 | 37,5 |
| İR-G | 8 | 100,0 | 6 | 75,0 | 6 | 75,0 | 8 | 100,0 | 7 | 87,5 |
| DS-G | 5 | 62,5 | 4 | 50,0 | 4 | 50,0 | 6 | 75,0 | 5 | 62,5 |
| YS-G | 6 | 75,0 | 6 | 75,0 | 5 | 62,5 | 7 | 87,5 | 6 | 75,0 |

S-E (Grup A-1, sham cerrahi)

İR-E (Grup B-1, iskemi-reperfüzyon)

DS-E (Grup C-1, düşük doz steroid)

YS-E (Grup D-1, yüksek steroid)

S-G (Grup A-2, sham cerrahi)

İR-G (Grup B2, iskemi-reperfüzyon)

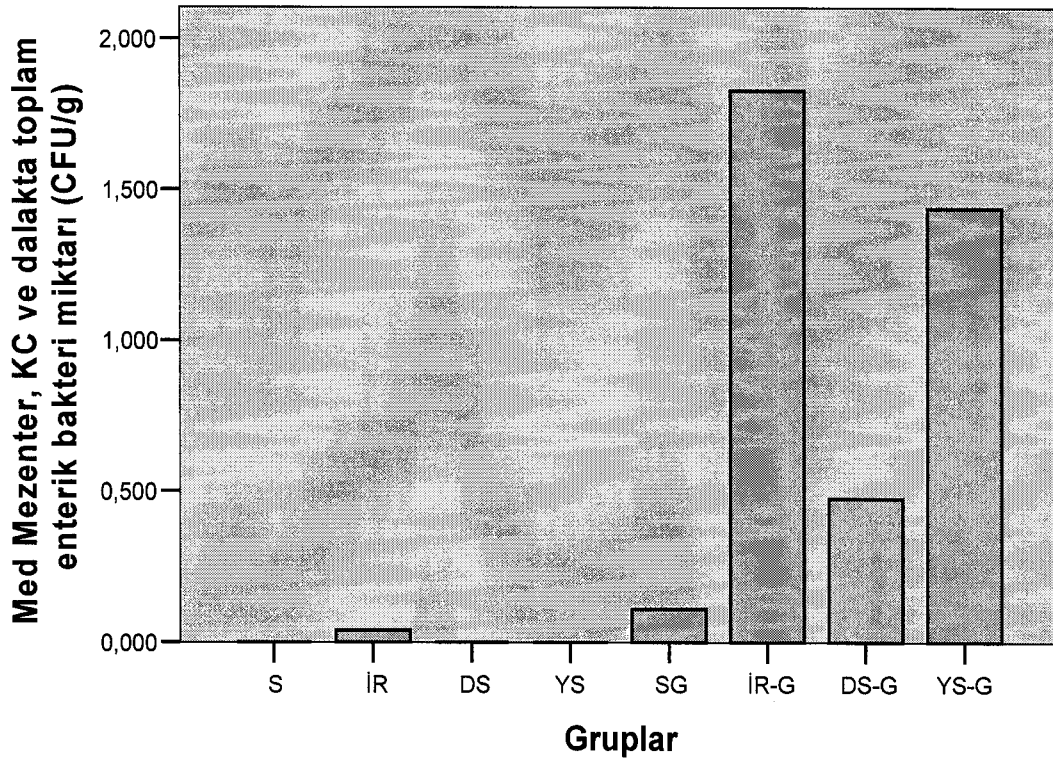
DS-G (Grup C-2, düşük doz steroid)

YS-G (Grup D-2, yüksek doz steroid)

*Karaciğer, dalak ve mezenterdeki toplam bakteri translokasyonu

Hem erken ve hem de geç iskemi reperfüzyon gruplarında bakteri translokasyon ve endotoksin görülme oranlarının sham gruplarında (S-E, S-G) en düşük; iskemi-reperfüzyon gruplarında (İR-E, İR-G) en yüksek olduğu görülmektedir. Düşük steroid verilen gruplarında (DS,DS-G) bakteri translokasyonu ile endotoksin görülme oranları, sham gruplarına göre daha yüksek; iskemi reperfüzyon (İR,İR-G) ve yüksek steroid (YS,YS-G) gruplarına göre daha az görülmektedir. (Tablo.2).

Şekil.1 Tüm gruplarda mezenterde, karaciğerde ve dalakta toplam enterik bakteri miktarı (CFU/g)



Geç İR grubunun alt gruplarındaki bakteri translokasyon miktarları aşağıda belirtilmiştir (Tablo.3).

| Gruplar | Mezenterde E.Coli | Mezenterde toplam enterik bakteri | Karaciğerde toplam enterik bakteri | Dalakta toplam enterik bakteri | Mezenter,karaciğer ve dalakta toplam enterik bakteri |
|---------|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--|
| S-G | 0,00 (0-4,77) | 0,00 (0-4,78) | 0,00 (0-4,43) | 0,00 (0-4,30) | 4,04 (0-4,96) |
| İR-G | 4,82 (0-4,93) | 5,04 (0-5,27) | 4,76 (4,44-5,04) | 4,57 (0-4,78) | 5,26 (4,62-5,40) |
| DS-G | 4,38 (0-4,78) | 4,54 (0-4,99) | 4,04 (0-4,57) | 0,00 (0-4,68) | 4,67 (0-5,22) |
| YS-G | 4,81 (0-4,92) | 5,02 (0-5,14) | 4,34 (0-4,70) | 3,30 (0-4,86) | 5,15 (0-5,35) |

*Değerler ortanca (minimum-maksimum) olarak belirtilmiş ve logaritmik olarak verilmiştir (log₁₀).

Nicel bakteri translokasyonu (CFU/g) açısından gruplar çoklu karşılaştırıldığında mezenterde E.Coli miktarı, mezenterde ve karaciğerde toplam enterik bakteri miktarları ve toplamda (mezenter, karaciğer ve dalak) toplam enterik bakteri miktarları bakımından Geç iskemi reperfüzyon alt grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (Tablo.4).

| Grupların karşılaştırılması | Mezenterde E.coli translokasyonu | Mezenterde toplam enterik bakteri** translokasyonu | Karaciğerde toplam enterik bakteri** translokasyonu | Mezenter,karaciğer, dalakta toplam enterik bakteri** translokasyonu |
|-----------------------------|----------------------------------|--|---|---|
| <i>P</i> değeri | | | | |
| S-G ile İR-G | 0,01* | 0,01* | 0,001* | 0,001* |
| S-G ile DS-G | 0,67 | 0,50 | 0,28 | 0,27 |
| S-G ile YS-G | 0,05* | 0,04* | 0,04* | 0,01* |
| İR-G ile DS-G | 0,04* | 0,04* | 0,001* | 0,001* |
| İR-G ile YS-G | 0,63 | 0,50 | 0,03* | 0,09 |
| DS-G ile YS-G | 0,11 | 0,16 | 0,31 | 0,15 |

• * $P < 0,05$, Kruskal-Wallis

• ** E.coli, enterobakter, proteus, stafilokok, streptokok

S-G (Grup A-2, sham cerrahi)

İR-G (Grup B2, iskemi-reperfüzyon)

DS-G (Grup C-2, düşük doz steroid)

YS-G (Grup D-2, yüksek doz steroid)

Geç iskemi reperfüzyon üst grubunun alt gruplarının (S-G, İR-G,DS-G,YS-G) karşılaştırmalarda, S-G grubunda istatistiksel olarak İR-G ve YS-G gruplarına göre mezenterde E.Coli miktarı (CFU /g), mezenterde karaciğerde toplam enterik bakterileri miktarı ile toplamda (mezenter,karaciğer,dalak) enterik bakteri miktarı anlamlı olarak daha az saptanmıştır ($P<0,05$).Bu anlamlı fark S-G ile DS-G arasında görülmemektedir. DS-G ile İR-G arasında yapılan karşılaştırmada mezenterde E.Coli miktarı, mezenterde ve karaciğerde toplam enterik bakteri miktarı ve toplamda(mezenter,karaciğer, dalak) enterik bakteri miktarı DS-G grubunda anlamlı olarak daha az saptanmıştır ($P<0,05$). Oysa YS-G ile İR-G arasındaki ikili karşılaştırmada anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo.4).

Tüm gruplarda toplam (mezenter ,karaciğer, dalak) enterik bakteri translokasyon miktarı (CFU/g) ile endotoksin görülme oranları arasında bir korelasyon olup olmadığını ortaya koyabilmek için denekler kanda endotoksin varlığına göre sınıflandırıldı (var ve yok) (Tablo.5) Endotoksin (+) ve (-) deneklerdeki toplam bakteri translokasyonu miktarlarının (CFU/mg) ortancaları karşılaştırıldığında endotoksin (+) deneklerdeki nicel bakteri translokasyonunun endotoksin (-) deneklerdekine göre anlamlı derecede çok olduğu saptandı ($P<0,01$) (Şekil 2)

Tablo 5. Tüm gruplarda toplam* nicel enterik bakteri translokasyonu ve kanda endotoksin varlığı

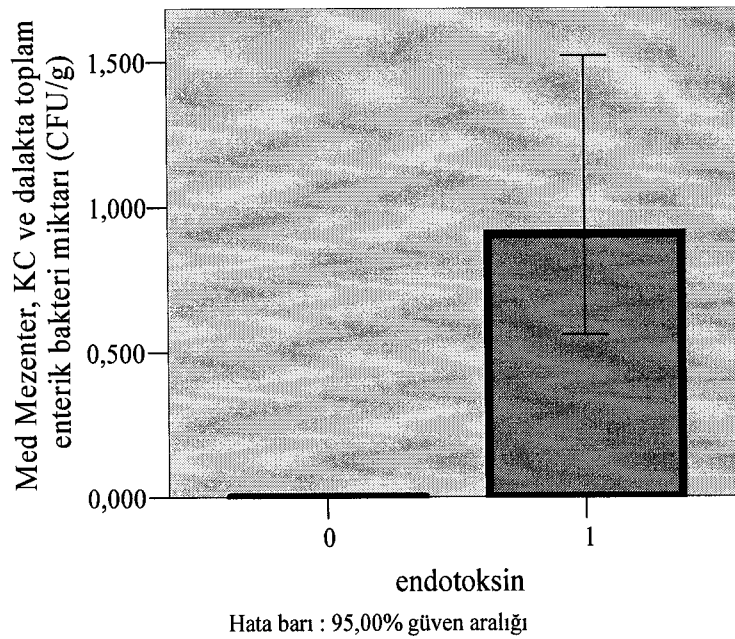
| Kanda endotoksin | Bakteri translokasyonu (CFU/mg) Ortanca (minimum-maksimum) |
|------------------|--|
| Yok (n=32) | 0,00 (0-4,66)** |
| Var (n=32) | 4,95 (0-5,40)** |

** P<0,01 Mann-Whitney U

* E.coli, enterokok, proteus, stafilokok, steptokok

*** Değerler logaritmik olarak verilmiştir (log₁₀)

Şekil.2 Tüm gruplarda toplam nicel enterik bakteri translokasyonu ve kanda endotoksin varlığı



4. TARTIŞMA

Literatürde Pringle manevrası'na bağlı gelişen intestinal bakteri translokasyonu ve endotoksemiye ait tek araştırma, Filos ve ark.'nın ratlarda gerçekleştirmiş oldukları deneydir. Filos ve ark., Pringle manevrası sonrası erken dönemde mezenterik lenf nodları (MLN) ve karaciğerde, geç dönemde ise sadece MLN'nda anlamlı bakteriyel translokasyon artışı saptamışlardır. Hem portal hem de sistemik (aortik) kan endotoksin düzeylerinde anlamlı artış tespit ettiler. Ayrıca ileal kriplerde erken ve geç dönemde anlamlı apoptosis artışı gözlemlenildi. (26)

Son yıllarda, sepsis ve septik şok tedavisinde fizyolojik stres dozunda steroid kullanımı yeniden güncellik kazanmıştır. Bu konuda literatürde, çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmış ve halen de yapılmaktadır (35,36). Steroidlerin karaciğer iskemisine karşı koruyucu etkisi olduğunu idda eden ilk çalışmalar 1975'li yıllara dayanmaktadır (44,45). Daha sonraki yıllarda steroidlerin yarar sağlamadığı hatta zararlı olduğunu idda eden çalışmalar (46,47) olduğu gibi faydalı olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (48) Yaptığımız literatür taramasında, Pringle Manevrası'ndan sonra bakteriyel translokasyon ve endotoksemi üzerine steroidlerin etkisini araştıran çalışmaya rastlamadık.

Steroidler, Pringle manevrasına bağlı gelişen bakteriyel translokasyon ve endotoksemiye önleyebilir ya da azaltabilir mi? Steroidler, fosfolipazA₂ ve siklooksijenaz inhibisyonu yoluyla araşidonik asit metabolitleri prostaglandinler ve güçlü bir vazokonstriktör olan tromboksan A₂'yi inhibe etmektedirler. Pringle manevrası sonrasında reperfüzyon döneminde görülen hipotansiyon, PGF₁ α , tromboksan ve adenosin gibi vazoaktif maddelerin aktivasyonuna bağlanmaktadır (7). Fizyolojik stres

dozunda steroid kullanımı, bu vazoaaktif maddeleri inhibe ederek hipotansiyonu önleyebilir ve dolayısıyla karaciğerin daha iyi perfüze olması sağlanabilir. Sentetik bir steroid olan deksametazon, inhibitör proteini (IκB) artırmak suretiyle transkripsiyon nükleer faktörü (NF-κB) inhibe ederek enflamatuar sitokinlerin salınımını suprese etmektedir(6).Pringle manevrası sonrasında reperfüzyon dönemindeki proinflamatuvar sitokin salınımı, deksametazon'un bu etkisiyle suprese edilerek hasar azaltılabilir.

Steroidlerin, Pringle manevrası öncesinde verilme nedeni, Duma ve arkadaşlarının deneysel çalışmasının (41) referans alınmasıdır. Zira, bu çalışmada lipopolisakkarit öncesinde dexametazon verilen grupta indüklenbilir nitrikoksit aktivitesinde baskılanma ve plazma nitrit,nitrat düzeylerinde düşme görülürken, lipopolisakkarit sonrasında deksametazon verilen grupta bu etki görülmemiştir.

Tsao ve arkadaşları, endotoksemik ratlarda düşük doz deksametazon (0,1mg/kg) kullanarak sistemik dolaşım ve renal fonksiyonlarda düzelme saptamışlardır (37). Biz de çalışmamızda 0,1mg/kg deksametazon değerini, düşük doz için referans aldık.

Çalışmamızda, düşük (0,1mg/kg) ve yüksek doz(1,0mg/kg) deksametazonun Pringle manevrası sonrasında erken ve geç dönem etkilerini araştırmak için erken ve geç iskemi grupları oluşturduk.

Çalışma sonuçlarını yorumladığımızda, 20 dakika iskemi ve 15 dakika reperfüzyon uygulanan erken İR gruplarında, bu sürenin saptanabilir translokasyon ortaya çıkması için çok kısa olduğunu düşünmekteyiz. Diğer yandan 24 saat reperfüzyon uygulandığında, bulgular daha belirgin hale gelmiştir. Bu sonuçlara göre, düşük doz steroid uygulaması, hepatik İR hasarına bağlı translokasyonu anlamlı olarak azaltmaktadır. Yüksek doz steroid uygulamasında aynı oranda etki görülmemiştir.

Düşük steroid uygulamasının translokasyonu azaltıcı etkisi, hem translokasyon oranını azaltma yönünde, hem transloke olan bakteri miktarını azaltma yönünde olmuştur. Ayrıca düşük doz steroid ile kanda endotoksin saptanma oranı da azalmıştır.

Bakteriyel translokasyon, majör cerrahi ve travma sonrası hastalarda sepsis kaynağı olabileceği gibi sistemik enflamatuvar yanıt sendromu ve çoklu organ yetmezliğini başlatan bir faktör olarak da görülmektedir. Bu nedenle, bu olayın önlenmesinin bu tür hastalarda sağkalımı artıracağı öngörülebilir.

Genel bilgiler kısmında bahsedildiği gibi sepsis ile ilgili çalışmalarda düşük doz steroid kullanımının yararlı etkilerine dair çalışmalar mevcuttur (37,38,39,40).

Düşük dozda (0.1mg/kg) kullandığımız steroidin , fosfolipazA2 ve siklooksijenaz inhibisyonu yoluyla reperfüzyon döneminde oluşan hipotansiyonu önleyerek, transkripsiyon nükleer faktörü (NF-κB) baskılamak suretiyle, enflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ederek bakteriyel translokasyon ve endotoksemiye azaltıcı etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Majör cerrahi ve travma gibi durumlarda göreceli olarak sürrenal yetmezliği oluşabilmektedir. Buradan yola çıkılarak düşük doz steroidlerin bir anlamda replasman sağlayarak fayda gösterdiği de düşünülebilir (49).

Bu tedavi yaklaşımının kliniğe uygulanabileceği bir çok durum vardır. Majör karaciğer rezeksiyonları ve transplantasyonlarda, bulgularımıza dayanılarak ameliyat öncesinde düşük doz steroid verilmesi düşünülebilir. Ancak çalışma bulgularının kliniğe uyarlanmadan önce ek başka çalışmalarla desteklenmesi uygun olacaktır. Ancak acil cerrahi gerektiren karaciğer yaralanmalarında işlem öncesi steroid verilmeyeceği için işlem sonrası verilecek steroidlerin etkileri araştırılmalıdır.

Steroidlerin, benzer durumlarda hangi dozda ve kaç kere verilmesi gerektiği ayrı araştırma konularıdır.

5. VARGI

Karaciğere 20 dakika Pringle manevrası ve 24 saat reperfüzyon uygulanmasından önce 0,1mg/kg deksametazon (düşük doz steroid) verildiğinde bakteriyel translokasyon düzeyinin anlamlı azaldığı saptandı.

Karaciğere Pringle manevrası öncesinde 1,0mg/kg deksametazon (yüksek doz steroid) verildiğinde, bakteriyel translokasyonu düşük doz steroid gibi anlamlı azaltmadığı görüldü.

Kanda endotoksin varlığı ile transloke olan bakteri miktarı arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı.

6. KAYNAKLAR

1. Heriot AG, Karanjia ND. A review of techniques for liver resection. *Ann R Coll Surg Engl* 2002;84:371-380.
2. Huguet C, Nordlinger B, Golopin JJ, Bloch P, Gallot D. Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. *Surg Gynecol Obstet* 1978;147:689-693.
3. Nagasue N, Uchida M, Kubota H, Hayashi T, Kohno H, Nakamura T. Cirrhotic livers can tolerate 30 minutes ischemia at normal environmental temperature. *Eur J Surg* 1995;161:181-186.
4. Hannoun L, Borie D, Delva E, Jones D, Valliant JJC, Nordlinger B. Liver resection with normothermic ischemia exceeding one hour. *Br J Surg* 1993;10:1161-1165.
5. Peralta C, Serafin A, Zabalegui LF, Wu ZY, Catafau JR. Liver ischemic preconditioning: a new strategy for the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplantation Proceedings* 2003;35:1800-1802.
6. Detroz B, Honore P, Denoiseux C, Jacquet N. Biology, physiology and physiopathology of clamping during liver surgery. *Hepatogastroenterology* 1998;45:357-363.
7. Fischer S, Conzen PF, Nuscheler M, Schauer R, Peter K. Influence of norepinephrine and dopamine on splanchnic blood flow and oxygen delivery during abdominal surgery: a randomized, single-blind, comparative study. *ASA Meeting Abstracts* 2002; A-153
8. Chouker A, Schachtner T, Schauer R, Dugas M, Löhe F, Martignoni A, Pollwein B, Niklas M, Rau HG, Jauch KW, Peter K, Thiel M. Effects of Pringle maneuver and

- ischemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *British Journal of Anaesthesia* 2004;93(2):204-211.
9. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-936.
 10. Ariu S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepaticobiliary Pancreat Surg* 2003;10:189-194.
 11. Kim YI. Ischemia–reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepaticobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 195-199
 12. Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, Warner RL, Cheadle WG, Ward PA, Edwards MJ. Requirement for interleukin 12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 1999;30:1448-1453.
 13. Sawaya DE, Zibari GB, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC. P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherence of leucocytes in hepatic venules after ischemia reperfusion. *Shock* 1999;12:227-232.
 14. Okaya T, Lentsch AB. Cytokine cascades and the hepatic inflammatory response to ischemia and reperfusion. *Journal of Investigative Surgery* 2003;16:141-147.
 15. Hsu CM, Wang JS, Liu CH, Chen LW. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock* 2002;17(4):280-285.
 16. Schemmer P, Mehrabi A, Kraus T, Sauer P, Gutt C, Uhl W, Büchler MW. New aspects on reperfusion injury to liver-impact organ harvest. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(Suppl 4):26-35.

17. Wiest R, Guadalupe GT, Bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41(3):422-433.
18. Xing H, Li L, Xu K, Shen T, Chen Y, Sheng J, Yu Y, Chen Y. Intestinal microflora in rats with ischemia/reperfusion liver injury. *Journal of Zhejiang University Science* 2005;6B(1):14-21.
19. Aranow JS, Fink MP. Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. *Br J Anaesth* 1996;77:71-81.
20. Spaeth G, Gottwald T, Specian RD, Mainous MR, Berg RD, Deitch EA. Secretory immunoglobulin A, intestinal mucin and mucosal permeability in nutritionally induced bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1994;220:798-808.
21. 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. *Journal of Surgical Research* 2003;115(1):18-23.
22. Zuniga VL, Bartoli R, Planas R, Hofmann AF, Vinado B, Hagey LR, Hernandez JM, Mane J, Alvarez M, Ausina V, Gassull MA. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 2003;37(3):551-557.
23. Karsten TM, van Gulic TM, Spanjaard L, Bosma A, van der Bergh Weeman MA, Dingemans KP, Dankert J, Gouma DJ. Bacterial translocation from the biliary tract to blood and lymph in rats with obstructive jaundice. *Journal of Surgical Research* 1998;74:125-130.
24. Chen S-MS, Chau P, Haris HB. Obstructive jaundice alters Kupffer cell function independent of bacterial translocation. *Journal of Surgical Research* 1998;80:205-209.

25. Yüksek NY, Koloğlu M, Dağlar G, Doğanay M, Dolapçı İ, Bilgihan A, Dolapçı M, Kama NA. Intestinal ischemia-reperfusion injury augments intestinal mucosal injury and bacterial translocation in jaundiced rats. *Hepatogastroenterology* 2004;51(55):171-175.
26. Filos K, Kirkilesis I, Spiliopoulou I, Scopa CE, Nikolopoulou V, Kouraklis G, Constantine EV. Bacterial translocation, endotoxemia and apoptosis following Pringle maneuver in rats. *Injury* 2004; 35: 35-43.
27. Zülfikaroğlu B, Zülfikaroğlu E, Özmen M, Özalp N, Berkem R, Erdoğan S, Besler HT, Koç M, Korkmaz A. The effect of immunonutrition on bacterial translocation and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. *Clinical Nutrition* 2003;22(3):277-281.
28. Sileri P, Sica GS, Genitileschi P, Venza M, Benavoli D, Jarzembowski T, Manzelli A, Gaspari AL. Melatonin reduces bacterial translocation after intestinal I/R injury. *Transplantation Proceedings* 2004;36:2944-2946.
29. Scopa CD, Koureleas S, Tsamandas AC, Spiliopoulou I, Alexandrides T, Filos K, Vagianos CE. Beneficial effects of growth hormone and insuline-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats. *J. Am.Coll. Surg* 2000; 190(4): 423-431
30. Sungurtekin H, Özden A, Kaleli İ, Sungurtekin U, Gönüllü M. Somatostatin: possible cause of bacterial translocation in obstructive jaundiced rats. *J Hepatobiliary Pancreatic Surgery* 1999;6:405-409.

31. Jones W, Minei JP, Richardson RP, Fahey III TC, Calvano ST, Antonacci AC, Shires III T, Shires GT. Pathophysiologic glucocorticoid elevations promote bacterial translocation after thermal injury. *Infection and Immunity* 1990;58(10):3257-3261.
32. Gianotti L, Alexander W, Fukushima R, Pyles T. Steroid therapy can modulate gut barrier function, host defense, and survival in thermally injured mice. *J Surg Research* 1996;62(1):53-58,
33. Wenzl HH, Schimpl G, Feierl G, Steinwender G. Effect of prenatal cortisone on spontaneous bacterial translocation from gastrointestinal tract in neonatal rat. *Dig Dis Sci* 2003;48(6):1171-6.
34. Carlet J, From mega to more reasonable doses of corticosteroids: a decade to recreate hope. *Crit Care Med* 1999;27:672-674.
35. Balk RA, Steroids for septic shock. *Chest* 2003;123:490-499.
36. Kimura RE, Beno DWA. The effect of 21-aminosteroids on endotoxin-induced TNF-alpha release. *Crit Care Med* 1999;27(6):1058-1059.
37. Tsao CM, Ho ST, Chen A, Wang JJ, Li CY, Tsai SK, Wu CC. Low dose dexamethasone ameliorates circulatory failure and renal dysfunction in conscious rats with endotoxemia. *Shock* 2004;21(5):484-491.
38. Cronin L, Cook DJ, Carlet J. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995;23:1430-1439.
39. Glanemann M, Münchow S, Schirmeier A, Al-Abadi H, Lippek F, Langrehr JM, Dietel M, Neuhaus P, Nussler AK. Steroid administration before partial hepatectomy with temporary inflow occlusion does not influence cyclin D1 and Ki-67-related liver regeneration. *Langenbeck Arch Surg* 2004;389:380-386.

40. di Villa Bianca RE, Lippolis L, Autore G, Popolo A, Marzocco S, Sorrentino L, Pinto A, Sorrentio R. Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo modulating ATP-sensitive potassium channels activity. *British Journal Of Pharmacology* 2003;140:91-96.
41. Duma D, Silva-Santos JE, Assreuy J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats. *Crit Care Med* 2004;32(11):2304-2309.
42. De Bosscher K, Schmitz Lienhard M, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1997; 94: 13504-13509
43. Sakai H, Hisamoto S, Fukutomi I, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E, Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin vesicles by limulus amebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004;93(2):310-321.
44. Shimada M, Saitoh A, Kano T, Takenaka K, Sugimachi K. The effect of perioperative steroid pulse on surgical stress in hepatic resection. *Int Surg.* 1996; 81: 49-51
45. Yamashita Y, Shimada M, Hamatsu T, Rikimaru T, Tanaka S, Shirabe K, et al. *Arch Surg* 2001 ; 136 : 328-333
46. Debonera F, Krasinkas A.M, Gelman A.E, Aldeguer X, Que X, Shaked A, Olthoff K.M. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation. *Hepatology* 2003; 38: 1563-157

47. Sileri P, Schena S, Fukada J, Rastellim C, Pirenne J, Benedetti E, et al. Corticosteroids enhance hepatic injury following ischemia-reperfusion. *Transplant Proc.* 2001; 33: 3712
48. Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R, Münchow S, Dikopoulos N, Lippek F, Langrehr J, Dietel M, Neuhaus P, Nussler A.K. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia / reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135: 203-214
49. Hattori Y, Murakami Y, Atsuda H, Minamino N, Kangawa K, Kasai K. Glucocorticoid regulation of adrenomedullin in a rat model of endotoxic shock. *Life Sciences* 1998;13:181-189.