



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

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT
MODELİNDE GLUKAGON LİKE PEPTİD 2' NİN
BAKTERİYEL TRANSLOKASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Bülent HALAÇLAR

KAYSERİ – 2010



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT
MODELİNDE GLUKAGON LİKE PEPTİD 2’NİN
BAKTERİYEL TRANSLOKASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Bülent HALAÇLAR

**Danışman
Doç. Dr. Alper Celal AKCAN**

KAYSERİ – 2010

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitim dönemim boyunca beni fedakârca destekleyen başta aileme, eşim Mesude ve kızım Betül HALAÇLAR’a;

Çalışmalarımın tüm aşamalarında ve cerrahi eğitimimde her türlü akademik desteği veren tez danışmanı hocam Doç. Dr. Alper Celal AKCAN’a;

Bana cerrahi sevgisini aşılayan, cerrahinin fedakârlık, sevgi, insanlık olduğunu öğreten saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Yücel ARITAŞ, Prof.Dr. Zeki YILMAZ, Prof.Dr. Erdoğan SÖZÜER, Prof. Dr. Engin OK, Doç. Dr. Can KÜÇÜK, Doç. Dr. Hızır AKYILDIZ, Yrd. Doç. Dr. Tarık ARTIŞ ve Öğr. Gör. Dr. Muhammet AKYÜZ'e;

Asistanlık eğitimim süresince çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma;

Tez çalışmamda katkısı olan Prof. Dr. Sebahattin MUHTAROĞLU (Biyokimya AD), Prof. Dr. Duygu EŞEL (Mikrobiyoloji AD), Doç. Dr. Kemal DENİZ (Patoloji AD), Öğr. Gör. Ferhan ELMALI (Biyoistatistik AD)’ya;

Deneysel aşamada her türlü desteklerini gördüğüm DEKAM personeline;

Tablo, grafik vs. hazırlanması ve tez redaksiyonunda yardımını aldığım Cihan ER’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR	iv
TABLO ve RESİM LİSTESİ	vi
ŞEKİL ve GRAFİK LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KOLON ANATOMİSİ	3
2.2. KOLON FİZYOLOJİSİ	4
2.2.1. Su ve Elektrolit Değişimi	4
2.3. KOLON MİKROFLORASI	6
2.4. İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞI (İBH)	7
2.5. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON	10
2.6. GLUKAGON LİKE PEPTİD 2	13
2.7. SİTOKİNLER.....	18
2.7.1. Tümör Nekrozis Faktör – Alfa.....	19
2.8. MYELOPEROKSİDAZ (MPO)	20
2.9. ENDOTOKSİN.....	20
3. MATERYAL ve METOD	22
3.1. GRUPLAR	23
3.2. CERRAHİ İŞLEM	23
3.3. MAKROSKOPİK SKORLAMA.....	25
3.4. MİKROSKOPİK SKORLAMA	26
3.5. MYELOPEROKSİDAZ (MPO) AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ	26
3.6. SERUM TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR – ALFA (TNF- α) DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ	27
3.7. PLAZMA ENDOTOKSİN ÖLÇÜMÜ	27
3.8. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON SAPTANMASI.....	27
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	28

4. BULGULAR	29
4.1. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI	29
4.2. MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	30
4.3. TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR- α	32
4.4. PLAZMA ENDOTOKSİN SONUÇLARI.....	33
4.5. MİYELOPEROKSİDAZ SONUÇLARI	33
4.6. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON SONUÇLARI	34
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR	43
7. KAYNAKLAR	44

KISALTMALAR

ASA	: Asetil Salisilik Asit
CH	: Crohn hastalığı
CMV	: Cytomegalovirüs
CRP	: C-Reaktif Protein
DEKAM	: Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
DİC	: Dissemine İntravasküler Koagülasyon
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DP-4	: Dipeptidilpeptidaz 4
GLP 2	: Glukagon like peptid 2
GLP 2R	: Glukagon like peptid 2 Reseptörü
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
IL-1	: İnterlökin 1
IL-2	: İnterlökin 2
IL-4	: İnterlökin 4
IL-5	: İnterlökin 5
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
IL-10	: İnterlökin 10
IL-11	: İnterlökin 11
IL-12	: İnterlökin 12
IL-13	: İnterlökin 13
IL-18	: İnterlökin 18
İBH	: İnflamatuvar barsak hastalıkları

İMA	: İnfrierior mezenterik arter
LPS	: Lipopolisakkarit
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleks
MLN	: Mezenterik Lenf Nodu
MPO	: Myeloperoksidaz
NAC	: N–asetil sistein
NK	: Natural Killer
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
SF	: Serum Fizyolojik
SMA	: Süperior Mezenterik Arter
SOD	: Süperoksid Dismutaz
Th	: T Helper
TNBS–E	: Trinitrobenzen sulfonik asit–etanol
TNF–α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
ÜK	: Ülseratif kolit

TABLO ve RESİM LİSTESİ

Tablo 1. Kolonik mukozadaki makroskopik bulguların sınıflandırılması	25
Tablo 2. Kolonik mukozadaki mikroskopik bulguların sınıflandırılması	26
Tablo 3. Gruplara göre bakteriyel translokasyon. Bakteriyel translokasyonu karşılaştırmak için İki oran testi kullanılmıştır. Pozitif testlerin sayısı tüm hayvanlar için test edildi (her grupta 7 sıçan). ($P<0.05$).....	35
Resim 1. TNBS–E Uygulanması	23
Resim 2. Anestezi uygulaması.....	24
Resim 3. Inferior vena kavadan kan alınması.....	25
Resim 4. TNBS–E (kolit) grubunda izlenen inflamasyon ve nekroz görünümü.....	30
Resim 5. Kontrol grubundan normal kolonik epitel görünümü.....	31
Resim 6. Kolit grubundan epitel hücre kayıpları, kriptit, erozyon, lenfoid follikül görünümü ve mukozal ülserasyon (Grade 2)	31
Resim 7. Tedavi grubunda epitelyumda orta derecede ödem, hafif inflamasyon görünümü lamina propriada nötrofil infiltrasyonu (Grade 1)	32

ŞEKİL ve GRAFİK LİSTESİ

Şekil 1. GLP 2 Peptid'inin bioaktivitesinin düzenlenmesi	15
Şekil 2. GLP 2 sekresyonunu etkileyen faktörlerin şematik olarak gösterilmesi	16
Şekil 3. GLP 2'nin Gastrointestinal Mukoza Epiteli Üzerine Etkileri	17
Grafik 1. Gruplara göre makroskopik hasar skoru değerleri. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p<0.05$).	29
Grafik 2. Gruplara göre mikroskopik hasar skoru değerleri. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p<0.05$).	30
Grafik 3. Gruplara göre TNF- α değerleri. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p<0.05$).	32
Grafik 4. Gruplara göre Plazma Endotoksin değerleri. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p<0.05$).	33
Grafik 5. Gruplara göre MPO değerleri. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p<0.05$).	34

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
GLUKAGON LİKE PEPTİD 2' NİN BAKTERİYEL TRANSLOKASYON
ÜZERİNE ETKİSİ**

ÖZET

Amaç: İnflamatuar barsak hastalıklarının patogeneğinde epitelyal fonksiyon bozuklukları ile birlikte proinflamatuar sitokinler, oksidan ajanlar ve kemokinlerin önemli rolü olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalar ile göstermiştir. Bu çalışmada kolit sürecinin patofizyolojisinden yola çıkarak, GLP 2'nin inflammatuar barsak hastalıklarında antiinflammatuar etki ve intestinal permeabilityi azaltarak bakteriel translokasyon üzerine etkisi araştırılıp kolit tedavisinde yeni bir teropatik ajanın kullanılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metod: Çalışmada ağırlıkları 225–290 gram arasında değışen, 28–32 haftalık 21 adet erkek Wistar–Albino rat kullanıldı. Gruplar randomize olarak her biri 7'şer ratdan oluşan 3 gruba (kontrol, kolit ve tedavi grupları) ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara rektal yoldan serum fizyolojik (SF) verildi. Kolit grubuna trinitrobenzen sülfonik asit ve etanol karışımı (TNBS–E) rektal yoldan verilerek kolit oluşturuldu. Son olarak, tedavi grubuna ise TNBS–E ile kolit oluşturulduktan bir gün sonra başlanarak 7 gün boyunca günde bir defa subkutan olarak ringerli laktat solusyonu içinde çözünmüş 50 mikrogram/kg GLP 2 verildi. Yedi gün sonra anestezi altında orta hat insizyonla laparotomi yapıldı. Öncelikle vena kava inferiordan ve vena portadan kan örnekleri alınıp santrifigasyona tabi tutuldu. Ayrıca kan kültürü için kültür şişelerine kan alındı. Eş zamanlı olarak sol kolektomi yapıldı. Kolondaki inflamasyon makroskopik ve mikroskopik olarak değeriendirildi ve derecelendirildi. Bakteriyel translokasyonu değeriendirmek için doku kültürü amacıyla karaciğer, dalak, mezenterik lenf nodlarından (MLN) doku örneklemeleri yapıldı. Doku düzeyinde myeloperoksidaz (MPO), serumda ise tümör nekroz faktör alfa (TNF– α), plazma endotoksin düzeylerine bakıldı.

Bulgular: Kolit ve tedavi grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında makroskopik ve mikroskopik açıdan belirgin farklılık mevcuttu ($p<0.05$). Tedavi grubunda doku düzeyinde ölçülen MPO düzeyleri kolit grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$). Serumda çalışılan TNF– α ve plazma endotoksin düzeyleri tedavi grubunda

kolit grubuna göre belirgin şekilde düşüktü ($p<0.05$). Kolit grubuyla karşılaştırılınca, tedavi grubunda karaciğer, dalak, MLN'ler, portal ve sistemik kanda bakteriyel translokasyon düşüktü ($P<0.05$). Transloke olan bakteri *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterobacter agglomerans* olarak saptandı.

Sonuç: Deneysel olarak TNBS-E ile oluşturulmuş kolit modelinde uygulanan GLP 2, histopatolojik, biyokimyasal, mikrobiyolojik parametrelere bakıldığında inflamasyonu ve bakteriyel translokasyonu belirgin düzeyde azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: Glukagon like peptid 2, Deneysel kolit, Bakteriyel translokasyon.

EFFECTS OF GLP 2 ON BACTERIAL TRANSLOCATION IN AN EXPERIMENTAL COLITIS MODEL ON RATS

ABSTRACT

Aim: Studies have shown that impairment in inflammatory bowel disease (IBD) along with proinflammatory cytokines and chemokines have important roles in pathogenesis of IBD. Based on the pathophysiology of colitis, this study aimed to invest a new therapeutic agent in treatment of colitis by studying an agent –glukagon like peptide 2– having anti-inflammatory effects and decreasing bacterial translocation in inflammatory bowel disease.

Materials and Methods: In this study, 28–32 weeks aged 21 Wistar albino male rats weighing 225–290 gr were used. Rats were randomly divided into 3 groups each including 7 rats (control, colitis and treatment groups). Normal saline (SF) was given to control group rectally. Trinitrobenzene sulfonic acid and ethanol mixture (TNBS–E) was instilled rectally for colitis formation in colitis group. Finally, for the treatment group, after instillation of TNBS–E, beginning from first day, 50 mcg/kg GLP 2 involved in lactated Ringer's solution administered subcutaneous once a day during 7 days. A midline laparotomy was performed on the 7th day. Firstly blood samples were taken from vena cava inferior and vena porta and santrifugated. The blood sample for blood culture taken and the left colon was resected. Microscopic and macroscopic findings of colonic inflammation were evaluated and graded. Myeloperoxidase (MPO) levels in colonic tissue, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and endotoxin levels of blood samples were measured.

Results: Macroscopic and microscopic grades, in colitis and treatment groups' were statistically different ($p < 0.05$). In the treatment group, tissue MPO levels were significantly lower than colitis group ($p < 0.05$). TNF- α and plasma endotoxin were decreased significantly in treatment group when compared to colitis group ($p < 0.05$). In treatment group, in liver, spleen, mesenteric lenf nodes, portal and sistemic blood samples, bacterial translocation were lower when compared to colitis group ($p < 0.05$). *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter agglomerans* were identified as translocated bacteria.

Conclusion: According to histopathological, biochemical and microbiological findings, administration of GLP 2 reduced the inflammation and bacterial translocation significantly on formed TNBS–E colitis rats.

Key words: Glukagon like peptide 2, Experimental colitis, Bacterial translocation.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH), gastrointestinal sistemi tutan ve hastanın yaşam kalitesini etkileyen hastalıklardır. İnflamatuvar barsak hastalıklarının patogeneğinde immün sistemin, genetik yatkınlığın ve çevresel faktörlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Son yıllarda bu hastalıkların görülme sıklığında belirgin bir artış dikkati çekmektedir. Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH), İBH olarak değerlendirilmekte ve benzerliklerinden dolayı aynı grupta incelenmektedir. Etkilenen dokuda inflamatuvar hücre göçü ve sitokinlerin etkisiyle ilerleyici doku yıkımı gelişmektedir (1).

İnflamatuvar barsak hastalığının etyolojisi hala netlik kazanmamıştır. Etyopatogeneğinde birçok faktörün beraber rol oynadığı düşünülmektedir. Genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel faktörlerin de etkisiyle gastrointestinal sistemde (GİS) kontrol dışı ve yaygın inflamasyon sonucunda barsağın bariyer fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler İBH'nın patogeneğini açıklamaya yönelik en akla yatkın teoridir (2). İnflamatuvar barsak hastalığında oksidatif stres, potansiyel ve/veya tetikleyici etyolojik faktördür. İnflamasyonun ilerlemesinde reaktif oksijen moleküllerinin zararlı etkileri tam olarak kanıtlanmıştır. İnflamatuvar barsak hastalıklarında, yapılan birçok insan ve deneysel hayvan çalışmalarında intestinal mukozada oksidatif stresin arttığı, plazmada ve kolon mukozasında glutatyon peroksidaz (GPx), miyeloperoksidaz (MPO), süperoksit dismutaz (SOD) gibi hücre içi antioksidan enzimlerin aktivasyonunun arttığı ve anti-oksidan (vitamin C ve E, selenyum, glutatyon, β karoten gibi) maddelerin seviyesinin azaldığı saptanmıştır (3).

Gastrointestinal epitel, interstisyumdaki su dengesini sağlayan ve intestinal lümenle bunun arasında bariyer oluşturan yapıdır. İnflamatuar barsak hastalıklarında, intestinal mukozal bariyer, inflamasyon ve ülserasyon ile bozulmuştur. Bu durumda, enterik bakteriler ve ürünlerinin barsak duvarından extra–intestinal steril bölümlere geçişı gerçekleşebilir. Bakteriyel translokasyon inflamatuvar hastalıkların intraabdominal abse veya peritonit gibi sekonder enfeksiyonlarına neden olabilir. Endotoksemi ve onun çeşitli hastalıklarla ilişkisi ile bağlantılı olarak, artmış intestinal epitelyal permeabilite klinik relapstan önce gelir ve permeabilite değışikliğinin hastalık reaktivasyonunda erken bir durum olabileceğini gösterir (4).

İnflamatuar barsak hastalıklarının tam patogenezi az bilinmektedir. Ancak İBH’nin immün sistem, genetik hassasiyet ve çevre etkileşimi ile ilgili olduğu konusunda kanıtlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda İBH’nda Glukagon like peptid 2(GLP 2)’nin, ASA (Asetil Salisilik Asit) ile kombine tedavisinin kolonik mukozal bariyere koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (5).

Bir çalışmada, GLP 2’ nin intestinal permeabiliteyi azaltarak nekrotizan pankreatitte bakteriel translokasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada pankreatit modelindeki intrinsik kısıtlamalardan dolayı, akut pankreatitli sıçanlar GLP 2 analoguyla 3 gün tedavi edilmiştir. İnce barsak kalınlığı artışı ve kript–villus yüksekliğinin istatistiksel olarak 6 gün sonra anlamlı oluşuna rağmen, GLP 2 analogu intestinal permeabiliteyi 3 gün sonra belirgin olarak azaltarak bakteriel translokasyonu rölatif olarak önlemiştir (6). Bir başka çalışmada GLP 2’nin IL–10 dan bağımsız antienflamatuar etkisi de gösterilmiştir (7).

Bizim çalışmamızda da kolit sürecinin patofizyolojisinden yola çıkarak, GLP 2’nin İBH’nda anti enflamatuar etkisi ve bakteriel translokasyon üzerine etkisi araştırılıp kolit tedavisinde yeni bir teropatik ajan olarak kullanılıp, kullanılamayacağı değeriendirilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLON ANATOMİSİ

Kolon ileoçekal bileşkedен başlayıp anüse kadar uzanır. 130–150 cm uzunluğunda 2.5–8.5 cm çaptadır. Çekum ile terminal ileum arasında ilioçekal kapak bulunur. Bu kapak sayesinde kolonik içeriğin ileuma geçişi engellenir. Longitudinal kas lifleri bir araya gelerek tenya omentalis, tenya libera, tenya mesokolika denilen üç ayrı bant oluşturur. Sirküler kas lifleri ise haustra denilen keselenmeleri meydana getirir. Pilika semilunaris denilen hilal biçimli yapılarla haustralar birbirinden ayrılırlar. Appendices epiploika ise tenyalara tutunan periton kaplı yağlı çıkıntılardır.

Kolon duvarı sırasıyla içten dışa; mukoza, submukoza, içte sirküler kaslar, dışta longitudinal kaslar, serozadan oluşur. Kolon; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum olmak üzere kısımlara ayrılır.

Omentum transvers kolonun üst kenarına tutunur. Çıkan kolon, inen kolon, hepatik ve splenik fleksura arka yüzleri genellikle retroperitonealdir. Çekum, transvers kolon, sigmoid kolon ise intraperitonealdir (8).

Çekum; kolonun ilk parçası olup, sağ iliak fossada yer alır. Altı cm uzunluğunda, 7.5 cm çapındadır. Arka yüzde psoas majör ve muskularis iliakus ile komşudur. Tenyalar çekum posteromedialinde appendices vermiformisin yapıştığı yerden başlar. İlioçekal valvin ileum tarafında villuslar bulunur.

Çıkan kolon; çekum ile hepatik fleksura arasındaki 15–20 cm' lik kısımdır. Karaciğer alt komşuluğuna uzanır ve sola öne dönerek transvers kolonu oluşturur. Arkada iliak kaslar, musculus quadrato lumborum ve sağ böbrek ile komşudur.

Transvers kolon; hepatik fleksuradan başlayarak splenik fleksuraya doğru transvers şekilde uzanır. Yaklaşık 50 cm' dir. Hepatik fleksurada duodenum 2. parçası ve pankreas başı ile komşudur. Gastrokolik ligaman ile mideye bağlıdır. Omentum majusa tamamen yapışıktır. Dalağın hemen inferiorunda splenik fleksurayı oluşturur.

İnen kolon; splenik fleksuradan itibaren 25 cm' lik kısmını oluşturur. Sol iliak fossada yerleşir. Sol böbrek dış kenarı, musculus psoas majör, musculus quadratus lumborum ile komşudur.

Sigmoid kolon; rektum ile inen kolon arasındaki 40 cm' lik kısımdır. Promontoryumun hemen önünde rektosigmoid bileşkeyi oluşturur. Rektosigmoid bileşke yakınında tenyalar net görülmez, appendices epiploikalar kaybolur.

Rektum; promontoryumun hemen önünde başlar. Sakrum ve koksigin eğimine bağlı aşağı ve arkaya doğru yönelir. Sakral bölgeyi geçip pelvik diafragmada anüs ile birleşir. Ondört cm uzunluğunda 4 cm genişliğindedir. Haustra, appendices epiploika, tenya içermez. Üst 2/3' lük kısmı periton ile örtülüdür.

2.2. KOLON FİZYOLOJİSİ

Kolon, sindirim artıklarının deposu ve iletim kanalı yanında sodyum ve kloru emer, potasyum, bikarbonat ve mukus salgılar. Bu da karbonhidratların, proteinlerin sindirimi için ve K vitamininin bakteriyel üretimini sağlayan ortamın oluşturulması için gereklidir. Kolonda belirlenen fizyolojik olaylar:

2.2.1. Su ve Elektrolit Değişimi

Kolonun majör emici fonksiyonu barsakta su ve elektrolit dengesini düzenlemektir. Kolon su ve elektrolitlerin % 90' ından fazlasını emerek enterik içeriğin hacmini azaltır. Günde yaklaşık 8 litre sıvının 6.5 litresi incebarsaklar tarafından 1.4 litre kadar sıvı ve 200 mEq kadar sodyum ve klor kolon tarafından emilir. Yüz cc kadar sıvı feçes ile dışarı atılır. Kolon günlük absorbsiyon kapasitesini 5–6 litreye çıkarabilir. Eğer incebarsakların günlük absorbsiyon kapasitesi 2 litreden az olursa kolonun sıvı emme gücü aşıldığından fekal su miktarı artar ve klinik olarak diare ortaya çıkar.

Kolon yüksek konsantrasyon gradiyentine karşı sodyum absorbe edebilme yeteneğine sahiptir. Özellikle distal kolonda böbreğin distal tübüllerindeki benzer temel hücresel mekanizmalarla sodyum ve su transportu gerçekleşir. Kolon günlük 400 mEq sodyum

emebilme kapasitesine sahiptir. Dehidratasyon sırasında aldosteron stimölasyonuna kolonik cevap önemli kompensatuar mekanizmadır. İleostomili hasta bu absorbsiyon kapasitesini kaybeder, bu yüzden artmış sodyum kaybını tolere edemez.

Aldosteron ve glukokortikoidler apikal membran permeabilitesinin sodyuma karşı geçirgenliğini arttırarak absorbsiyonunu arttırır. Bu nedenle ülseratif kolitli hastalara tuzsuz diyet önerilmektedir. Kolondaki potasyum geçişi sodyumun aktif transportu sonucu oluşan elektrokimyasal gradiente göre pasif olarak gerçekleşir. Potasyum sekresyonu, lümendeki konsantrasyon 15 mEq' den daha az olduğu sürece devam eder.

Bu düzey altında ise potasyum sekresyonu durur ve absorbsiyonu başlar. Aldosteron ve epinefrin sodyum ve potasyum sekresyonunu arttırırken, betanekol azaltır. Klor, konsantrasyon gradientine karşı kolon mukozasından aktif emilir. Klor ve bikarbonat lüminal yüzeyde değişime uğrar. Lümende asidotik ortam varsa klor absorbsiyonu artar. Bu da bikarbonat sekresyonunu arttırır. Üreterosigmoidostomili hastalarda üriner klor absorbsiyonu ve aşırı bikarbonat sekresyonu nedeniyle metabolik asidoz ve hiperkloremi gelişebilir. Klor konsantrasyonu %25 oranında bikarbonat değişimi, %75 oranında nötral NaCl absorbsiyonu ile olur.

Besinlerin aktif emilimi minimal olsa da kolon, emilmemiş karbonhidratlardan intraluminal bakteriyel fermentasyonla oluşan kısa zincirli yağ asitlerini pasif olarak emebilir. Emilmiş butirat, asetat ve propionat gibi kısa zincirli yağ asitleri kolonik epitelin yakıt kaynağıdır. Oluşan enerji aktif sodyum transportunda gereklidir. Ülseratif kolitli hastalarda kısa zincirli yağ asitlerinin metabolizmasının bozulması sonucu sodyum absorbsiyonu bozulur. Bu hastalarda, intraluminal kısa zincirli yağ asitleri fayda sağlayabilir.

Kolonik bakteriler protein ve üreyi parçalayarak amonyak oluşturur. Amonyum iyonları bikarbonat ile reaksiyona girerek noniyonize amonyak olarak kolon mukozası ile karaciğere taşınır. Kolon lümeni asidotik ise amonyak emilimi azalır. Orta spektrumlu antibiyotik, lavman, müshil kullanımı kolondaki bakteri miktarını azaltarak amonyum üretimini azaltır. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda kullanılabilen tedavi yöntemlerindendir.

Bakteri, enterotoksin, vazoaktif intestinal polipeptid, nörotransmitter, laksatifler kolondaki sıvı ve elektrolit sekresyonunu uyarır. Vazoaktif intestinal polipeptidin

kolondaki su absorpsiyonunu önlediği saptanmıştır. Ülseratif kolit ve laksatiflerle oluşan diarede prostoglandinler kolondaki sekresyonun artışına neden olur (9).

2.3. KOLON MİKROFLORASI

Doğumda insan kolonu sterildir. Ancak saatler içinde barsaklar ağızdan anüse doğru kolonize olur. Neonatal dönem ve hayatın ilk aylarında mide-barsak kanalına bakteriler yerleşmeye başlar ve zamanla gastrointestinal kanalın değişik yerlerinde kompozisyonları farklı olan mikroflora oluşur.

Kalın barsak, feçes kuru ağırlığının 1/3' ünü oluşturan yoğun bakteri popülasyonunu barındırır. Feçesin her gramı 10^{11} – 10^{12} bakteri içerir. Anaerobik bakterilerin aerob bakterilere oranı 1/1000 kadardır. *Bacteriodes* türleri en sık rastlanan kolonik organizmalardır. Feçesin mm^3 'ünde 10^{11} – 10^{12} arasında bulunurlar. *Escherichia coli* ise milimetre küpte 10^{10} kadar bulunur. Mide-barsak lümeni içeriği, konağın metabolik süreçlerine ve immünolojik yanıtına da müdahalede bulunan aktif bir mikrobiyolojik ekosistemdir (10).

Normalde barsak mukozasının kalıtsal olarak sahip olduğu yapısal ve fonksiyonel özellikleri, lümendeki bakterilerin mukozaya kolonize olmalarına ve barsak duvarını invaze etmelerine engel olur. Enterik immün sistem ile mikroorganizmalar arasındaki dengenin bozulması, kronik inflamatuvar barsak hastalığını başlatan süreci tetikler.

İnflamatuvar Barsak Hastalığında barsak lümenindeki bakteri sayısının arttığına ve flora kompozisyonunun değiştiğine ait bilgiler vardır (11,12).

Ülseratif kolitli hastaların feçeslerinde adeziv ve invazif özellikleri olan *Escherichia coli* saptanmıştır (13). Yapılan çalışmalarda ÜK hastalarının barsak florasında *Bacteriodes vulgatus*un en sık izole edilen ve konsantrasyonu en yüksek olan bakteri olduğunu ve bu hastaların serumlarında *Bacillus vulgatus*, *Bacillus fragilis* ve *Clostridium romasum* aglutinin titrelerinin de yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. İnflamatuvar barsak hastalarında şiddeti arttıkça mukozal bakteri konsantrasyonunun yükseldiği de bildirilmiştir (14).

Endojen kolon bakterileri sindirilmeden geçen karbonhidrat ve proteinlerin yıkımında önemli rol oynarlar. Ayrıca enterohepatik dolaşım ile yeniden kazanılan birçok maddelerin (bilirubin, safra asitleri, östrojen, kolesterol) metabolizmasında görev alır. K vitamini gibi gerekli maddeleri üretirler.

2.4. İNFLAMATUVAR BARS AK HASTALIĞI (İBH)

İnflamatuvar Barsak Hastalığı etiyolojisi tam olarak bilinmeyen ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH) klinik formlarından oluşan hastalıklardır. Ülseratif kolit, mukozal ülseratif kolit, idiyopatik ülseratif kolit olarak da adlandırılır. Kolon mukozasını tutan, barsak fonksiyonlarında değişiklik ve intestinal inflamasyon semptomları oluşturan inflamatuvar bir süreçtir.

Crohn Hastalığı, önce kronik interstisyel enterit olarak adlandırılmış, daha sonra segmenter kolit, rejiyonel enterit, terminal ileit, granülamatöz kolit, transmural kolit olarak da adlandırılmıştır. Crohn Hastalığı anüsden ağıza kadar tüm gastrointestinal sistemi tuttuğu bilinmekte, barsak dışı bulgular kolonik bulgulardan önce görülebilmektedir.

Her iki hastalık da daima kronik bir şekilde alevlenme ve iyileşme dönemleri ile karakterizedir.

Etiyoloji tam olarak bilinmemekle beraber, inflamatuvar hücre ve sitokinlerle oluşan inflamasyondan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (15). Etiyolojik olarak genetik, immünolojik ve çevresel faktörler değerlendirilebilir (16).

Genetik Faktörler: Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Yahudi, Japon topluluklarında ve beyaz ırkta sık görülmektedir (17). Bazı genler de genetik yatkınlığın saklandığı ve çevresel faktörlerin bunları modüle ettiği ileri sürülmektedir. HLA DR-2, HLA DR-B1-0103, DR-12 bu gruplardan sayılabilir. Ülseratif kolitli hastalarda HLA DR-B1*1502 aleli ile pozitif bir ilişki, DR B1*13 aleli ile negatif bir ilişki saptanmıştır. Ayrıca PANCA'sı pozitif hastalarda HLA DRB1*0701, PANCA negatif hastalarda HLA DRB1*1502 daha sık görülür (18, 19). Human Lokosit Antijen sistemi yanısıra proinflamatuvar ve reglatuvar sitokinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmin de etkili olabileceği yönünde araştırmalar mevcuttur.

Çevresel Faktörler:

–Sigara: Ülseratif kolit'e karşı koruyucu, CH'nı ise uyarıcı ve alevlendirici etkisi bulunmaktadır.

–Apendektomi: Ülseratif kolit' e karşı koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmüştür.

–Diyet: Karbonhidrat, nişasta ve rafine sebze kullanımı, aşırı yağ alımı, meyve ve sebze lifli gıda alımı, fast food tipi beslenme, kahve, alkol, tahıl, hububat, anne sütünün etiolojideki rolüne ait çelişkili yayınlar mevcuttur.

–Yüksek sosyoekonomik düzey ve hijyen: Ülseratif kolit sosyoekonomik düzeyi yüksek kişilerde görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde daha sık görülür.

–Nonsteroid antiinflatuvar ilaç kullanımı: Bu ilaçlar ÜK’ i ağırlaştırmakta ve inaktif ülseratif proktokoliti presipite ederek tekrarlamasına neden olmaktadır.

–Mevsimsel değişiklikler: Ülseratif kolit’in özellikle aralık ayında pik yaptığı tespit edilmiştir. Ülseratif kolit ilkbahar ve sonbaharda, CH ise kış ve sonbaharda nüks etmektedir.

–Solak olma: İnflamatuar barsak hastalığı solak insanlarda daha sık görülmektedir.

–Stres: Hastaların psikolojik durumu ve stresle hastalığın alevlenmesi daha fazladır.

–Mikrobiyal nedenler: Hemen hemen tüm ÜK’li hastalarda bakteri, virüs ya da mantarlara karşı sınırlı miktarda antikorlara rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda İBH’ da hastaların barsak mukozası önemli bakteri içerir. İnflamatuar barsak hastalığının şiddeti arttıkça mukozal bakteri konsantrasyonunun da yükseldiği bildirilmiştir (20, 21).

Crohn hastalığı alevlenme döneminde sıklıkla Yersinia enterocolitica ve Myobacterium tuberculosis suşları identifiye edilebilmektedir. Benzer şekilde campylobacter, shigella, amip ya da cytomegalovirüs (CMV) enfeksiyonları ÜK ile benzerlik gösterebilmektedir. Crohn hastalığı için patogonomik özellikte olan granülomlar enfektif ajanların kendilerinin ya da antijenik özellikte olan partiküllerinin doku içerisindeki birikimlerle ve reaktif antijenlerde saptanan granülomlarla benzerlik göstermektedir. Bu olgular da, inflamasyona olan immün yanıtı uzatarak, doku yıkımını arttırdığı bildirilmektedir.

Paramiksovirüsler için de benzer teoriler mevcuttur. Enfeksiyöz teoriyi destekleyen bir başka nokta ÜK’ li hastaların kolon mukoza hücrelerinin nükleus içi ve stoplazmik kompartmanlarından Epstein–Barr ve herpes virüsüne ait inklüzyon cisimciklerinin % 75 oranında izole edilebilmesidir. Sitomegaloviruslerin neden olduğu anti CMV antikorları bu hastalarda sıklıkla yüksek bulunmuştur (22).

İmmünolojik Faktörler: İnflamatuar barsak hastalığındaki defektlerden biri ve belki de en önemlisi barsak epitel geçirgenliğinin artması ve normalde bu bariyeri geçemeyen

antijenlerin ve proinflamatuvar moleküllerin barsak epitelini geçebilmesidir. Musin yapısındaki değişiklikler de bu olaya katkıda bulunur. Barsak epitelinin iltihabi olayı başlatmadaki rolü bir taraftan antijen sunan hücreler olarak majör histokompatibilite kompleksi aracılığıyla T hücrelerine sunmak, diğer taraftan da antijenler aracılığıyla uyarılan sitokin, kemokin ve diğer proinflamatuvar maddelerin meydana getirdiği inflamasyonu dalga dalga yaymaktır. Sitokinler; TNF-alfa, IL-6, IL-10, proinflamatuvar etkili olanlar; TNF-alfa, IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8, IL12 artmış, IL-10, IL-1 α , IL-4, IL-13 azalmıştır. Bu mediatörlerin ateş, hiperalbuminemi, CRP artışı gibi sistemik etkileri vardır (23–25). Normalde kolon epitelinde CD8 (supresör) T lenfositler hakim iken, İBH epitelinde CD4 (helper) T lenfositlerin hakimiyeti gösterilmiştir.

Antijen sunan hücre MHC I ve II ile T-helper reseptörü ilişkisi T hücre cevabının niteliğini belirler. İnflamatuvar barsak hastalığında enterositler antijen sunan hücreler olarak görev yaptıklarında normal insandakinin aksine T hücre toleransı aktivasyonu meydana gelmektedir (20).

Epitel hücreleri veya içerdikleri partiküller inflamatuvar yanıtı tetikleyerek makrofajlardan sitokinler (TNF- α , IL-2), hücreleri sitotoksik hale getirmekte, proliferasyonunu uyarmaktadır. Bu yanıt özellikle T hücreleri ve B hücrelerini stimüle ederek hem özgül olmayan sitotoksik etkiyi hem de özgül antikor yapımını arttırarak antikora bağımlı sitotoksikiteyi alevlendirir. Sonuçta lenfositlere ek olarak diğer lökositlerin katılımıyla birlikte araşidonik asit metabolizmasındaki ürünler ve serbest oksijen radikalleri nedeniyle doku yıkımı oluşur (26).

İnflamatuvar barsak hastalığında semptomlar birbiriyle çakışır ve çoğunlukla barsak inflamasyonuna ilişkindir. İnflamasyonun derinliğine ve bulunduğu barsak bölgesine göre semptomlar farklılık gösterir. Ülseratif kolit’de en önemli yakınma gece gündüz devam eden kanlı, mukuslu ve cerahatli ishaldir. Özellikle karın alt kısımlarında lokalize kramp tarzında ağrılar ile beraberdir. On ile yirmi arasında değişen defekasyon mevcuttur. Ateş, tenesmus, kilo kaybı, malnutrisyon diğer görülebilen klinik belirtilerdir.

Crohn hastalığında belirti ve bulgular çoğu zaman siliktir. Tipik hasta 20–40 yaşlarında uzun süredir karın ağrısı, ishal, kusma ve kilo kaybı olan genç erişkindir. Karın ağrısı patlayıcı, yemeklerle birlikte veya nokturnal ishal ve tam olmayan barsak obstrüksiyonu

mevcuttur. Anorektal ve perianal CH'da, kanama, fistüller, apseler, fissürler, ağrılı cilt lezyonları, inkontinans, tenesmus diğer görülebilen klinik belirtilerdir.

Patolojik olarak ÜK en sık pankolit şeklindedir. Hastalık barsak duvarında mukoza ve submukozayı ilgilendirir. Kronik olgularda serozal yüzey eksuda ile örtülüdür. Kolon hastrasyonu azalır. Erken dönemde mukoza tabanda dökülen liberkühn kriptalarında yuvarlak hücre ve polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu ve buna bağlı olarak gelişen kript apseleridir. Mukoza kalınlaşır, üzeri granülasyon dokusu ile kaplıdır. Ödemli ve fragil mukoza kolaylıkla kanar. İleri evrede barsak eksen istikametinde uzanan ülserler görülür. Ülserli kısımlar arasındaki sağlam mukoza kabarır, ödem iltihap nedeniyle şişer ve polipoid (yalancı polip, pseudopolip) bir görünüm alır.

Crohn hastalığı ise gastrointestinal kanalın herhangi bir yerinde görülebilirse de en sık terminal ileumda görülür. Birbirinden bağımsız, arada sağlam alanların da olduğu hastalıklı bölgeler hem proksimaldeki kısımlarda hem de distaldeki kolonda sıklıkla bulunur. Tüm katlarıyla barsak duvarını tutan transmural bir hastalıktır ve lineer ülserler gelişir. En önemli patolojik bulgu submukozal ve subserozal fibrozis ve bunun neden olduğu darlıklardır. Barsak duvarı kalınlaşır, lümen daralır ve serozal yüzey sarkoid granüler hal alır. Mukozada hastalığın ilerlemesiyle büyüyen ülserler oluşur. Segmental tutulum görülür. Fistüller sıktır. Sonuç olarak inflamasyon veya ülserle epitel bariyerinin zarar görmesi, bakteriyel savunmanın hasarlanması, kolonizasyon rezistansının hasarlanması mekanizmalarından en az ikisi İBH' nın belirleyici nitelikleridir (27).

İnflamatuvar Barsak Hastalığında tedavi etyoloji tam belli olmaması nedeniyle semptomatiktir. Medikal tedavide 5-aminosalisilat türevleri, immünosüpresif ajanlar ve kortikosteridler kullanılmaktadır (28).

2.5. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON

Bakterilerin intestinal translokasyonu, gastrointestinal mikrofloranın lamina propria boyunca lokal mezenterik lenf düğümlerine (MLN) buradan da diğer organlara (karaciğer, dalak gibi) geçmesidir (29). Daha sonra enterik bakteri sistemik dolaşıma geçerek tüm vücut boyunca yayılabilir ve sepsis, şok, multiorgan yetmezliği ve ölüme neden olabilir. Bu geçiş normal şartlarda oluşmaz. Yanık, açlık, barsak tıkanması, cerrahi travma, anestezi, safra yolu tıkanıklığı, şok gibi durumlarda barsak bariyer

fonksiyonunun ve mukozal bütünlüğünün bozulması, bakterilerin absorpsiyonunu arttırarak barsak dışına çıkmasına, başka organlara bakteriyel translokasyonuna neden olmaktadır.

Barsak içinde kolonize bakterinin intestinal mukozayı geçerek sistemik dolaşıma geçmesini engelleyen bazı savunma mekanizmaları mevcuttur, bunlar:

- ❖ Mukoza epitelinin fiziksel bariyer fonksiyonu,
- ❖ Lümen içindeki bakteri ile intestinal epitel arasındaki mukus tabakası,
- ❖ Sekrete edilen IgA' nın bakteri duvarı üzerindeki epitelyal yapışma bölgelerini bloke etmesi,
- ❖ İntestinal peristaltizmin bakterinin uzun süre intestinal mukoza ile temasının engellemesi,
- ❖ Mukozayı oluşturan epitel hücrelerinin aralıklı olarak dökülmesidir.

Tüm bu lokal savunma mekanizmaları normal barsak florasının kolonizasyonunu sağlar. Barsak bariyerinin ilk komponenti intestinal mikrofloradır. Anaerobik bakterilerin potansiyel patojen bakterilerin aşırı çoğalmasının sınırlanması ve bu bakterilerin yapışmasını engellemesine kolonizasyon direnci denir (30).

Geniş spektrumlu antibiyotikler ile anaerobik flora değişikliğe uğrarsa, bu koruyucu mekanizma kaybolur (31). Potansiyel patojen bakteriler epitele direkt tutunarak bakteriyel translokasyona neden olabilirler. Bakterilerin normalin üzerinde artışının engellenmesi bu nedenle önemlidir.

Gastrointestinal sistemde diğer önemli bir savunma mekanizması da esas elemanı musin olan normal mukoza tabakasıdır. Musin, goblet hücrelerinden salgılanan yüksek molekül ağırlıklı bir glikoproteindir. Müköz tabakada submukozal plazma hücrelerinden salgılanan sekretuar IgA' yı da içeren bir grup koruyucu ihtiva eder. Müköz tabaka anaerob mikroorganizmaların üreyebilmesi için uygun bir ortam hazırlar ve potansiyel patojen mikroorganizma lokalizasyonunu engeller. Müköz tabakadaki değişiklikler patojenik bakterilerin epitel hücre yüzeyine tutunmasına neden olur (32).

Barsağın kolumnar epiteli, goblet hücreleri, lenfositler ve M hücreleri gibi özel hücreler normal epitel hücresinin yapı ve fonksiyonunun ve sıkı junctionlarının korunması bakterilerin transepitelyal ve transselüler göçünü önler. Normal intestinal peristaltizm de

önemli savunma faktörüdür. İleus gibi staz hücrelerine yapışması ile koruyucu mekanizma kırılabılır (33).

Barsağın immünolojik bariyeri; peyer plakları, lenf folikülleri, lamina propria lenfositleri, mezenterik lenfoid hücreler ve lamina propriadaki plazma hücrelerinden salgılanan salgısal IgA' dan oluşur. Salgısal IgA enterositlere bakterilerin yapışmasını engeller. Antijenik uyarı sonrasında oluşan T ve B lenfositleri peyer plaklarından ayrılarak MLN' e oradan da lenfatikler yoluyla vücudun çeşitli bölgelerine giderler (34).

Diğer bir koruyucu mekanizma da barsak–karaciğer aksıdır. Bu sistem öncelikle endotoksin translokasyonunu engeller. Bakteriyel translokasyonu etkileyen faktörler ise:

–Barsak flora bakterilerinde aşırı çoğalma; Antibiyotik kullanımı, açlık, yanık gibi durumlarda barsak florasının stabilitesi bozularak mikroflorada artış görülür. Bu da bakteriyel translokasyonla sonuçlanmaktadır (35). En sık izole edilen bakteri Escherichia colidir (36).

–İmmün savunmada azalma; Bakteriyel translokasyonu uyaran temel faktör immün sistemin fonksiyon bozukluğudur. İmmün sistemi herhangi bir nedenle baskılanmış hastalarda barsak bakterileri sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Atimik farelerde mezenter lenf düğümünde %50 translokasyon olduğu gösterilmiştir. Bu da T lenfositlerin translokasyonda rol aldığını göstermektedir. Metotreksat, 5–flurourasil, siklofosamid gibi immün sistemi baskılayan ilaçlar da bakteriyel translokasyonu uyarmaktadır (37, 38).

–Barsak mukoza bariyerinde artmış geçirgenlik; Yaş arttıkça bakteriyel translokasyon oranı azalmaktadır. Yenidoğanda barsak bariyeri tam olarak gelişmediği için bakterilerin yapışmasına ve moleküllerin geçişine izin verirler. Henüz T lenfositler de oluşmamıştır. Bu nedenle barsaktan diğer doku ve organlara yayılım kolaylaşır (16).

–Açlık; Açlıkta barsağın kan akımı azalır, incebarsak kitlesi azalır. Katekolaminler gibi vazoaktif hormonların düzeyi artar. Bu da barsak mukozasında hasara yol açarak bariyerin bütünlüğünü bozar. Hücresel ve humoral bağışıklık azalır, fagositoz azalır. Sonuçta barsak permeabilitesi artarak bakteriyel translokasyon gerçekleşir.

–Yanık, travma, cerrahi stres; Açlıkla aynı değişiklikler meydana gelir, immün sistem baskılanır, stres hormonları artar, barsak kan akımı azalır ve sonuçta barsak bariyeri bozularak bakteriyel translokasyon oluşur.

–Kolestaz; Safra yollarında tıkanıklık sonucunda meydana gelen, retiküloendotelial sistem fonksiyonlarında bozulma, immün sistemin baskılanması, barsak duvarında oksidatif hasar, barsak mukozasının yapı ve fonksiyonundaki değişiklikler bakteriyel translokasyon ile sonuçlanır.

İnflamatuvar bağırsak hastalığının da barsak duvarında hasarlanma nedeniyle bakteriyel florada eksilmeler meydana gelebilir ve barsak dışı alanlara enterik bakteriler geçebilir. Sistemik endotoksemiye neden olabilir. Sistemik endotoksemi ÜK ve CH’nda gösterilmiştir. Bakteriyel translokasyonun İBH’ da elektif cerrahisinde meydana gelen sepsisin yüksek insidansını açıklayabileceği ve bu şartlarda meydana gelen karaciğerdeki histolojik ve biyokimyasal hasarlara katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (27).

Ülseratif Kolit ile birlikte portal bakteriyemi ve salınan bakteriyel ürünler, toksinler kolonik mukoza inflamasyonunda önemli rol oynar. Her zaman endojen bakteriyel flora şiddetli inflamatuvar durumlarda bakteriyel translokasyonun temelini oluşturur. İntestinal bakteri çoğalması intestinal permeabilityi artırır ve bu da sepsisten sorumludur.

Bakteriyel translokasyonun ilerlemesinde fiziksel bariyerin önemli bir faktör olduğu görülmüştür. Proinflamatuvar proteinler olan kemokinlerin, inflamasyonun başlamasında önemli bir rolü vardır. Enfeksiyon ve immün hastalıklarda bu spesifik sitokinlerin patojen ve patolojik süreçlere, genel hücrel enfeksiyona neden olur.

Kemokinler, inflamatuvar hastalıklarda önemli bir role sahip olup aracılık ederler. Çoğu çalışmada kemokinler İBH’ nın immünopatogenezinde önemli role sahip olduğu iddia edilir (16).

Normal kolonik floradaki değişiklikler sellüler immünite bozukluğu, intestinal mukozada injuri, immünolojik değişiklikler, intestinal mekanik bariyerde hasar oluşturur ve bundan dolayı bakteriyel translokasyon, devamında sepsis ve multiorgan yetmezliği oluşur (39).

2.6. GLUKAGON LİKE PEPTİD 2

Memelilerdeki Proglukagon geninin post translasyonu ile doku spesifik olarak proglukagon derive peptidler isminde bir çok önemli biyolojik peptid oluşmaktadır. Bunlar glukagon, glukagon like peptid 1 (GLP 1), Glukagon like peptid 2 (GLP 2),

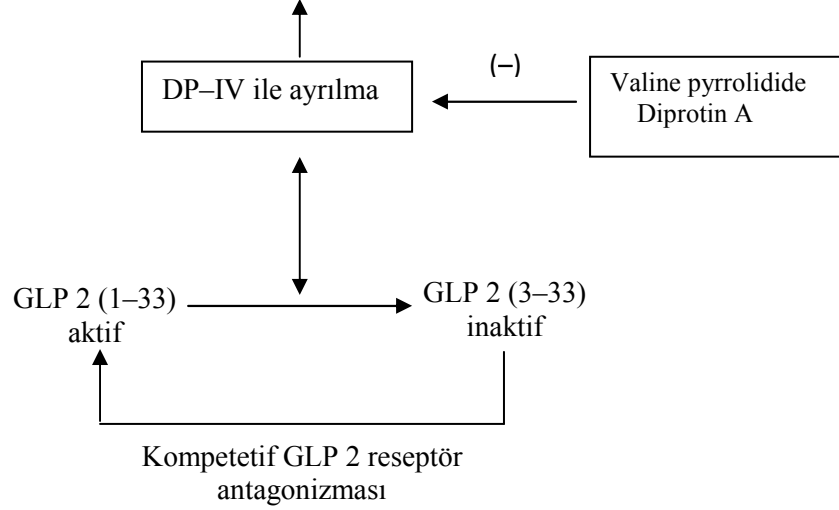
intervening peptid 1–2 (IP–1, IP–2), glisentin ve oksintomodulindir. Proglukagon derive peptidler, kan glukozundaki değişiklikler ya da besin alımına bağlı olarak endokrin hücrelerden salınıp etkilerini G protein ilişkili reseptörler aracılığıyla göstermektedirler (40). Glukagon like peptid 2 barsaklar, pankreas ve beyinde exprese edilen proglukagon geninin türevi olan peptid ailesinin bir üyesidir. Proglukagonun doku–spesifik posttranslasyonel proçesi, barsaklardan GLP 1 ve GLP 2 sekresyonuna, pankreastan da glukagon sekresyonuna öncülük eder. Glukagon like peptid 2 ve GLP 1 barsak distalindeki enteroendokrin L–hücrelerinden, enteral besin alımına, özellikle karbonhidrat ve yağa yanıt olarak birlikte sekrete edilir. Glukagon like peptid 2 33 aminoasitlik peptid olarak sekrete edilir ve Dipeptidilpeptidaz 4 (DP–4) tarafından hızlıca, tamamlayıcı antagonistik özellikleriyle zayıf agonist gibi davranan inaktif peptide ayrılır (41).

Glukagon like peptid 2 nin, bioaktif GLP 2 (1–33) ve iki inaktif formdan (GLP 2 [3–33] ve major proglukagon fragmanı) ibaret en az üç formu tanımlanmıştır. GLP 2 metabolizmasını belirleyenler renal klirens ve sondan bir önceki aminoasit kalıntısında DP–4 tarafından GLP 2 yi biyolojik olarak inaktif forma çeviren enzimatik reaksiyondur.

Glukagon like peptid 2 sürekli i.v verildiğinde veya subkutan yolla bolus enjeksiyon yapıldığı zaman dolaşımdaki inaktif GLP 2 (3–33) konsantrasyonu aktif GLP 2 (1–33)’den yaklaşık olarak 2 kat daha fazladır. Bununla birlikte yeni bir çalışma inaktif GLP 2’nin, yüksek doz uygulandığında tamamlayıcı GLP 2 reseptör antagonisti gibi biyolojik aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Glukagon like peptid 2 peptidi bir kez inaktif GLP 2’ ye indirgenirse plazmadan temizlenmesi, GLP 1 e benzer şekilde, büyük oranda böbreklerden atılımıyla belirlenmektedir.

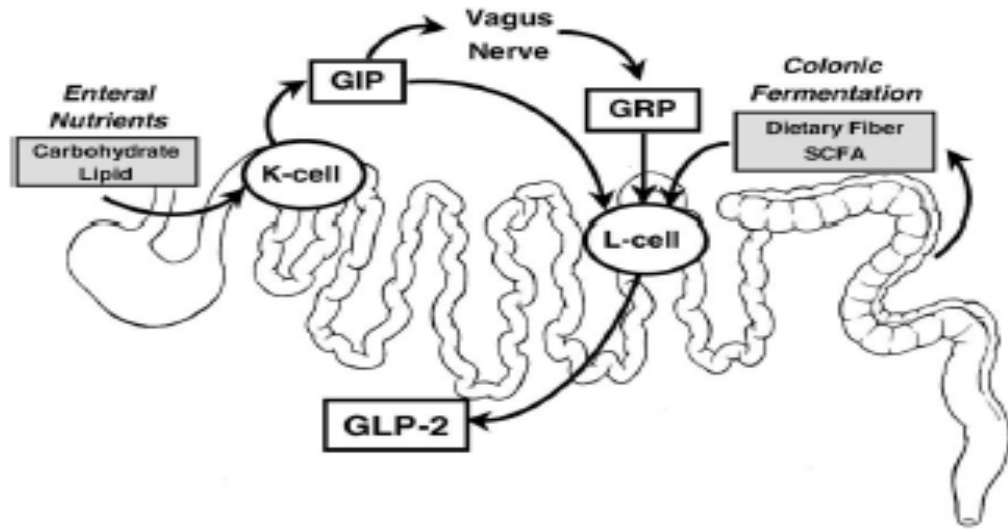
Human GLP 2 (1–33) HA DGS FSDEM NTILD NLAAR DFINW LIQTK ITD

Human GLP 2 [gly] HA DGS FSDEM NTILD NLAAR DFINW LIQTK ITD



Şekil 1. GLP 2 Peptid'inin bioaktivitesinin düzenlenmesi (41)

Glukagon like peptid 2, gastrik motiliteyi inhibe ederek ve besin transportunu stimüle ederek besin emilimini artırıcı rol oynar. Ayrıca, GLP 2 santral yoldan infüze edildiğinde besin alımını baskılar. GLP 2'nin trofik davranışları barsağa spesifiktir ve kript hücre proliferasyonunuda stimülasyon yolu ile oluşturur ve mukozal epitelyal hücrelerdeki apoptozisin baskılanmasını sağlar. Glukagon like peptid 2 barsak permeabilitesini, bakteriyel translokasyonu ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu, intestinal inflamasyon ve yaralanma durumlarında azaltır. Glukagon Like Peptid 2'nin intestinal mukozadaki etkileri hipotalamusta lokalize olan G-protein-bağlı bir reseptör tarafından sağlanır. GLP 2R'nin intestinal lokalizasyonun nöral ve endokrin hücrelerle olması, fakat enterositlerle olmaması, yaptıklarının indirekt sekonder bir sinyal mekanizması aracılığıyla olduğunu göstermektedir (41).



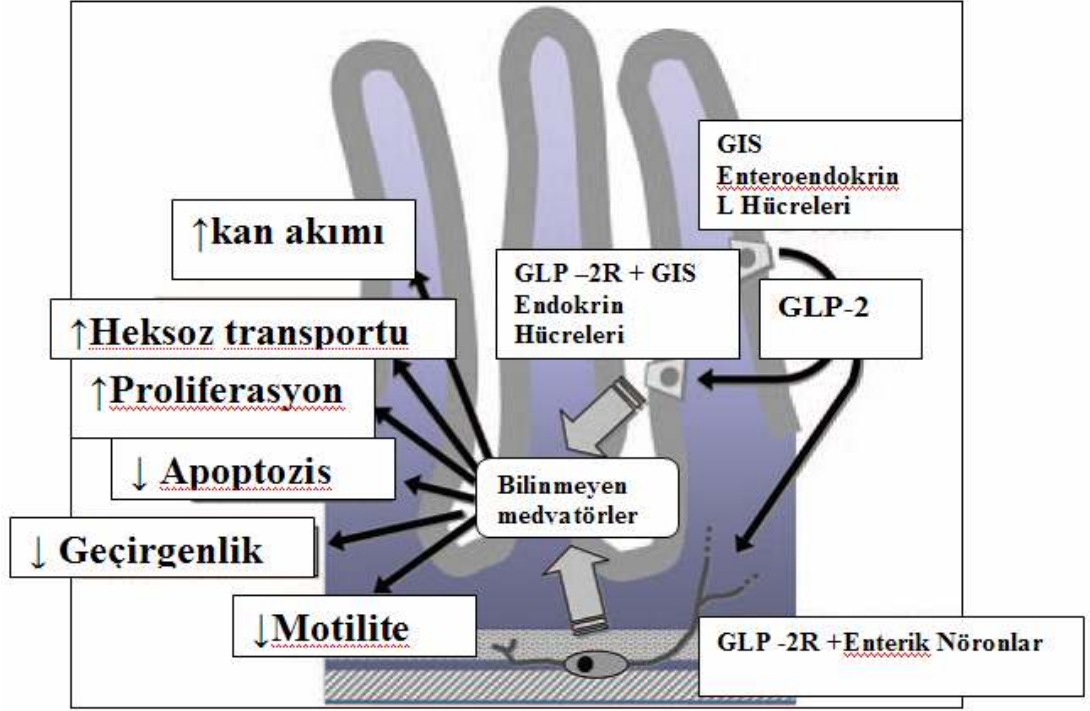
Şekil 2. GLP 2 sekresyonunu etkileyen faktörlerin şematik olarak gösterilmesi (41)

İntestinal proglukagon derive peptidlerin özellikle de GLP 2'nin, hem sıçanlarda hem de insanlarda sentez ve sekresyonunun başlıca uyarıcısı besinlerdir. Özellikle yağ asitleri ve fiberden zengin beslenme proglukagon mRNA transkripsiyonunu arttırıp gastrointestinal sistemden proglukagon derive peptid salınımını uyarmaktadır (42). Yapılan çalışmalarda özellikle karbonhidrat ve yağdan zengin beslenmenin GLP 2 uyarısını 2–5 kat arttırdığı, buna karşın protein içerikli besinlerin beslenme sonrası salgı üzerine etkisi olmadığı gösterilmiştir. Besinlerin uyardığı GLP 2 salınımı bifaziktir; besin alımından sonra 10. dakikada ortaya çıkan bir pik salınım ve ardından 1. saatte ortaya çıkan ikinci bir pik salınımı vardır (43).

Besinlerin uyarısıyla salınıp dolaşımda hızla seviyeleri artan GLP 1 ve GLP 2'nin biyoaktif formlarının seviyesi hızla azalır. DP-4 enziminin yaptığı 2. pozisyonadaki alanin amino asidindeki N-terminal degradasyonla her iki peptidin de aktif formları yıkılır ve inaktif formları oluşur (44). GLP 2; DP-4 enzimiyle inaktive edilip böbreklerden atılır (45). İnsanlardaki GLP 2 yarılanma ömrü 7.2 dakikadır (46). Yapılan çalışmalarda inaktif GLP 2 (3–33) formunun yarı ömrünün daha uzun olduğunun (yaklaşık 27 dakika) saptanması üzerine tedavi ajanı olarak bu formun daha uygun olacağı düşünülmüştür.

Hafif ya da ciddi intestinal inflamasyonu olan hastalarda DP-4 seviyelerinde azalmaya bağlı olarak biyoaktif GLP 2 seviyelerinde artış gözlenmektedir. Bunun aksine geniş ince barsak rezeksiyonu geçirenler ya da inflamatuvar barsak hastalığı olup özellikle

terminal ileum tutulumu olanlarda GLP 2'nin hem seviyesi hem de sekresyonu azalmıştır (47). Bunun yanında ileal rezeksiyon geçirip kolonu korunan hastalarda GLP 2' seviyelerinde ve intestinal adaptasyonda artış gözlenmiştir (48). Tüm bunlar distal ileum ve kolonun enteroendokrin L hücrelerinden zengin olduğunu ve GLP 2 salınımının başlıca sorumlu alanları olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. GLP 2'nin Gastrointestinal Mukoza Epiteli Üzerine Etkileri (49)

Enteral beslenmenin intestinal mukozal büyümeye etkisi; yiyeceklerin GLP 2 üzerine stimülatör etkisiyle açıklanıp sıçanlarda paranteral beslenmeyle ortaya çıkan mukozal hipoplaziye karşı GLP 2'nin koruyucu olduğu gösterilmiştir (50). İnce barsak GLP 2' ye karşı daha sensitif olmasına rağmen yüksek dozlarda GLP 2 ya da daha potent GLP 2 analogları uygulandığında kalın barsak mukoza kalınlığında da önemli derecede artış saptanmıştır (46).

Glukagon like peptid 2'nin in vivo ve in vitro epitelyal hücre proliferasyonunda artışa yol açtığına görülmesi üzerine barsak hastalıklarında GLP 2'nin tedavi amaçlı kullanımı tartışmaya açılmıştır.

2.7. SİTOKİNLER

Sitokinler nonspesifik immün sistemin temel haberleşmesini sağlayan protein veya glikoprotein yapısında olan maddelerdir. Hücre büyümesi ve değişimi, doku tamiri ve yeniden yapılanması, immün yanıtın düzenlenmesi, hücreler arasında kimyasal haberleşmesini sağlarlar. Doğal immünette sitokinler, mononükleer fagositler ve doğal öldürücü hücreler (natural killer, NK) tarafından üretilirler. Kazanılmış immünette ise T hücreleri tarafından üretilirler. Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF- α), IL-1, IL-6 doğal immün yanıtta en önemli sitokinlerdir. Bu sitokinler tek başlarına immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynamazlar, fakat yardımcı T hücre yanıtına neden olarak edinsel immünite gelişmesine ve yayılmasına neden olurlar (51).

Yara iyileşmesi, iskemi ve reperfüzyon hasarı, septik şok gelişimi gibi inflamatuvar durumlarda sitokinlerin rol ve önemleri anlaşılmıştır. Sitokinler farklı hücrelerde farklı etkiler göstermektedir. Hedef hücrelerde hücre yüzey reseptörlerine (immunoglobulin, hemopoetin, TNF, beta adrenerjik reseptörler) bağlanarak aynı hücreden sitokin sekresyonu, komşu hücrede veya uzak hücrelerde aktivasyona neden olabilirler.

Sitokinler, etki mekanizmasına göre proinflamatuvar ve antiinflamatuvar olarak adlandırılır. Proinflamatuvar sitokinler inflamasyonun başlangıcında salınırlar. İmmün yanıtın başlaması ve sürdürülmesi için gereklidir. İnsan immün yanıtında temel proinflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-1' dir. Bunlara yardımcı sitokinler ise IL-6 ve IL-8' dir. Antiinflamatuvar sitokinler ise inflamasyonun daha sonraki evrelerinde salınırlar. Bunlar; IL-4, IL-10, IL-11, IL-13' tür (51, 52).

Monosit, makrofaj, granülosit, endotel hücresi, dendritik hücre, keratinosit, T ve B lenfosit, mast hücresi, tümör hücresi gibi hücreler sitokin sentezleme ve salgılama yeteneğine sahiptir. Sitokinlerin etkileri reseptör sayısı ve afinitesi, ikincil haberci, gen kopyalaması, sitokin üretimi ve salınması veya metabolizması ile düzenlenir.

2.7.1. Tümör Nekrozis Faktör – Alfa

Tümör nekroz faktör – alfa nötrofil birikiminde, granülom oluşumunun indüksiyonunda, adezyon moleküllerinin endotel hücrelerine etkilerinde ve intestinal permeabilite artışına etken olan bir maddedir. Klinik çalışmalarda serum TNF- α düzeyi, CH olan bireylerde normale göre artmış olarak saptanmıştır (53). Etkisini IL-6' yı artırarak gösterir. Interlokin-6'da hepatositler üzerine hem mitojenik hem de anti-apoptotik etkiler göstermekte ve hasar sonrası karaciğer rejenerasyonunu olumlu etkilemektedir.

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), gram negatif bakterilere konak yanıtının temel mediatörüdür. Yüksek konsantrasyonlu lipopolisakkarit (LPS)' e bağlı doku hasarında, damar duvar içi pıhtılaşmada, dissemine intravasküler koagülasyon (DİC) ve septik şokta temel mediatördür. Tümör nekroz faktör alfa'nın temel kaynağı LPS'nin uyardığı mononükleer fagositlerdir. Ayrıca bu protein, antijen ile uyarılmış T hücreleri, aktive edilen doğal öldürücü hücreler ve aktive edilmiş mast hücreleri tarafından da salgılanır. İnflamasyonun patogenezinde ilk suçlanan sitokindir (54). Biyolojik aktivasyonunu TNF- α -RI ve TNF- α -RII reseptörlerine bağlanarak gösterir. Biyolojik etkileri vasküler endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörü oluşturmaya yol açarak, endotel yüzeyine lökosit adezyonuna neden olur.

Mononükleer fagositlerde ve diğer hücrelerden sitokin üretimini uyarır, virüslere karşı koruyucu etki gösterir, virustan etkilenen hücrelerin immün yanıtla parçalanmasını bozar. Bunu nitrik oksit sentetaz enziminin aktivitesinin arttırılmasıyla yapar. Ciddi metabolik bozukluk yaparak glukoz tüketimine ve karaciğerden glukoz üretiminden yetmezliğe neden olur (55). Anti-TNF tedavisi bilinen güncel tedavilere cevap vermeyen hastalarda dikkat çekici bir etkiye sahiptir (56).

2.8. MYELOPEROKSİDAZ (MPO)

Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan myeloperoksidaz (MPO) içerirler. Polimorf nötrofil lökositlerin %90'dan fazlasını oluşturan nötrofiller; 29 kompleman fragmanları, reaktif oksijen radikalleri, ve sitokinler tarafından aktive edilirler. Dokuya gelen aktive lökositler MPO, elastaz, proteaz, kollojenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı arttırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olur. İnflamasyon durumunda MPO ekstrasellüler ortama salınır. Bu nedenle nötrofil sekestrasyonunun göstergesi olarak MPO aktivitesinin ölçülmesi duyarlı bir testtir (57).

Myeloperoksidaz aracılıklı antimikrobial sistem, çeşitli bakteri, mantar, virus, mikoplazma, çok hücreli organizmalar ve memeli hücrelerine karşı etkilidir. Myeloperoksidaz çeşitli bileşikleri okside edebilen bir enzim substrat kompleksi oluşturmak için substratı olan hidrojen peroksit ile birleşir. Bunlardan oluşan ürünlerin oksidasyonu sonucu, çeşitli yollarla mikroorganizmayı etkileyebilen toksik ajanlar meydana gelir ve bunlar hücre ölümüne yol açar.

Nötrofillerin primer fonksiyonu fagositoz ve mikroorganizmaların sindirimi olmasına rağmen, bu hücrelerden toksik ajanların sızıntısı ve sekresyonu yakın hücrelere zarar verir ve fagositik kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosüpresif ve mutajenik etki gösterir (58).

2.9. ENDOTOKSİN

Endotoksin ilk olarak Richard Pfeiffer tarafından 1892 yılında tanımlanmıştır. Richard Pfeiffer bakterinin (*Vibrio cholera*) öldürülse bile, salınan zehirin yaşayan bakteri ile aynı reaksiyona yol açtığını göstermiştir. Bakterinin kendi içinden salgıladığı bu toksine endotoksin denir. Son yüzyılda bakteriyel endotoksin en fazla araştırılan konulardan biri olmuştur.

Endotoksin tüm gram negatif basillerin hücre duvar yapısında bulunan lipopolisakkarit yapının bir komponentidir. Polisakkarit kısmı Gram negatif suşlar arasında çeşitlilik gösterir. Endotoksin, direkt etkisinden ziyade hormonal ve kimyasal mediatörleri uyarak güçlü bir yanıtı neden olur. Endotoksinin lipid kısmını oluşturan Lipid A tüm gram negatif bakterilerde bulunup şok ve ölüme neden olan güçlü bir bağışıklık yanıtına neden olur.

Kan dolaşımında endotoksinin olmasına endotoksemi denir. Endotoksin ya direkt kanda bulunur ya da barsaktan kana translokasyonla geçer. Barsak kaynaklı endotoksemi özellikle cerrahi geçirenler, yanıklar, travma, karaciğer yetmezliği veya yoğun bakım hastalarında sık görülür.

Endotoksin ile maruziyet vücut tarafından toksinin fark edilmesini ve endotoksinin uzaklaştırılmasını sağlayan sistemlerin gelişmesine neden olmuştur. Barsak büyük miktarlardaki endotoksinin kan ve dokulara düşük miktarlarda sürekli salınımını sağlar. Endotoksin immün sistemin güçlü bir uyaranıdır. Küçük miktarları bile (pg/mL) IV olarak verildiğinde hızla ağır sepsis bulguları olan vasküler kollapsa, inflamasyona, koagülasyona ve çoklu organ yetmezliğine neden olur (59, 60).

3. MATERİYAL ve METOD

Bu deneysel çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM), Kasım 2009–Şubat 2010 tarihleri arasında yapıldı. Çalışma ile ilgili olarak Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alındı (Etik Kurul Karar Tarihi: 12.11.2008, Karar No: 08/63)

Çalışmada ağırlıkları 225–290 gram arasında değişen, 28–32 haftalık 21 adet erkek Wistar–Albino sıçan kullanıldı. Gruplar randomize olarak her biri 7'şer sıçandan oluşan 3 gruba ayrıldı:

Grup 1 (kontrol); Bu gruptaki deneklere rektal yoldan serum fizyolojik verildi.

Grup 2 (kolit); Trinitrobenzen sulfonik asit–etanol (TNBS–E) maddesi ile kolit oluşumu tetiklendi ve tedavi verilmedi.

Grup 3 (tedavi); Kolit tetiklendikten sonra GLP 2 maddesi uygulandı.

Sıçanlar deneyden 1 hafta önce laboratuvar koşullarına alınarak, 21⁰C'de barındırıldı ve standart sıçan yemi ile beslendi. Deneylerden önceki gece su serbest olmak üzere 12 saat aç bırakıldı. Bütün cerrahi işlemler sabah 08:00–11:00 saatleri arasında yapıldı. Anestezi intraperitoneal 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazine ile sağlandı. Deney süresince spontan solunuma bırakıldı. Anestezi sonrası sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi.

Kolit oluşumu için 3.5 F plastik kanül rektal yoldan 8 cm içeri itildi. Bu kanülden %50 TNBS + %50 etanol (TNBS–E) olacak şekilde 15 mg/0,3 ml/sıçan TNBS–E kolon içerisine yavaşça instile edilerek kolit tetiklendi. Daha sonra sıçanlar verilen maddenin kaçmasını engellemek için supin pozisyonunda anesteziden çıkana kadar bekletildi



Resim 1. TNBS–E Uygulanması

3.1. GRUPLAR

Kontrol grubunda (grup 1) rektal yoldan yapılan kateterizasyonla kolona sadece % 0,9'luk NaCl verildi. Kontrol grubundaki sıçanlar sadece intrakolonik saline aldı.

Kolit grubunda (grup 2) kateterizasyon ile 15 mg/0,3 ml/sıçan TNBS–E intrakolonik olarak verilip kolit oluşumu tetiklendi.

Tedavi grubuna ise (grup 3) kateterizasyon ile TNBS–E intrakolonik olarak verilip kolit oluşumu tetiklendikten bir gün sonra başlanarak ringerli laktat solusyonu içinde çözülmüş GLP 2 maddesi 50 mikrogram/kg/s.c olarak 7 gün boyunca, grup 3'teki hayvanlara uygulandı. Kontrol ve kolit grubundaki sıçanlar aynı anda aynı volümde steril salin uygulandı. Tüm enjeksiyonlar, %10 povidon–iyotlu antiseptik solüsyonla yapılan alan temizliğinden sonra uygulandı. Tüm sıçanlar 7 gün boyunca standart sıçan yemi ile beslendi.

3.2. CERRAHİ İŞLEM

Kolit indüksiyonunun 7. gününde intraperitoneal olarak 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazine ile sağlanan anestezi sonrasında sıçanlara %10 povidon–iyotlu antiseptik solusyonlarla lokal saha temizliği yapıldıktan sonra orta hat laparotomi yapıldı. Tümör Nekroz Faktör– α , plazma endotoksin düzeyi ve kan kültürü çalışmak için 3ml vena kavadan ve 2ml portal venden kan alındı. Üç–dört cc kadarı biyokimya tüplerine konuldu. Bakteriyel translokasyonu belirlemek amacıyla 1–2 cc kadar kan Pedi–Bac T aerobik kültür şişelerine steriliteye dikkat edilerek konuldu. Ardından transvers kolonun

ortasından rektuma kadar kolon rezeksiyonu yapıldı. Ayrıca karaciğer, dalak, mezenter lenf nodu steril penset yardımıyla ezilerek homojenize edilip, önceden hazırlanmış besiyerine taze bakteri elde etmek için pasajlandı.

Sıçanlar ölümcül doz ether inhalasyonu ile sakrifiye edildiler. Kan örnekleri santrifüj edilip -80°C 'ye konuldu. Dokuda MPO düzeylerini ölçmek, makroskopik ve mikroskopik değerlendirme yapmak için kolon rezeksiyon materyali longitudinal olarak açılıp fekal içerik %0.9 salin ile temizlendi. Daha sonra dokuda çalışılması gereken örnekler -80°C 'de homojenize edilmek üzere saklandı. Mikroskopik ve makroskopik değerlendirme yapmak için dokuların diğer kısmı ise % 10'luk formaldehit içerisinde saklandı.



Resim 2. Anestezi uygulaması



Resim 3. İinferior vena kavadan kan alınması

3.3. MAKROSKOPİK SKORLAMA

Kolonik mukozadaki makroskopik değişiklikler Pedro ve Campos tarafından tarif edildiği gibi 5 farklı şekilde sınıflandırıldı (61). Makroskopik morfoloji skorlamaları Tablo 1’ de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kolonik mukozadaki makroskopik bulguların sınıflandırılması (61)

DERECE	BULGU
0	Korunmuş, normal görünümlü mukozal tabaka
1	Ödem konjesyon ve yüzeysel ülserasyon olmadan eritemli alanlar
2	Lineer yüzeysel ülserasyonlar (7–15mm); deprese olmuş eritematöz veya daha koyu mukoza görünümü, granüler zemin
3	Düzensiz zemin üzerinde ülserli alan (15–45mm); ülserli mukoza çevresinde normal adacıkların ve ödematöz mukozanın bulunması
4	Yaygın düzensiz ve multipl ülserler (>45mm); incelmış barsak duvarı, granüler, irregüler zemin

3.4. MİKROSKOPİK SKORLAMA

Mukozanın makroskopik olarak değerlendirilmesinden sonra histolojik değerlendirmeler Yamamoto ve ark'nın tariflediği şekilde yapıldı. Kısaca, parafin bloklar oluşturulduktan sonra alınan kesitler Hemotoksilen&Eozin ile boyanıp mikroskop altında incelendi. Kolonik mukozadaki mikroskobik değişiklikler 0–3 değerleri arasında derecelendirildi (62).

Tablo 2. Kolonik mukozadaki mikroskopik bulguların sınıflandırılması (62)

DERECE	BULGU
0	Normal epitel, hücrelerde şişme yok, normal kript görünümü mevcut, düşük düzeyde monosit infiltrasyonu, ya hiç ya da çok az nötrofil infiltrasyonu
1	Tek epitel hücre kaybını ifade eder. Epitelyumda orta derecede şişme, kriptlere tek inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hafif monosit–nötrofil infiltrasyonu
2	Multipl epitel hücre kaybı, epitelyal düzleşme, kriptit oluşumu ve orta düzeyde monosit–nötrofil infiltrasyonu
3	Belirgin epitelyal ülserasyon, kript abseleri ve monosit ve nötrofil düzeylerinde belirgin artış olması

3.5. MYELOPEROKSİDAZ (MPO) AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

Kolon mukozasındaki MPO aktivitesi kolon homojenatları oluşturularak Krawisz ve ark'ın tariflediği şekilde MPO sıçan kiti kullanılarak (Cell Sciences, USA) Elisa yöntemi ile ölçüldü (57). Bu tekniğe göre kolonik mukoza buz soğukluğunda potasyum fosfat buffer ile (PH:6.0) heksadesiltrimetil amonyum bromid içeren çözeltide homojenize edildi. Homojenat 3 kez freeze low döngüsüne tabi tutuldu. On beş dk boyunca 40000 g'de 4 derecede santrifüj edildi. O–Dianisidin–H₂O₂ buffer süpernatanta eklendi ve absorbans değişikliği ($\lambda=460$ nM) 2 dk boyunca ölçüldü. Bir MPO aktivite ünitesi 1 dk'da degrade olan 1 mMol H₂O₂'e karşılık gelmektedir. Sonuçlar gram doku başına nanogram (ng/g doku) şeklinde ifade edildi.

3.6. SERUM TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR – ALFA (TNF- ) DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Serum TNF-  düzeyleri için kan örnekleri 4000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek serum ayrıştırıldı. Serum  rnekleri eppendorf tüplerine konularak analiz gününe kadar –70  C’de saklandı. Serum TNF-  düzeyi pg/ml olarak Sıçan TNF-  Elisa kiti ile saptandı (Sıçan TNF-  İnvitrogen ELİSA Kit, USA).

3.7. PLAZMA ENDOTOKSİN ÖLÇÜMÜ

Portal venöz kanda plazma endotoksin seviyesi  l  m  Limulus–amebosit–lisate testin (Sigma) kantitatif modifikasyonu ile ölçülmüştür. Sonuçlar pg/ml olarak belirtilmişt r.

3.8. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON SAPTANMASI

Mikrobiyolojik inceleme Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yapıldı. Kan kültürü için Pedi–BacT kültür şişesine alınan örnekler, otomatize kültür sisteminde değerlendirildi. Ekim yapılan şişeler 35–37  C’de enkübe edilip, sürekli çalkalanmakta ve 10 dakika aralarla izlenmektedir. Sıvı kültür şişelerinde oluŖan karbondioksit üretimi sürekli olarak kolorimetrik prensibe göre ölçülmekte ve cihazın her hücresindeki reflektometreler tarafından sürekli izlenmektedir. Pozitif şişe saptandığında görüntülü ve sesli mesaj ile pozitifliği bildirmektedir. Bu sistemde pozitif saptanan şişelerden kanlı agar ve Eosin–Metilen– Blue agar (EMB agar) plaklarına pasaj yapılarak 37  C’de 24 saat süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen mikroorganizmalar geleneksel yöntemlerle tanımlandı. Yedi gün içinde pozitiflik sinyali vermeyen örnekler negatif kabul edildi. Steril cam şişelerdeki beyin–kalp infüzyon besi yerine konulan doku örnekleri 37  C’de 24–48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda sıvı besi yerinden kanlı agar ve EMB agar besi yerlerine pasajlar yapılarak 24 saat 37  C’de inkübe edildi. Üreyen mikroorganizmalar geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlandı.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

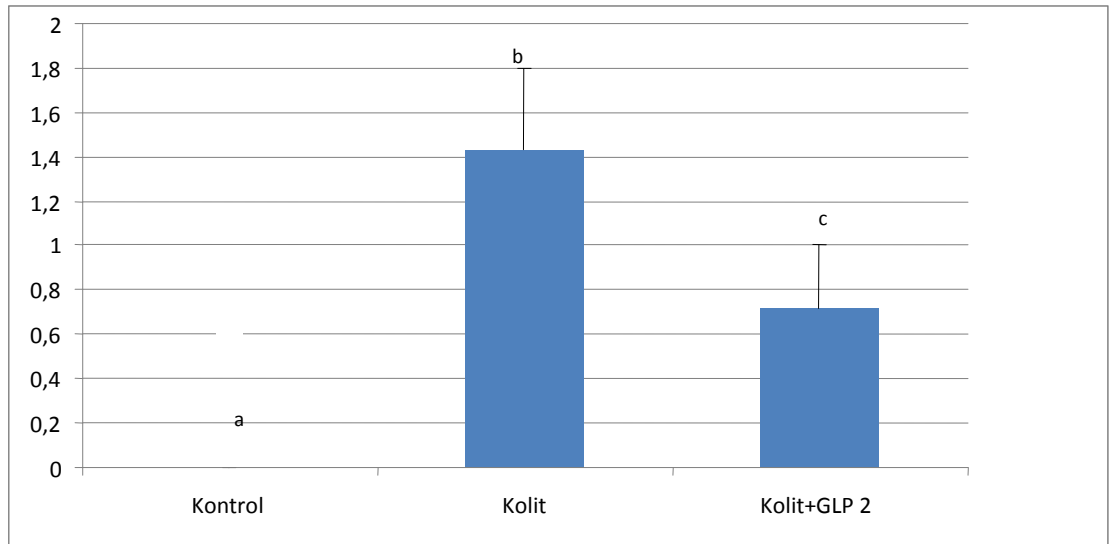
Veriler SPSS 15.0 ve SigmaStat 3.5 istatistik paket programlarında değerlendirildi. Verilerin normallik dağılımına Kolmogorov–Smirnov testi ile bakıldı. Grupların karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenler için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Tek yönlü varyans analizi sonucunda fark çıkan gruplarda çoklu karşılaştırmalarda Tukey testinden yararlanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenler için Kruskal Wallis analizinden yararlanıldı. Kruskal Wallis analizi sonucu fark çıkan gruplarda çoklu karşılaştırmalarda Student - Newman - Keuls testinden yararlanıldı. Bakteriyel translokasyon değerlendirilmesinde iki oran testlerinden yararlanıldı. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Çalışmamızda, 7.günün sonunda makroskopik hasar skoru değerleri, trinitrobenzen sulfonik asit-etanol (TNBS-E) ile kolit oluşturulan grupta(1.42 ± 0.36) , tedavi grubunda (0.71 ± 0.28), kontrol grubunda (0 ± 0) olup kolit, tedavi ve kontrol grubundaki değerlerin istatistik olarak birbirinden farklı olduğu saptanmıştır ($p= 0.007$). Grafik 1’de gruplardaki makroskopik hasar skorları gösterilmiştir.

Makroskopik hasar skorları



Grafik 1. Gruplara göre makroskopik hasar skoru değerleri (grade 0–4) ($p<0.05$). Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Grafikte gruplara göre ortalama ve standart hata değerleri gösterilmiştir.

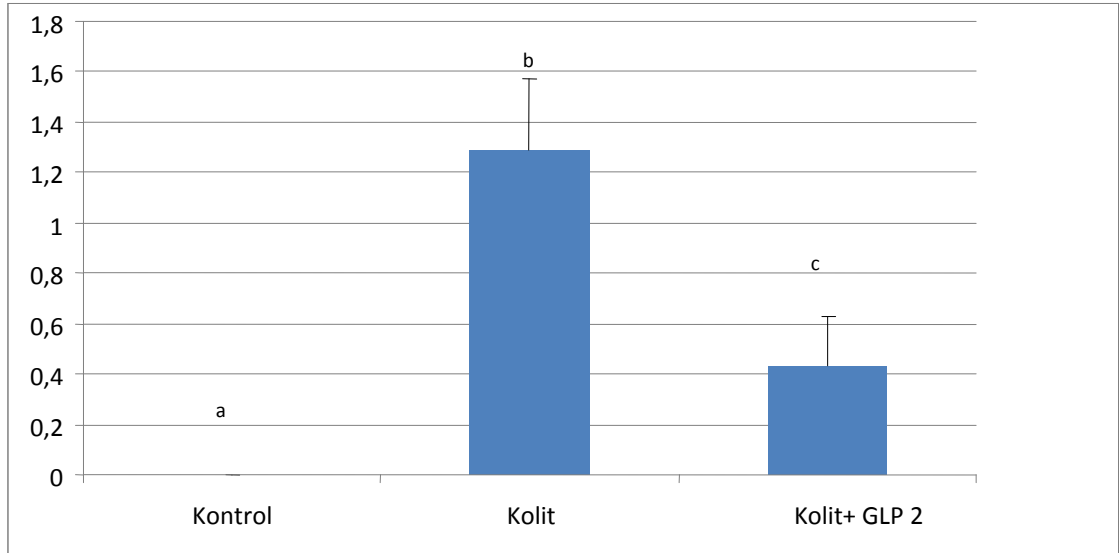


Resim 4. TNBS-E (kolit) grubunda izlenen inflamasyon ve nekroz görünümü

4.2. MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Çalışmamızda 7. gündeki mikroskopik hasar skorları, tedavi grubunda (0.42 ± 0.20), kolit grubunda (1.28 ± 0.28) ve kontrol grubunda (0 ± 0) olup kolit, tedavi ve kontrol grubundaki değerlerin istatistik olarak birbirinden farklı olduğu saptanmıştır ($p = 0.004$). Bu değerler Grafik 2’de gösterilmiştir.

Mikroskopik hasar skorları

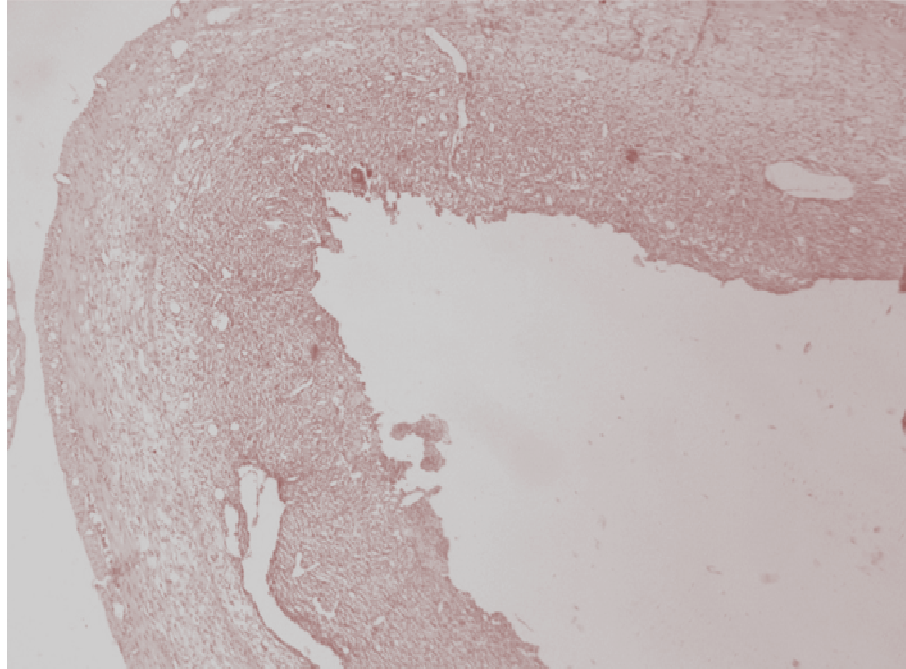


Grafik 2. Gruplara göre mikroskopik hasar skoru değerleri (grade: 0–3) ($p < 0.05$). Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Grafikte gruplara göre ortalama ve standart hata düzeyleri gösterilmiştir.

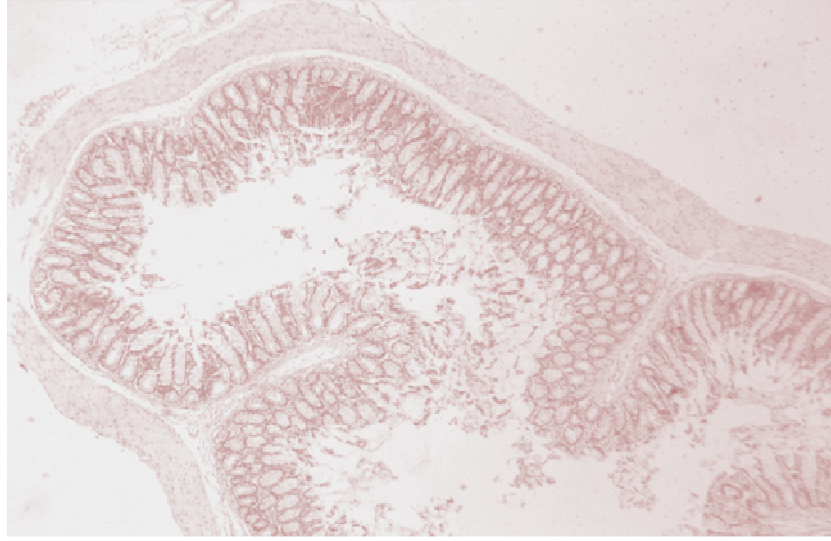
Gruplardan histopatolojik görünüm örnekleri;



Resim 5. Kontrol grubundan normal kolonik epitel görünümü



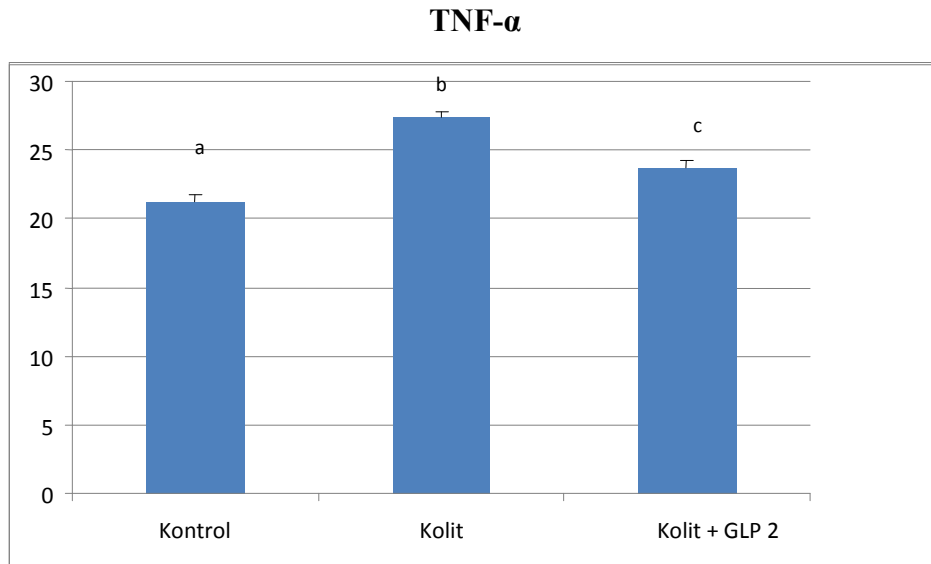
Resim 6. Kolit grubundan epitel hücre kayıpları, kriptit, erozyon, lenfoid follikül görünümü ve mukozal ülserasyon (Grade 2)



Resim 7. Tedavi grubunda epitelyumda orta derecede ödem, hafif inflamasyon görünümü lamina propriada nötrofil infiltrasyonu (Grade 1)

4.3. TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR-ALFA

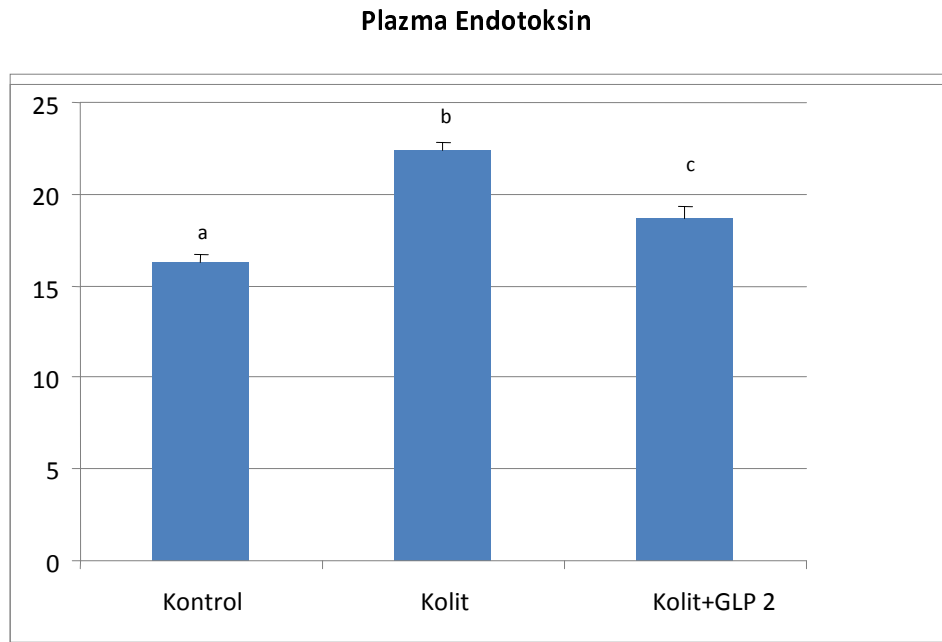
Yedinci gündeki TNF- α değerleri tedavi grubunda (23.7 ± 0.5), kolit grubunda (27.4 ± 0.3) ve kontrol grubunda (21.2 ± 0.42) olup kolit, tedavi ve kontrol grubundaki değerlerin istatistik olarak birbirinden farklı olduğu saptanmıştır ($p = 0.004$). Bu değerler Grafik 3’de gösterilmiştir.



Grafik 3. Gruplara göre TNF- α değerleri (pg/ml). Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Grafikte gruplara göre ortalama ve standart hata düzeyleri gösterilmiştir ($p < 0.05$).

4.4. PLAZMA ENDOTOKSİN SONUÇLARI

Plazma endotoksin düzeyinin 7. gündeki değerleri kolit grubunda (22.4 ± 0.42) , tedavi grubunda (18.7 ± 0.56), kontrol grubunda (16.285 ± 0.42) olup kolit, tedavi ve kontrol grubundaki değerlerin istatistik olarak birbirinden farklı olduğu saptanmıştır (p= 0.004). Bu değerler Grafik 4’de gösterilmiştir.

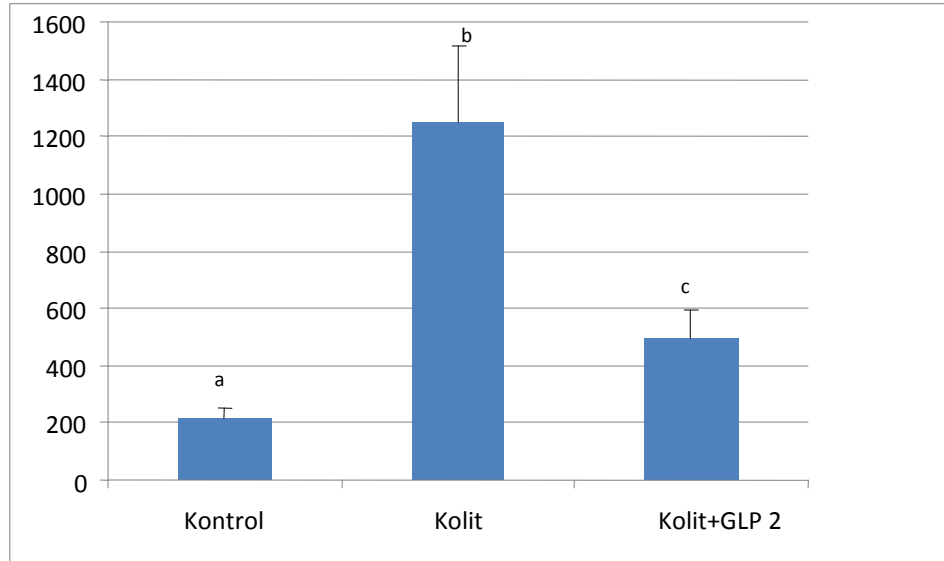


Grafik 4. Gruplara göre plazma endotoksin değerleri (pg/ml). Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir Grafikte gruplara göre ortalama ve standart hata düzeyleri gösterilmiştir (p<0.05).

4.5. MİYELOPEROKSİDAZ SONUÇLARI

Yedinci gündeki doku MPO değerleri tedavi grubunda (496.2 ± 94.8), kolit grubunda (1253.1 ± 263.4) ve kontrol grubunda (218 ± 34.1) olup kolit, tedavi ve kontrol grubundaki değerlerin istatistik olarak birbirinden farklı olduğu saptanmıştır (p= 0.001). Bu değerler Grafik 5’de gösterilmiştir.

Doku MPO değ erlendirmesi



Grafik 5. Gruplara göre MPO değ erleri (ng/gr). Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir Grafikte gruplara göre ortalama ve standart hata düzeyleri gösterilmiştir ($p<0.05$).

4.6. BAKTERİYEL TRANSLOKASYON SONUÇLARI

Kontrol grubunda bakteriyel üreme saptanmamıştır. Trinitrobenzen sulfonik asit-etanol koliti karaciğer, dalak, MLN'ler ve portal kanda bakteriyel translokasyon sıklığının anlamlı ölçüde artmasına neden olmuştur. Kolit grubuyla karşılaştırılınca, GLP 2 ile tedavi edilen grupta karaciğer, dalak, MLN'ler, portal ve sistemik kanda bakteriyel translokasyonun azaldığı görülmüştür ($p= 0.021$). Değişik gruplarda bakteriyel translokasyon insidansı Tablo 3' de gösterilmiştir. Transloke olan bakteri Escherichia coli, Enterococcus faecalis ve Staphylococcus aureus, Enterobacter agglomerans olarak saptanmıştır.

Tablo 3. Gruplara göre bakteriyel translokasyon. Bakteriyel translokasyonu karşılaştırmak için İki oran testi kullanılmıştır. Pozitif testlerin sayısı tüm hayvanlar için test edildi (her grupta 7 sıçan). ($p<0.05$)

Dokular	Kontrol grubu	Kolit grubu	Kolit+GLP 2 grubu
MLN	0	7	4
Dalak	0	7	2
Karaciğer	0	5	2
Portal kan	0	5	1
Sistemik kan	0	3	0

5. TARTIŞMA

Ülseratif kolit ve CH akut ve/veya kronik inflamasyon ile karakterize olup, genel populasyon ile karşılaştırıldığında artmış kolorektal kanser riski olan, etyolojisi bilinmeyen iki hastalıktır (63). Ülseratif kolit 15– 30 ve 50–70 yaşları arasında iki kez pik yapar. Hastaların sadece %10'u 18 yaş altındadır. Hastalık kadın ve erkeklerde eşit sıklıkta görülür (64). İnflamatuvar barsak hastalığı, coğrafi dağılıma göre farklılık göstermektedir. Asya ve Güney Amerika'da daha nadir olup ÜK ve CH için görülme sıklıkları sırasıyla 0.5/100.000 ve 0.08/100.000'dir. Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre görülme sıklığı ÜK için 11/100.000 iken, CH için 7/100.000'dir (65).

Akut olaylarda bir çok deneysel hayvan modeli İBH'nın özelliklerini ortaya çıkarmakta eksik kalır. Ancak Trinitro–benzen sülfonik asid (TNBS) kolitinin, İBH çalışmalarında kullanılabilir olduğu kanıtlanmıştır (66).

İnflamatuvar barsak hastalıklarının araştırılmasında kullanılacak bir maddenin kolit modelinde, barsakta benzer morfolojik değişiklikler ortaya çıkarması ve patofizyoloji ile klinik semptom ve bulgular insandaki İBH'na benzer olmalıdır. Ayrıca deneyde kullanılacak hayvanların genetik geçmişleri, immünolojik sistemleri ve kullanılacak kimyasal maddelerin etkileri iyi tanımlanmış olmalıdır.

Trinitro–benzen sülfonik asid (TNBS) ile oluşturulan kolit modeli hapten ile tetiklenmiş gecikmiş tip hipersensitivite sonrası oluşan kronik bir inflamasyon ve ülserasyon modelidir. Ülserasyon ve barsak duvarındaki kalınlaşma kolit oluşumundan sonraki ilk 1–2 günde başlayıp 8 haftaya kadar devam ettiğinden bu model, kronik kolit oluşması için tercih edilmektedir. Histolojik olarak mukoza ve submukozada PMNL, makrofaj,

lenfosit, bağ dokusu, mast hücreleri ve fibroblastlardan oluşmuş inflamatuvar cevap mevcuttur (67,68). Bundan dolayı çalışmamızda TNBS kolitini kullandık.

İnflamatuvar barsak hastalıklarının patogeneğinde immün sistemin, genetik yatkınlığın ve çevresel faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (49). İnflamatuvar barsak hastalığındaki intestinal hasar, antioksidan sistemin bozulması ve fagositik hücrelerin infiltrasyonu sonucu ROS'un artması ile ilişkilidir (63). Dolayısıyla temel fizyopatolojik mekanizma Th1 ve Th2 lenfositlerinin aktivasyonunda düzensizlik ya da proinflamatuvar sitokinler ile antiinflamatuvar sitokinler arasında dengenin bozulmasıdır. Bu yönde çok sayıda çalışma yapılmıştır. T helper 1 hücreleri inflamatuvar yanıtın devamlılığını sağlayan sitokinleri (TNF- α , IL-1, IL -2, IL-6, IL -8, IL -12, INF- γ) üretirken (69), Th2 hücreleri ise inflamasyonu azaltan sitokinleri (IL-4, IL-10, IL-11, IL -13) üretirler. Bunlardan proinflamatuvar sitokinler inflamasyonu alevlendirir. Anti-inflamatuvar sitokinler ise inflamasyonu yatıştırır. Bu düşünce ile proinflamatuvar sitokinlerin etkisini yok edecek ya da azaltacak tedaviler üzerinde çalışılmaktadır (70).

İnflamatuvar barsak hastalıklarında, yapılan birçok klinik ve deneysel çalışmada intestinal mukozada oksidatif stresin arttığı, plazmada ve kolon mukozasında glutatyon peroksidaz (GPx), myeloperoksidaz (MPO), süperoksid dismutaz (SOD) gibi hücre içi antioksidan enzimlerin aktivasyonunun arttığı ve anti-oksidan (vitamin C ve E, selenyum, glutatyon, β karoten gibi) maddelerin seviyesinin azaldığı saptanmıştır (3).

Glukagon like peptide 2, gastrik motiliteyi inhibe ederek ve besin transportunu stimüle ederek besin emilimini arttırıcı rol oynar. Glukagon like peptid 2'nin trofik davranışları barsağa spesifiktir ve kript hücre proliferasyonunda stimülasyon yolu ile oluşturur ve mukozal epitelyal hücrelerdeki apoptozisin baskılanmasını sağlar.

Glukagon like peptide 2 barsak permeabilitesini, bakteriyel translokasyonu ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu, intestinal inflamasyon ve yaralanma durumlarında azaltır. Glukagon like peptide 2'nin etkilerini intestinal mukozadaki ve hipotalamusta lokalize olan G-protein-bağlı bir reseptör ile gösterir. Glukagon like peptide 2 reseptörü'nün intestinal lokalizasyonun nöral ve endokrin hücrelerle olması, fakat enterositlerle olmaması, etkilerinin indirekt sekonder bir sinyal mekanizması aracılığıyla olduğunu göstermektedir (41).

Sıçanlarda ve tavşanlarda yapılan bir çalışmada 7–10 gün boyunca hayvanlara ekzojen GLP 2 verilmiş ve hayvanların ince barsak villus boylarında, ince barsak kitlesinde özellikle de jejunumda olmak üzere önemli derecede bir artış ve barsak boyunda bir miktar uzama gözlenmiştir (71). Glukagon like peptide 2'nin neden olduğu mukozal kalınlık artışı kript hücre proliferasyonundaki artış ve enterosit apoptozis oranındaki ve proteolizisteki azalmaya bağlı olduğu görülmüştür (72). Bir diğer çalışmada fare, sıçan, domuz ve insanlara ekzojen olarak verilen GLP 2'nin ince barsak mukozası üzerine proliferatif etkileri gösterilmiştir (73).

Sıçanlarda yapılan diğer bir çalışmada 3 ay boyunca günlük GLP 2 infüzyonu verilerek GLP 2'nin büyüme üzerine etkisinin sadece gastrointestinal sistemde sınırlı kaldığı ve ekstraintestinal dokularda hücre proliferasyonuna ilişkin kanıt olmadığı saptanmıştır (74). Glukagon like peptid 2'nin gastrointestinal sistem üzerine koruyucu etkisi artmış epitelyal bariyer fonksiyon ve azalmış gastrointestinal sistem permeabilitesiyle ilişkilendirilmiştir (6).

Bazı çalışmalarda İBH'ında GLP 2'nin, ASA (Asetil Salisilik Asit) ile kombine tedavisinin kolonik mukozal bariyere koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (5). Ayrıca GLP 2'nin bir çalışmada IL 10 dan bağımsız antienflamatuar etkisi de gösterilmiştir (7).

Yine bazı çalışmalarda, GLP' 2'nin intestinal permeabiliteyi azaltarak nekrotizan pankreatitte bakteriel translokasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada pankreatit modelindeki intrinsik kısıtlamalardan dolayı, akut pankreatitli sıçanlar GLP 2 analoguyla 3 gün tedavi edilmiştir. İnce barsak kalınlığı artışı ve kript–villus yüksekliğinin istatistiksel olarak 6 gün sonra anlamlı oluşuna rağmen, GLP 2 analogu intestinal permeabiliteyi 3 gün sonra belirgin olarak azaltarak bakteriel translokasyonu rölatif olarak önlemiştir. Bu çalışmada GLP 2 dozu 50 mikrogram/kg/s.c uygulanmıştır (6).

Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak GLP 2'nin tedavi edici dozunu 50 mikrogram/kg/s.c olarak belirledik. Bazı çalışmalarda GLP 2'nin antienflamatuar etkisi bu dozda ve 5–10 gün sürelerinde kullanılmıştır (7). Bu literatüre dayanarak, çalışmamızda tedavi süresini 7 gün olarak belirledik. Çalışmamızda kolit sürecinin patofizyolojisinden yola çıkarak, GLP 2'nin İBH da anti enflamatuar etki ve intestinal

permeabiliteyi azaltarak bakteriel translokasyonu önleyici etkisi araştırılıp kolit tedavisinde GLP 2 nin yeni bir teropatik ajan olabileceğini düşündük.

Tümör Nekroz Faktör- α , İBH’da inflamasyon sürecini göstermede en önemli proinflamatuvar sitokinlerden biridir. Son zamanlarda yayınlanan çalışmalarda deneysel kolit modellerinde oral TNF- α antikorlarının verilmesi ile etkili tedavi sağlanmıştır. Tümör Nekroz Faktör- α düzeylerinin yüksek olması da bütün sıçan kolit modellerinin özelliğidir. Küçük ve ark., Met-RANTES’in deneysel kolit modelinde oluşan bakteriyel translokasyon üzerine etkilerini incelemişlerdir. Tümör Nekroz Faktör- α seviyelerinin inflamasyonunun artışına paralel olarak yükseldiğini, Met-RANTES tedavisinin serum TNF- α seviyelerini ve bakteriyel translokasyonu azalttığını saptamışlardır (16). Benzer şekilde Akcan ve ark., TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde melatoninin bakteriyel translokasyonu ve apoptozisi azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada kolit grubunda yüksek olan TNF- α ’nın enflamasyonla artan düzeyinin melatoninle tedavi edilen grupta azalması melatonin bakteriyel translokasyonu azalttığını ve TNF- α ’nın ise enflamasyona paralel arttığını göstermiştir (4).

Ayrıca Funakoshi ve ark.’nın çalışmasında ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, CH ve ÜK’li hastalarda IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α mRNA’sının artmış ekspresyonu gösterilmiştir (75).

Bizde çalışmamızda bu literatürlere benzer şekilde kolit oluşumunun 7. gününde ölçülen TNF- α değerlerini karşılaştırdık. Tedavi grubundaki değerlerin kolit grubuna göre TNF- α düzeylerinde anlamlı ölçüde azaldığını saptadık ($p<0.05$) (Grafik 3).

Burada GLP 2 ile tedavi edilen grupta, kolit oluşturulan gruba göre doku ve kanda bakteriyel translokasyonun azalmış olduğunu saptadık. Bu durumda GLP 2’nin intestinotrofik etkisi ile intestinal permeabiliteyi azaltarak bakteriyel translokasyonu önlediğini düşündük. Bunun sonucunda kolit sürecinde enflamasyonun azaldığını ve bununla TNF- α düzeyi ile paralel olduğunu düşündük. İnflamatuvar barsak hastalığının asıl patolojik özelliği mononükleer hücrelerin ve nötrofillerin intestinal dokulara infiltrasyonudur. Nötrofil ve monosit migrasyonu, lokal üretilmiş sitokinler ve bakteriyel hücre duvarı ürünlerinin tetiklemesi ile oluşur. Myeloperoksidaz aktivitesi, inflamasyon gelişmiş gastrointesitinal sistemde, nötrofil akımının göstergesi olarak kullanılmıştır. You ve ark. yaptığı deneysel kolit modelinde N-asetil sistein (NAC)

uygulanan farelerin intestinal dokusunda MPO seviyelerinin histolojik bulgular ile uyumlu olarak belirgin düşük olduğu gösterilmiştir (76).

Son yıllarda T hücrelerinin deneysel kolit oluşumundaki inflamasyonun patogeneğinde anahtar rol oynadığı görülmüştür. CD4 (+) hücrelerin intestinal mukozaya inflamatuvar bölgeler oluşturacak şekilde göçü söz konusudur. Daha önceki bazı çalışmalarda İBH olan veya TNBS–E kolitli sıçanlarda anti CD4 antikor, artmış CD4 tedavisinde fayda sağladığı görülmüştür. Artmış CD4 nötrofil ve makrofaj sayısı ile birlikte MPO aktivitesi de paralellik gösterir. Bu hücrelerin fonksiyon göstergesi olarak da bilinen MPO düzeyleri birçok çalışmada bir parametre olarak ölçülmüştür (77).

Iba ve ark., kolit modeli oluşturdukları sıçanlarda dextran sülfat sodyum ile tedavi edilen grupta yedi ve onbirinci günlerde ölçülen MPO aktivitelerinin kolit gruplarına göre anlamlı olarak gerilediğini izlemişlerdir (78). Domek ve ark., İBH patogeneğini araştırmışlar ve nötrofil infiltrasyon ve aktivasyonunun önemli rol oynadığını bunun da dokudaki MPO düzeyi ile belirlediğini öne sürmüşlerdir (79).

Bir çalışmada GLP 2'nin antiinflamatuvar etkisinin IL-10' dan bağımsız olduğu gösterilmiştir. Burada salinle tedavi edilenlere göre GLP 2 ile tedavi edilenlerde vücut ağırlığı kaybında iyileşme, histopatoloji ve MPO düzeyleriyle değerlendirildiğinde intestinal inflamasyonda azalma gösterilmiştir. Kolitli hayvanlarda GLP 2 ayrıca kript hücre proliferasyonunu ve kript hücre apoptozisini azaltmıştır. Interlökin 1-beta, TNF- α ve IFN gama, MPO gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyeleri GLP 2 tedavisinden sonra anlamlı derecede azalırken, IL 4 seviyeleri anlamlı derecede artmış, IL 6 üretiminde ise değişiklik olmamıştır (7).

Bizde çalışmamızda literatürle uyumlu olarak kolit oluşturulan sıçanlarda doku MPO düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu ($p<0.05$), GLP 2 tedavisi verilen grupta ise doku MPO düzeylerinin kolit grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu saptadık ($p<0.05$) (Grafik 5). Histopatolojik olarak da tedavi edilen grupta kolit grubuna göre makroskopik ve mikroskopik olarak düzelme olduğunu saptadık. Bu sonuçlar, ortaya çıkan mukozal hasar ve inflamasyon sürecinde GLP 2'nin kript hücre proliferasyonunu ve kript hücre apoptozisini azaltarak antiinflamatuvar sisteme katkı sağladığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda ayrıca kolit sürecinde oluşan bakteriyel translokasyonu, tedavinin 7. gününde sıçanlardan alınan doku (karaciğer, dalak ve mezenterik lenf nodu) ve kan kültürü sonuçlarıyla değerlendirdik.

İnflamatuvar barsak hastalığında intestinal mukozal bariyer inflamasyon ve ülserasyonla bozulur ve bakteriyel translokasyona izin verir ve bu olay hastalığın ağırlaşmasına neden olur. Enterik bakteriler ve onların ürünleri barsak duvarından karaciğer, dalak gibi ekstraintestinal sisteme uzanmasıyla sonuçlanır. Patojen bakteriler MLN' nda izole edilmiştir (16). Mukozal savunma sistemi luminal antijenlere ve bakterilere karşı direnç göstermede başarısız olursa, inflamatuvar cevap başlar ve makrofaj aktivasyonu ve gecikmiş tip hipersensivite reaksiyonu görülür (80).

Berg ve Garlington, gastrointestinal sistemde bakteriyel translokasyonu etken bakterinin epitelyal mukozadan lamina propriaya daha sonra da MLN'lere ve muhtemel diğer noktalara şeklinde tanımlamışlardır (81). Bakteriyel translokasyon, intestinal epitelin fiziksel hasarı, doğal barsak florasının bozulması ve fiziksel savunma ve immün savunmanın bozulmasıyla oluşur. Sonuçta barsak flora bakterileri aşırı çoğalır (16, 80). Antibiyotik kullanımı, yanık gibi durumlar barsak florasının stabilitesini bozarak mikroflorada artışa neden olur (35, 37, 38).

Yenidoğanlarda barsak bariyeri ve immün sistem tam olarak gelişmediğinden, açlıkta ise katekolamin gibi hormonların salgılanması arttığından barsak mukozasında hasar oluşur. Ayrıca yanık, travma, stres, kolestaz gibi durumlarda immün sistem baskılanması sonucu kan akımının azalıp barsak mukoza beslenmesinin bozulması sonucu oksidatif hasar oluşur. Bu oluşan barsak mukoza hasarı ise bakteriyel translokasyona neden olur (16, 27).

Biz de literatürle uyumlu olarak oluşturulan kolit sürecindeki bakteriyel translokasyonu değerlendirmek için plazma endotoksin, kan ve doku kültürü çalıştık. TNBS-E koliti karaciğer, dalak, MLNler ve portal kanda bakteriyel translokasyon sıklığının anlamlı ölçüde artmasına neden olmuştur. Glukagon like peptid 2 ile tedavi edilen grup, kolit grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer, dalak, MLN'ler, portal ve sistemik kanda bakteriyel translokasyonu düşürmüştür. Değişik gruplarda bakteriyel translokasyon sıklığı Tablo 3'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak kolit oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna göre plazma endotoksin düzeyi anlamlı oranda yüksek olup GLP 2 tedavisi verilen grupta anlamlı düzeyde azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$)(Grafik 4). Bu sonuç GLP 2'nin lenfatik permeabiliteyi azaltarak bakteriel translokasyonu önleyici etkisi ile ortaya çıkmış olabilir.

Sonuçlar ışığında; GLP 2'nin tedavisi antiinflamatuvar etki ve lenfatik permeabiliteyi azaltarak bakteriel translokasyonu önleyici etkisinden faydalanılıp kolit sürecini baskılamış olup, daha ileri deneysel ve klinik çalışmalar ile desteklenerek, İBH tedavisinde alternatif bir yaklaşım olabilir.

6. SONUÇLAR

Deneysel olarak TNBS-E ile oluşturulan kolit modelinde araştırılan GLP 2'nin etkileri incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar ortaya konmuştur.

1. TNBS-E ile deneysel olarak anlamlı şekilde kolit oluşumu sağlanmıştır.
2. GLP 2 verilen tedavi grubunda makroskopik skorlar ve histopatolojik görünüm açısından belirgin bir iyileşme saptanmıştır ($p<0.05$).
3. Kolit grubunda artan doku MPO düzeyleri tedavi grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$).
4. Kolit grubunda artan plazma endotoksin düzeyleri tedavi grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır. ($p<0.05$).
5. Kolit grubunda artan TNF- α düzeyleri tedavi grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$).
6. Kolit grubunda oluşan bakteriel translokasyon tedavi grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$).

Sonuçlar ışığında; GLP 2 tedavisi antiinflamatuvar ve lenfatik permeabiliteyi azaltarak bakteriyel translokasyonu önleyerek kolit sürecini baskılamış olup, daha ileri deneysel ve klinik çalışmalar ile desteklenerek, İBH tedavisinde alternatif bir yaklaşım olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:1–20.
2. Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J Intern Med*. 2007;261:349–62.
3. Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1991;88:1886–93.
4. Akcan A, Kucuk C, Sozuer E, et al. Melatonin reduces bacterial translocation and apoptosis in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis of rats. *World J Gastroenterol*. 2008;14:918–24.
5. L'Heureux MC, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-2 and common therapeutics in a murine model of ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:347–54.
6. Kouris GJ, Liu Q, Rossi H, et al. The effect of glucagon-like peptide 2 on intestinal permeability and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis. *Am J Surg*. 2001;181:571–5.
7. Ivory CP, Wallace LE, McCafferty DM, et al. Interleukin-10-independent anti-inflammatory actions of glucagon-like peptide 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G1202–10.
8. Fry RD, Kodner IJ. Anorectal disorders. *Ciba Clinical Symposia* 1985; 37: 6.
9. Guyton AC. Textbook of medical physiology . Çeviri: Çavuşoğlu HA. Tıbbi fizyoloji. Türkçe 8. Baskı. Nobel Yayınevi , İstanbul 1998; Cilt 2, ss 981–1108.
10. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512–9.
11. Vollaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:409–14.

12. Schultz M, Schölmerich J, Rath HC. Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis.* 2003;21:105–28.
13. Dickinson RJ, Vortan SA, Axon AT. et al. Increased incidence of faecal coliforms with in vitro adhesive and invasive properties in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1980;21:787–972.
14. Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, et al. Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15:61–8.
15. Akgun E, Caliskan C, Celik HA, et al. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. *J Int Med Res.* 2005;33:196–206.
16. Kucuk C, Sozuer E, Gursoy S, et al. Treatment with Met-RANTES decreases bacterial translocation in experimental colitis. *Am J Surg.* 2006;191:77–83.
17. Retsky JE, Kraft SC. The extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. In Shorter EG (ed), *Inflammatory Bowel Disease* Williams and Wilkins, Baltimore pp; 1995;474–491.
18. Sayek I. *Temel Cerrahi.* (1. Baskı), Güneş Kitabevi Ltd Şti., İstanbul 1991; ss 781–791.
19. Sayek I. *Temel Cerrahi,* (2. Baskı), Güneş Kitabevi Ltd Şti., İstanbul 1996; ss 1124–1133.
20. Sayek I. *Temel Cerrahi,* (3. Baskı), Güneş Kitabevi Ltd Şti., İstanbul 2004; ss 1203–1204.
21. İşler M, *İnflamatuvar barsak hastalığı ve probiyotikler,* Güncel Gastroenteroloji; 2005;135.
22. Sartor R.B. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation. In J.B. Kirsner (ed). *Inflammatory bowel disease.* Williams and Wilkins, Baltimore pp; 1999;153–78.

23. Behmann R, Meyer Z, Boschenfelder K. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin 10 or antibodies interleukin 12. *Eur J. Immunology*; 1996;26:934–8.
24. Niederans C, Backenhoff F, Schumader B, et al. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and Ulcerative colitis. *Hepato Gastroenterology* 1997; 90–107.
25. Veltkamp C, Ruhwald R, Giese T, et al. CD4+CD25+ cell depletion from the normal CD4+ T cell pool prevents tolerance toward the intestinal flora and leads to chronic colitis in immunodeficient mice. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:437–46.
26. Aşık M, Bayraktar Y. İnflamatuvar barsak hastalığında patogenezi ve tedavide yenilikler. *Güncel Gastroenteroloji* 2; 1998;156–62.
27. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, et al. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg.* 1993;80:512–6.
28. Mirshafiey A, Khodaldi A, Rahm B.H, et al. Sodium alginate as a novel therapeutic option in experimental colitis. *Scand J Immunol.* 2005; 61: 316–321.
29. Wolochow H, Hildebrand GJ, Lamanne C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: Effect of microbial size and concentration. *J Infect Dis.* 1966;116:523–28.
30. Van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk Lekkerkerk-v. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond).* 1971;69:405–11.
31. Berg RD. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. *Infect Immun.* 1981;33:854–61.
32. Banwell JG, Howard R, Cooper D, et al. Intestinal microbial flora after feeding phytohemagglutinin lectins (*Phaseolus vulgaris*) to rats. *Appl Environ Microbiol.* 1985;50:68–80.

33. Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg.* 1989;124:699–701.
34. Spitz J, Yuhan R, Koutsouris A, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. *Am J Physiol.* 1995;268:G374–9.
35. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg.* 1990;212:496–510; discussion 511–2.
36. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, et al. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.* 1998;42:29–35.
37. Albillos A, de la Hera A. Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis and bacterial translocation: working out the role of probiotics and antioxidants. *J Hepatol.* 2002;37:523–6.
38. Owens WE, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. *Infect Immun.* 1980;27:461–7.
39. Yigitler C, Gulec B, Aydogan H, et al. Effect of mesalazine, metronidazole and gentamicin on bacterial translocation in experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:1179–86.
40. Irwin DM. Molecular evolution of proglucagon. *Regul Pept.* 2001;98:1–12.
41. Burrin DG, Stoll B, Guan X.D. Glucagon-like peptide 2 function in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2003;24:103–22.
42. Xiao Q, Boushey RP, Cino M, et al. Circulating levels of glucagon-like peptide-2 in human subjects with inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278:R1057–63.
43. Jeppesen PB, Hartmann B, Hansen BS, et al. Impaired meal stimulated glucagon-like peptide 2 response in ileal resected short bowel patients with intestinal failure. *Gut.* 1999;45:559–63.

44. Xiao Q, Boushey RP, Drucker DJ, et al. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology*. 1999;117:99–105.
45. Brubaker PL, Crivici A, Izzo A, et al. Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology*. 1997;138:4837–43.
46. Hartmann B, Harr MB, Jeppesen PB, et al. In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2884–8.
47. Hoyt EC, Lund PK, Winesett DE, et al. Effects of fasting, refeeding, and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum. *Diabetes*. 1996;45:434–9.
48. Ulshen MH, Hoyt EC, Fuller CR, et al. Increased ileal proglucagon expression after jejunectomy is not suppressed by inhibition of bowel growth. *Dig Dis Sci*. 1996;41:677–83.
49. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med*. 2002;252:475–96.
50. Chance WT, Foley-Nelson T, Thomas I, et al. Prevention of parenteral nutrition-induced gut hypoplasia by coinfusion of glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol*. 1997;273:G559–63.
51. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling—regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*. 2000;28:N3–12.
52. Alkharfy KM, Kellum JA, Matzke GR. Unintended immunomodulation: part II. Effects of pharmacological agents on cytokine activity. *Shock*. 2000;13:346–60.
53. Murch SH, Camkin VA, Savaga MO. et al. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991;32:913–17.
54. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med*. 1987;316:379–85.

55. Giroir BP. Mediators of septic shock: new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit Care Med.* 1993;21:780–9.
56. Hoentjen F, van Bodegraven AA. Safety of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2009;15:2067–73.
57. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344–50.
58. Özbal Y. Temel immünoloji, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd., 2000; s. 51–53.
59. L Ilkka, J Takala. Critical Care Research Program Plasma endotoxin levels in the early phase of septic shock .*Intensive Care Medicine* 1996 Volume 22, Supplement 1.
60. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 1993;119:771–8.
61. Bertevello PL, Logullo AF, Nonogaki S, et al. Immunohistochemical assessment of mucosal cytokine profile in acetic acid experimental colitis. *Clinics (Sao Paulo).* 2005;60:277–86.
62. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, et al. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol.* 2000;164:4878–82.
63. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2007;52:1636–41.
64. Andres PG, Friedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999;28:255–81.
65. Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002;31:1–20.

66. Akcan A, Muhtaroglu S, Akgun H, et al. Ameliorative effects of bombesin and neurotensin on trinitrobenzene sulphonic acid–induced colitis, oxidative damage and apoptosis in rats. *World J Gastroenterol.* 2008;14:1222–30.
67. Wallace JL, Le T, Carter L, et al. Hapten–induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1995;33:237–9.
68. Shibata Y, Taruishi M, Ashida T. Experimental ileitis in dogs and colitis in rats with trinitrobenzene sulphonic acid—colonoscopic and histopathologic studies. *Gastroenterol Jpn.* 1993;28:518–27.
69. Cousins DJ, Lee TH, Staynov DZ. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. *J Immunol.* 2002;169:2498–506.
70. Constant SL, Brogdon JL, Piggott DA, et al. Resident lung antigen–presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. *J Clin Invest.* 2002;110:1441–8.
71. Tsai CH, Hill M, Drucker DJ. Biological determinants of intestinotrophic properties of GLP 2 in vivo. *Am J Physiol.* 1997;272:G662–8.
72. Fischer KD, Dhanvantari S, Drucker DJ, et al. Intestinal growth is associated with elevated levels of glucagon–like peptide 2 in diabetic rats. *Am J Physiol.* 1997;273: E815–20.
73. Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, et al. Glucagon–like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short–bowel patients with no colon. *Gastroenterology.* 2001;120:806–15.
74. Tsai CH, Hill M, Asa SL, et al. Intestinal growth–promoting properties of glucagon–like peptide–2 in mice. *Am J Physiol.* 1997;273:E77–84.
75. Funakoshi K, Sugimura K, Anezaki K, et al. Spectrum of cytokine gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestion.* 1998;59:73–8.

76. You Y, Fu JJ, Meng J, et al. Effect of N-acetylcysteine on the murine model of colitis induced by dextran sodium sulphate through up-regulating PON1 activity. *Dig Dis Sci.* 2009;54:1643–50.
77. Pfeiffer CJ, Qui BS. Recombinant human interleukin 11 decreases trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gastroenterology* 1995;108:88–93.
78. Iba Y, Sugimoto Y, Kamei C. Participation of mast cells in colitis inflammation induced by dextran sulfate sodium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002;24:15–8.
79. Domek MJ, Iwata F, Blackma H. Antineutrophil serum attenuates dextran sulfate sodium induced colonic damage in rat. *Scand J. Gastroenterology* 1995;30:1089–94.
80. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, et al. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg.* 1993;80:512–6.
81. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403–411.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Bülent HALAÇLAR'a ait “Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde Glukagon Like Peptid 2' Nin Bakteriyel Translokasyon Üzerine Etkisi” jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza :

Başkan İmza

Üye İmza

Üye İmza

Üye İmza

Üye İmza