

Ratlarda oluþturulan selektif baðýrsak dekontaminasyonunun peritoneal fibrinolitik aktivite üzerine etkisi

Effect of selective gut decontamination on peritoneal fibrinolytic activity in rats

Özer İlküþ*, Yamaç Erhan*, Hasan Aydede*,
Ahmet Var**, Ece Onur**

Amaç:

Bu çalışma; selektif baðýrsak dekontaminasyonunun (SBD) ratlarda peritoneal fibrinolitik aktivite üzerine olan etkisini ortaya koymak amacıyla planlanmıþtır.

Durum Deðerlendirilmesi:

İntestinal floranın peritoneal alanda gerçekleþen yara iyileþmesi sürecine olan etkileri literatürde sınırlı sayıda yer almaktadır. Flora kaybının ya da modülasyonunun karın içi yara iyileþmesi sürecini olumlu/olumsuz yönde etkilediði görüþü çok sayıda çalışma ile desteklenmeyi beklemektedir.

Yöntem:

Çalışmada ratlar 5 gruba ayrıldı. Grup 1'deki ratlara SBD+peritoneal adezyon modeli, grup 2'deki ratlara sadece peritoneal adezyon modeli uygulanırken, grup 3'deki ratlara SBD ve grup 4'deki ratlara sadece normal gıda verildi. Grup 5'a ise basit laparotomi uygulandı. Tedavi gruplarında ratlara cerrahiden önce üç gün süreyle günde iki kez gavaj yoluyla sbd (tobramisin 20 mg/l, polimiksin E 25 mg/l uygulandı. Kontrol grupları standart yemlerle beslendi. Cerrahi işlemden 72 saat sonra fibrinolitik parametrelerinden; doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve plazminojen aktivatör inhibitör tip-1 (PAI-1) ölçümü için hasarsız parietal periton bölümlerinden biopsiler elde edildi.

Bulgular:

Ortalama tPA deðerleri hem SBD hem de sbd+adezyon modeli oluþturulan grupta düşük bulundu ancak istatistiksel anlam saptanmadı. PAI-1 deðerleri SBD uygulanan gruplarda diðerlerine oranla yüksek saptandı ancak anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç:

Bu sonuçlar bize SBD uygulanan ratlarda peritoneal fibrinolitik aktivitenin azaldığını buna baðlı olarak da peritoneal adezyonların ortaya çıkabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler:

Selektif baðýrsak dekontaminasyonu, periton, fibrinolitik.

Cerrahi girişimler sonrası peritoneal alanda ortaya çıkan yapışıklıklar başta bağırsak obstruksiyonu ve infertilite olmak üzere pek çok komplikasyona yol açmaktadır (1-3). Ortaya çıkan yapışıklıklar yara iyileşmesi sürecinin fibrozis lehine bozulması sonrası ortaya çıkmaktadır (4). Bu süreci engelleme ya da geciktirme çabası güncelliğini korumaktadır. Günümüze değin karın içi yapışıklıkları engelleme çabası peritoneal yüzeylerde teması ortadan kaldıracı, azaltıcı moleküller üzerinde yoğunluk kazanmıştır. Ancak günümüzde peritoneal alanda yaşanan bu fibrinojenik süreçten immün sistem kökenli mekanizmaların sorumlu olduğunun gösterilmesi bu araştırmalara yeni bir sayfa açmıştır. Peritoneal alanda yer alan ve oldukça önemli immün fonksiyonlara sahip olan gastrointestinal sistemin bu süreçte rol oynayabileceği ortadadır. İntestinal mukozal immüniteden GALT sistemi hücreleri ve mikroflora birlikte sorumludurlar. Günümüzde kronik karaciğer hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve daha birçok hastalığın patogenezinin altında mikrofloradaki bozukluklar sorumlu tutulmaktadır. Bu çalışmada amaç peritoneal yüzeyde yaşanan yapışıklık sürecinde etkin rol alan fibrinolitik aktivitelerin flora değişikliklerinden etkilenip etkilenmediğini göstermektir.

Gereç ve Yöntem

Bu deneysel çalışma; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bilim Dalı ve Celal Bayar Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 75 adet Wistar albino cinsi dişi rat kullanıldı. Deney öncesi ve sonrasında denekler standart yem ve çeşme suyu ile beslendi.

Çalışmada ratlar beş gruba ayrıldı. Grup 1'deki ratlara SBD+peritoneal adezyon modeli, grup 2'deki ratlara sadece peritoneal adezyon modeli uygulanırken, grup 3'deki ratlara SBD ve grup 4'deki ratlara sadece normal gıda verildi. Grup 5'e ise basit laparotomi uygulandı. Tedavi gruplarında ratlara cerrahiden önce üç gün süreyle günde iki kez gavaj yoluyla SBD (tobramisin 20 mg/l, polimiksin E 25 mg/l) uygulandı. Kontrol grupları standart yemlerle beslendi.

Deneysel peritoneal adezyon modelinde ratlara intramüsküler ketamin anestezisi (75 mg/kg) altında 3 cm'lik orta hat kesisi ile laparotomi uygulandı. Ardından çekumun 2 cm'lik distal uç kısmı kuru gazlı bez

* Celal Bayar Üniversitesi Genel Cerrahi AD, MANİSA

** Celal Bayar Üniversitesi Biyokimya AD, MANİSA

Özer İLKÜŞÜL

Didim-2, Giriş: 7-8, Daire: 4, Atakent-Karşıyaka / İZMİR

Faks: (0232) 247 97 83

e-posta: oilkugul@hotmail.com

Ratlar	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	3,26	3,27	0,50	0,86	3,27
2	3,11	1,64	1,52	2,75	3,20
3	1,32	0,71	4,76	0,41	3,63
4	3,60	0,82	2,65	2,25	1,25
5	2,01	0,87	1,25	4,45	1,14
6	2,03	1,01	3,74	3,50	1,38
7	0,86	3,12	0,58	1,02	1,54
8	0,50	3,07	1,20	2,00	0,45
9	2,88	1,79	1,00	4,76	3,52
10	2,12	2,14	1,89	0,50	0,64
11	1,40	1,29	4,75	0,99	1,39
12	4,55	1,57	3,88	2,13	1,06
13	2,80	0,80	2,73	2,31	1,58
14	2,68	1,51	4,38	1,61	2,01
15	0,39	2,02	1,47	1,67	3,34

Ratlar	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	18,00	15,63	54,84	7,88	8,01
2	28,92	13,27	46,61	4,97	11,35
3	0,52	4,66	38,70	11,59	3,84
4	0,82	13,90	15,45	7,60	3,65
5	0,69	11,98	6,08	10,66	115,36
6	12,12	6,71	2,98	2,78	11,92
7	3,48	5,96	3,57	2,88	59,31
8	0,17	13,55	1,75	2,31	16,29
9	2,95	44,68	5,62	114,16	5,17
10	19,13	34,59	7,42	0,94	20,33
11	0,17	36,82	12,47	5,80	12,45
12	148,10	13,54	8,00	22,05	16,20
13	43,41	3,99	8,15	11,50	11,40
14	36,92	27,76	14,62	12,50	22,22
15	16,04	15,63	7,36	13,50	12,90

üzerine yerleştirildi. Çekum duvarı ekimoz oluşturulana değin en az 10 kez abrazyona maruz bırakıldı (5). Cerrahi işlem sonrası üçüncü gün denekler tekrar opere edilerek parietal periton biopsi örnekleri elde edildi.

Peritoneal biopsi örnekleri; inceleme öncesinde -70° C'de bekletildi. Tüm örnekler fosfat tamponlu izotonik ile yıkanarak (PBS sodyum klorürlü 0.5 mol/l, pH 7.4) küçük parçalara ayrıldı. Parçalar uygun tüplere transfer edilerek buz soğukluğunda homojenizasyon tamponu eklendi (PBS sodyum-klorür 0.5 mol/L ve 0.01, % Triton-X 100). Örnekler buz üzerinde 10.000 devirde 3 dakika homojenize edildi (IKA T25 basic UK). Homojenatlar 10000g'de 3 dakika santrifüje edildi ve süpernatant sıvı porsiyonlara

ayrılarak çalışma anına kadar -70° C'de bekletildi. tPA ve PAI-1 düzeyleri Elisa yöntemi ile [Imubind® Tissue PAI-1 ELISA product No: 821 (Lot No: 021006) ve Bender MedSystems human t-PA ELISA Cat No: BMS 258 (Lot No: 25806-L2)] değerlendirildi. Sonuç absorbansları mikrokuyucu ile 450 nm'de okundu. Supernatant proteinleri Lowry metodu ile ölçülerek standart değerlerine göre hesaplandı (6). Sonuçlar ng/g doku proteini olarak verildi.

Gruplarda elde edilen sonuçlar; Mann-Witney U testi ile değerlendirildi ve p < 0.05 değeri istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

Postoperatif üçüncü gün elde edilen periton doku örneklerinde saptanan değerler Tablo-1,2,3'de

gösterilmiştir. Normal periton dokusundaki ortalama tPA değeri; 2.48±1.46 ng/g doku proteini olarak bulundu. Ortalama tPA değerlerinin hem SBD uygulanan grupta hem de SBD+adezyon modeli uygulanan grupta azaldığı görüldü (sırasıyla 1.96±1.11 ng/g doku proteini ve 1.73±1.42 ng/g doku proteini) ancak gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. (grup1/ grup2 p=0.44; grup1/ grup 4 p=0.17; grup3/grup 4 p=0.31). Buna ilaveten, ortalama PAI-1 değeri; SBD uygulanan grupta kontrol grubuna oranla daha yüksek bulundu. (sırasıyla 21.44±29.29 ng/g doku proteini, 15.57±16.86 ng/g doku proteini) ancak gruplar arası fark istatistik olarak anlamlı bulunmadı (p=0.27). Adezyon modeli ve SBD uygulanan grupta PAI-1 değeri sadece adezyon modeli uygulanan grupta karşılaştırıldığında ise yüksek bulunmadı (Tablo-3).

Tartışma

Bu çalışma sonunda elde edilen değerler göz önüne alındığında SBD'nin hem deney grubunda hem de kontrol grubunda peritoneal fibrinolitik aktiviteyi azalttığı görülmüştür. Bu tPa değerinin azalması, PAI-1 değerinin ise artması sonucunda ortaya çıkmıştır (7).

Peritoneal alandaki fibrinolitik sistemin rolü; fibrin oluşumunu dolayısıyla yapışıkları engellemektir (7). Fibrin oluşumu ve yıkımı arasında kurulan denge adezyon gelişimini etkileyen en önemli faktördür.

Gastrointestinal immün sistemin önemli bir komponenti olan intestinal flora önemli fonksiyonlara sahiptir. Bunlardan bazıları; mutajen ve toksinlerin eliminasyonu, immün defansın modülasyonu ve antioksidan, amino asid, yağ asidi ve growth faktör sentezidir (8,9). Tüm bunlar göz önüne alındığında intestinal flora değişikliklerinin peritoneal yüzeylerde yaşanan enflamatuvar

süreçler üzerinde de etkili olabileceği düşünülebilir.

Bugüne değin intestinal flora ile peritoneal iyileşme süreci arasındaki ilişkinin gösterildiği çalışma sayısı oldukça azdır. Bu çalışmalarda gastrointestinal floranın abdominal adezyon gelişimini arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (10). Bothin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; hem antibiyoterapi uygulanan hem de germ-free ratlarda adezyon gelişiminin azaldığı gösterilmiştir (11,12). Floranın bu etkiyi nasıl gerçekleştirdiği ise henüz ortaya konmamıştır. Bu fibrinolitik sisteme direkt ya da indirekt yolla etkiyle mümkün olabilir. Bağırsak bakterileri ile fibrinolizis arasında bir ilişki olduğu hipotezi ileri sürülebilir (11).

Bu çalışmada bütün bunların aksine, SBD uygulanan tüm gruplarda (hem deney grubunda hem de kontrol grubunda) istatistiki anlam taşıyor olsa da peritoneal fibrinolitik aktivitenin azalmış olduğu görüldü. Bu sonuçlar ışığında ise adezyon gelişimi olasılığı ile fibrinolitik aktivite arasında korelasyon kurulamadı.

Ancak homeostatik flora değişikliklerinin gastrointestinal immün sistem üzerine olumsuz etki edeceği gözden kaçırılmamalıdır. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, bağırsak flora değişikliklerinin inflamatuvar bağırsak hastalıkları, Crohn, karaciğer hastalıkları, kronik diare gibi bazı akut ve kronik hastalıkların patogenezinde rol oynadığı ortaya

Tablo 3: Peritoneal biopsi örneklerindeki fibrinoliz parametreleri (ortalama±SD)

Gruplar	PAI-1 ng/g doku proteini)	tPA ng/g doku proteini)
G1	16,54±27,68	1,73±1,42
G2	19,06±38,59	2,23±1,19
G3	21,44±29,29	1,96±1,11
G4	15,57±16,86	2,48±1,46
G5	17,33±12,59	1,64±0,88

Summary:

Effect of selective gut decontamination on peritoneal fibrinolytic activity in rats

Purpose: Our goal with this experiment was to determine the influence of selective decontamination of the digestive tract (SDD) on peritoneal fibrinolytic activity in rats.

Materials and Methods: Animals were divided into five groups. Group 1 was subjected to SDD-treated peritoneal adhesion. Group 2 was subjected only to peritoneal adhesion. Group 3 was SDD-treated, whereas Group 4 was labeled as the control group. Group 5 was subjected to simple laparotomy. The rats in Group 1 and Group 3 were given SDD (tobramycin 20 mg/l and polymyxin E 25 mg/l) by gavage twice daily for 3 days preceding surgical operation. Control groups were fed orally with standard chow. After a 72-hour waiting period following the operation, biopsies of undamaged parietal peritoneum were obtained from the fibrinolytic parameters in order to measure tissue-type plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1).

Results: Average tPA levels were low in both the sdd-treated group and the sdd+adhesion model group, however no statistical significance was elicited. PAI-1 levels were higher in sdd-treated groups than in other groups, but no significantly meaningful difference was obtained.

Conclusion: These results suggest that pretreatment with sdd reduces the peritoneal fibrinolytic activity and might also enhance the peritoneal adhesion formation in rats.

konmuştur (9). Bunlar göz önüne alındığında; peritoneal alanda yaşanan enflamatuvar süreçlerin selektif bağırsak dekontaminasyonu sonrası oluşan flora değişikliklerinden kötü yönde etkilenebileceğini düşünmek mümkündür.

Bu çalışma SBD ile elde edilen flora değişikliğinin peritoneal fibrinolitik aktivite üzerindeki etkilerini göstermeyi amaçlamıştır. Elde edilen sonuçlar; SBD uygulanan ratlarda fibrinolitik aktivitenin azaldığını

bunun da adezyon gelişme riskini artırabileceğini göstermektedir. Ancak literatürde yer alan çalışmalardan farklı olarak burada peritoneal adezyonun gelişip gelişmediği ölçülmemiştir. Burada fibrinolitik aktivitenin azaldığının gösterilmesi; immün sistem, gastrointestinal flora ve peritoneal yüzey arası ilişkinin varlığının ortaya konması bakımından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Ellis H. Prevention and treatment of adhesions. Infect Surg November 1983;803-807
2. Menzies D. Postoperative adhesions: Their treatment and relevance in clinical practice. Ann R Coll Surg Engl. 1993;75:147-153
3. Di Zerega GS. The peritoneum: Postsurgical repair and adhesion formation. In: Rock JA, Murphy AA, Jones HW, eds. Female Reproductive Surgery. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1992:2-18
4. Di Zerega GS. Biochemical events in peritoneal tissue repair. Eur J Surg 1997; [suppl 577]:10-16

5. Liebman SM, Langer JC, Marshall JS, Collins SM. Role of mast cells in peritoneal adhesion formation. Am J Surg, 1993; 163:127-30
6. Lowry O, Rosenbraugh N, Forr L, Rondall R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 183:265-275
7. Holmdahl L, Eriksson E, Al-Jabreen M, Risberg B. Fibrinolysis in human peritoneum during operation. Surgery. 1996; 119:701-5
8. Bengmark S. Nutritional modulation of acute and "chronic" phase response. Nutrition 2001;17:489-495
9. Bengmark S. Gut microbial ecology in critical illness: is there a role for prebiotics, probiotics,

and synbiotics? Curr Opin Crit Care. 2002; Apr;8(2):145-51

10. Bothin C, Midtvedt T. The role of the gastrointestinal microflora in postsurgical adhesion formation--a study in germfree rats. Eur Surg Res. 1992;24(5):309-12
11. Bothin C, Midtvedt T, Perbeck L. Orally delivered antibiotics which lower bacterial numbers decrease experimental intra-abdominal adhesions. Langenbecks Arch Surg 2003;388:112-115
12. Bothin C, Okada M, Midtvedt T, Perbeck L. The intestinal flora influences adhesion formation around surgical anastomoses. Br J Surg 2001;88:143-145