

Captopril'in EuroCollins ve UW (University of Wisconsin) Solüsyonlarına Eklenmesiyle Böbrek Hücrelerinin Canlılığı Artmaktadır

IMPROVEMENT OF KIDNEY CELL VIABILITY BY ADDITION OF CAPTOPRIL TO EUROCOLLINS AND UNIVERSITY OF WISCONSIN SOLUTIONS

Dr.Oğuzhan BÜYÜKGEBİZ(*), Dr.Alex YUSSIM(**), Dr.Hagit OR(**), Dr.Mustafa DÜLGER(*)

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, (*) Genel Cerrahi ABD, KOCAELİ,
(**) Rabin Medical Center, Dept. of Transplantation, Tel-Aviv, İSRAİL

ÖZET

Amaç: Serbest radikal tutucu özelliği olan Captopril'in (CPT) EuroCollins (EC) ve University of Wisconsin (UW) solüsyonlarına eklenmesi durumunda böbrek prezervasyonundaki etkinliğinin araştırılmasıdır.

Durum Değerlendirmesi: Captopril'in, iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığı, ayrıca nitrik oksit, endotelin ve bradikinin düzeylerini etkileyerek dokuların korunmasında etkin olduğu gösterilmiştir.

Yöntem: EC, UW ve bunlara CPT eklenerek (23µM) dört solüsyon oluşturulmuştur. Bu solüsyonların her biri ile hipotermik perfüzyonu yapılan tavşan böbreklerinden alınan hücreler CPT içeren ve içermeyen tiplerinde saklanmıştır. Bu hücrelerin, 24, 48 ve 72. saatlerde MTT assay'i yöntemiyle mitokondrial aktiviteleri ölçülerek CPT'in hücre canlılığı üzerindeki katkısı araştırılmıştır.

Çıkarımlar: CPT içeren EC ve UW solüsyonlarının, perfüzyonda ve hem perfüzyon hem de saklama döneminde kullanılması durumunda saptanan mitokondrial etkinlik düzeyleri sadece saklama döneminde kullanılmasına göre üstün bulunmuştur. Ayrıca CPT, 24, 48 ve 72. saatlerde her iki solüsyonun içerdiği canlı hücre sayısının anlamlı olarak yüksek kalmasını sağlamıştır.

Sonuç: CPT, hücre koruyucu özelliği ile EC ve UW solüsyonlarının prezervasyon özelliğini arttırmıştır.

Anahtar kelimeler: Captopril, böbrek prezervasyonu

SUMMARY

In organ transplantation there remains a relatively high incidence of delayed graft function related with inferior organ preservation and limited storage periods. Captopril (CTP), as an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor but, unlike other ACE inhibitors, contains sulfhydryl group and can act as free radical scavenger. Therefore, we aimed to investigate the use of Captopril in EuroCollins and University of Wisconsin preservation solutions. CTP containing (23µM) forms were also used with straight solutions during the perfusion (P) and the storage (S) periods of the kidney cells. The rabbit kidneys were flushed *invivo* with 100 ml of cold solutions. At the end of the perfusion fine needle aspirations were performed and the cellular aspirates were stored for 72 hours in EC, UW and CTP containing forms. At 24, 48 and 72 hours of the storage we used MTT assay to determine the cellular viability of preserved cells which is an indicator of mitochondrial enzymatic activity. In both solutions, CTP increased the viability of the preserved kidney cells except in use only for storage. The efficacy of EC and UW solutions were upgraded significantly at 24, 48, and 72 hours in groups. CTP showed its

distinguished effect when it was used during both perfusion and storage periods. CTP was found very effective to be used in both preservation solutions for prolonging the viability of the kidney cells.

Keywords: Captopril, kidney preservation

Organ naklinde, organ prezervasyonunun niteliği ve saklama süresinin kısıtlı olması başarıyı önemli ölçüde etkiler. Bu nedenle, bugüne değin farklı prezervasyon teknikleri ve solüsyonları geliştirilmiştir. Organın canlılığının nakil öncesinde değerlendirilmesi ise ayrı bir sorundur. İskemik dönemde mitokondrial elektron transfer zincirinin bozulması sonucunda, genelde serbest radikaller olarak bilinen reaktif oksijen türlerinde artış meydana gelir (1). Ayrıca hipotermi etkisiyle azalan mitokondrial oksidatif metabolizma, iskemi ve reperfüzyon döneminde gerekli olan ATP sentezinin de azalmasına yol açar (2,3). Bu durumda başta membran fonksiyonu bozukluklarını önleyerek hücrenin canlılığını sürdürüleceği en uygun iç ortamın oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla geliştirilen University of Wisconsin (UW) solüsyonunun prezervasyon süresini dramatik olarak uzattığı saptanmıştır (4,5). Halen böbrek naklinde geniş bir kullanım alanı olan EuroCollins (EC) solüsyonunun etkinliğinin ise, UW solüsyonuna göre daha az olduğu gösterilmiştir (6,7).

Captopril (CTP), bir ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitörüdür ancak diğer ACE inhibitörlerinden farklı olarak sülfidril grubu (-SH) içerdiğinden bir serbest radikal çöpçüsü gibi davranabilir (8,9,10,11,12). Biz bu nedenle, CTP'in EC ve UW prezervasyon solüsyonlarında kullanılmasının etkinliğini araştırmayı amaçladık. Greft fonksiyonları nakil sonrasında birçok mekanizmadan etkilendiği için, korunan organın hücresel canlılığını saptamada mitokondrinin enzim etkinliğini gösteren MTT Assay'ini kullandık (13,14). MTT Assay'i sitotoksikite ve hücresel ilaç duyarlılığının değerlendirilmesinde geniş kullanım alanı olan bir testdir (14,15).

GEREÇ VE YÖNTEM

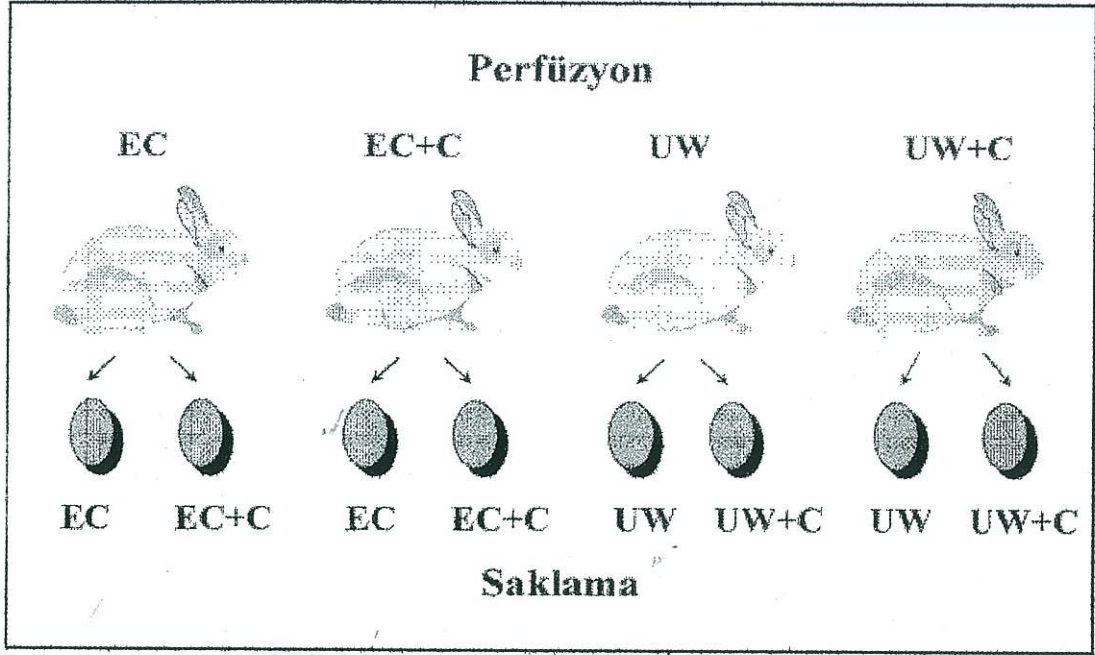
Prezervasyon solüsyonu olarak, EC, UW ve herbirine 5 mg/L CTP (23µM, Squibb-Bristol Myers, İstanbul) eklenmesiyle hazırlanan ECC ve UWC solüsyonlarından dört grup oluşturuldu. Ağırlığı 2.7-3.0 kg arasında değişen dört Yeni Zelanda albino tavşanı intramüsküler sodyum

pentobarbital (15 mg/kg) anestezisi verildikten sonra supin pozisyonunda tesbit edildiler. Karınları, traş edilip Betadine© ile boyandıktan sonra steril drape ile kaplandı. Orta hat kesisi ile karına girilerek, aorta abdominalis ve a.mezenterika süperior disekte edilip her iki böbrek tamamen serbestleştirildi. Aorta, böbrek pediküllerinin altından bir 8 F kateter ile kanüle edildikten sonra a.mezenterika süperior bağlanıp kesildi. Aorta böbrek arterlerinin üzerinden ve kateter giriş yerinin altından klempe edildi ve 100 ml soğuk prezervasyon solüsyonu ile böbrek perfüzyonu yapıldı. Ayrıca, böbrekler perfüzyon sırasında gazlı bez ile örtülüp buzlu perfüzyon sıvısı ile soğutuldu.

Bu işlemin sonunda, nefrektomi yapıldı ve yine buzlu sıvı içerisinde iken herbirine on kez ince iğne aspirasyon biopsisi (İİAB) uygulandı. Alınan örnekler homojenize edilip sayıldıktan sonra mikropipetleme yöntemi ile içerisinde perfüzyon solüsyonları bulunan 9 adet Eppendorf tüpüne eşit miktarda konuldu. Bu tüpler üçerli gruplar halinde 24, 48 ve 72. saatlerde mitokondrial aktiviteleri ölçülmek üzere +4°C'de saklandı. Bu çalışmada hücresel canlılık iki yönlü olarak değerlendirildi: Birincisi, solüsyonların organ üzerindeki perfüzyon etkisi, ikincisi de, saklama sırasında solüsyonların hücresel koruyucu veya toksik etkilerinin incelenmesi. Bu yüzden alıntı materyelleri, kullanılan perfüzyon solüsyonunun CTP içeren (+) ve içermeyen (-) türünün bulunduğu Eppendorf tüplerine konularak saklandılar. Böylece her dört solüsyon için perfüzyon (P) ve saklama (S) etkinlikleri CTP varlığı açısından ayrıca değerlendirildi (Şekil 1).

MTT Assay'i

İİAB örneklemesinden elde edilen hücreler 0.5 mL RPMI 1640 (Biol.Industries, İsrail) içinde süspansiyon edildi. Kamerada sayıldıktan sonra mikrokuyular (microwell) içerisine yerleştirilip 37°C'de 3 saat süreyle 1 mg/mL sarı renkli methylthiotetrazole (MTT)-dimethyltetrazolium bromide (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo) içeren 150 µc/L RPMI içerisinde inkübe edildiler.



Şekil 1: Perfüzyon döneminde kullanılan her bir solüsyon için, böbreklerden alınan hücreler, o solüsyonun Captopril (C) içeren ve içermeyen tipinde saklanmıştır. EuroCollins (EC), University of Wisconsin (UW).

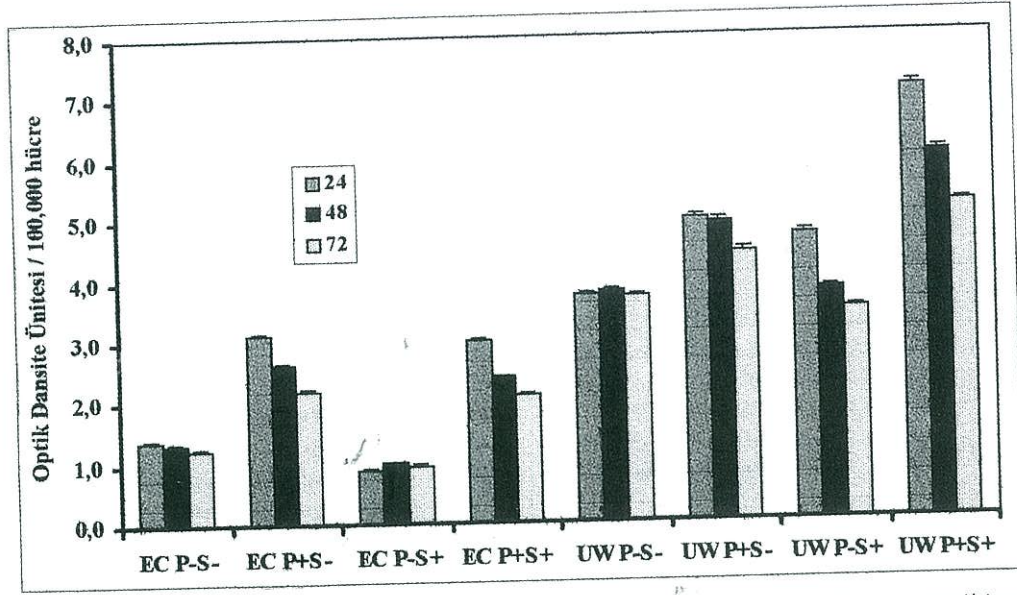
Bu sürenin sonunda medium uzaklaştırıldı ve mitokondrial dehidrogenaz ile MTT redüksiyonunun ürünü olan hücre içi formazan kristallerinin, herbir kuyu içerisine 100 µc/L dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo) eklenerek çözünmesi sağlandı. Kuyular daha sonra 30 dakika süreyle çalkalayıcı-inkübatörde bırakıldı. Mor bir renk alan formazan kristallerinin miktarı mikro-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) spektrofotometri (Titertek, İsveç) yöntemiyle 492 nm de ölçüldü. Her grubun her saatinin değerlendirilmesi için on ayrı ölçüm yapıldı. Bu yolla saptanan formazanın kantitatif miktarı canlı mitokondrilerin enzim etkinliğini yansıtmaktadır (16,17).

İstatistiksel Değerlendirme

Grup içi farklılıkların (24, 48 ve 72. saatler) karşılaştırmaları "tekrarlanan veriler için ANOVA" testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ çıkması durumunda çoklu karşılaştırmalarda Student-Newman-Keuls Testi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar "tek yönlü ANOVA" testi yapıldı $p < 0.05$ olması durumunda çoklu karşılaştırma testi olan Tukey-Kramer Testi uygulandı.

BULGULAR

Saklanan hücre örneklerinin MTT değerleri 24, 48 ve 72. saatlerde ölçüldü (Şekil 2). Sonuçlar her tüpte bulunan hücre miktarı bir katsayı ile düzeltilerek 10^5 hücre için optik dansite ünitesi olarak belirlendi (OD ünitesi/ 10^5 hücre). Daha yüksek olan absorbans değerleri daha iyi bir hücresel prezervasyonun göstergesi olarak yorumlandı. Her solüsyon tipinin kendi içinde 24, 48 ve 72. s. değerleri karşılaştırıldığında, EC solüsyonunun hem perfüzyon hem de saklamada kullanılması ile 24-48 s. ler arasında fark bulunmazken 48-72 ve 24-72. s. ler arasında fark bulunduğu ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$) görüldü. Perfüzyonda CTP kullanılan ancak düz EC solüsyonunda saklanan (ECP+S-) hücrelerin mitokondrial aktivitelerinde tüm saatlerde farklılık vardı (yukarıdaki sırayla $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.001$). CTP'in hem perfüzyon hem de saklamada kullanıldığı (ECP+S+) grupta da bu farklılıklar anlamlı bulundu ($p < 0.001$). EC ile perfüze edilip CTP'in sadece saklamada kullanıldığı grupta ise (ECP-S+) 24-48. s. değerleri dışında ($p < 0.05$), 48-72 ve 24-72. s. lerde istatistiksel bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). 24, 48 ve 72. s. değerleri için bu



Şekil 2: EC ve UW solüsyonlarının perfüzyon (P) ve saklama (S) dönemlerinde Captopril içermesi (+) hücresel canlılığın korunmasında en belirgin katkısı sağlamıştır.

gruplar kendileri arasında karşılaştırıldığında çok anlamlı farklılıklar bulundu. UW solüsyonunun (UW P-S-), 24-48, 48-72 ve 24-72. s. karşılaştırmaları anlamlı bulunmaz iken, UW P+S+ grubunda son derece anlamlı idi ($p < 0.001$). UW P+S- grubunda ise 48-72 ve 24-72 s. lerde anlamlı farklılıklar saptandı ($p < 0.001$). CTP'in saklamada kullanıldığı UW P-S+ grubunda 24-48 ve 24-72. s. ler için $p < 0.001$ bulunurken 48-72. s. değerleri arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$). Bu gruplar kendileri arasında değerlendirildiğinde, sadece; UW P+S- ile UW P-S+ gruplarının 24. s., UW P-S- ile UW P-S+ gruplarının da 48. ve 72. s. leri arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). UW içeren grupların saatler arası diğer karşılaştırmalarında $p < 0.001$ bulundu. Bunların dışında EC ve UW solüsyonlarının tüm tipleri için, yalnızca EC P+S- ile UW P-S- gruplarının 24. s. değerlerinde anlamlı fark saptanmadı.

TARTIŞMA

Organ prezervasyonunda kullanılan yöntemler farklı patofizyolojik mekanizmalar gözönünde bulundurularak geliştirilmiştir. Bunların dayandığı üç temel ilke : 1) Hipotermi ile metabolizmanın baskılanması, 2) Soğukta saklanan organ için uygun bir fizik çevre ortamının yaratılması, ve 3) Normal metabolizmaya hızlı geçişi sağlayacak uygun bir biyokimyasal ortam sağlan-

masıdır (18). Metabolizmanın düşük ısıda baskılanması yöntemi, 0°C 'de bile aktif membran transpotunun devam etmesi nedeniyle yetersiz kalmaktadır (19,20). Hücresel fonksiyonları, saklama döneminde ve reperfüzyon sonrasında stabilize etmek amacı ile farklı elektrolit konsantrasyonları ve değişik katkı maddeleri kullanılmıştır. EC solüsyonunun içeriği daha dar kapsamlı ve elektrolit ağırlıklıdır (21). Oysa son yıllarda kapsamı genişletilen UW solüsyonu kolloid (hydroxyethyl starch), kalsiyum bağlayıcı laktobionat, raffinöz, tampon olarak fosfat, elektrolitler yanında adenozin, allopurinol, glutatyon, deksametazon, insülin ve antibiyotikler içerir (22). Bunlardan glutatyon oluşan hidroksil radikallerinin tutulması, allopurinol ise, özgül bir ksantin oksidaz inhibitörü olmamasına karşın, serbest oksijen radikalleri ile oluşan reperfüzyon hasarını azaltmak ve saklama süresini uzatmak amacı ile UW solüsyonuna eklenmiştir (18,22,23,24). Ancak hücresel metabolizmanın bir yan ürünü olan değişik yapıda birçok serbest radikal sürekli oluşmaktadır (1,25). Reperfüzyon hasarı öncesindeki proteolitik saldırı veya esansiyel SH gruplarının oksidasyonu da iskemi döneminde ksantin dehidrogenaz enziminin ksantin oksidaz'a dönüşümüne yol açar (26). CTP'in SH grubu da kolayca oksidasyon ve disülfid değişim tepkimelerine girerek (27) serbest radikallerle olan etkileşimlerinde disülfidlere dönüşebilir (28) ve bu süreçte serbest radikal çöpçüsü olarak

rol oynayabilir (8,9,10,11,12). Soğuk Collins solüsyonu ile perfüze edilen böbreklerin, reperfüzyon hasarı öncesinde CTP ön-tedavisi yapılmamasıyla böbrek kan akım değerlerinde belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir (29). EC solüsyonuna CTP eklenmesiyle perfüze edilen böbreklerin 12 saat saklandığı bir çalışmada, elektron mikroskopisi incelemesinde, CTP ile hücre morfolojinin daha iyi korunduğu gösterilmiştir (30).

Nakil öncesinde bir organın canlı hücre havuzunun hacmi yanında bu hücrelerin fonksiyonel niteliği de değer taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, perfüze edilen organdan alınan hücrelerin saklandığı solüsyonların etkinliğini o hücrelerin mitokondrial aktivitelerini ölçerek araştırdık. CTP'in, perfüzyon aşamasında kullanıldığı takdirde saklama döneminde dahi EC solüsyonunun etkinliğini arttırdığını saptadık. Oysa tek başına saklamada kullanılması bu etkiyi sağlamadı. UW solüsyonu için de benzer bir özellik gözlemlendi. CTP, yalnız perfüzyon veya her iki aşamada da kullanılması durumunda mitokondrial aktivitenin yüksek kalmasını sağladı. Sadece saklama döneminde kullanılması 48 ve 72. s.lerde UW solüsyonuna bir üstünlük kazandırmadı. Bu durum aynı zamanda, UW P+S- ile UW P-S+ gruplarının karşılaştırılmasında da gözlemlendi. İlk 24 s. sonunda arada fark bulunmazken ileri dönemde, CTP'in perfüzyonda kullanılmasının daha çok hücrenin canlı kalmasını sağladığı görüldü. Ayrıca, 24. s. değerlerinde EC P+S- grubunun UW P-S- grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemesi de CTP'in perfüzyon dönemindeki etkinliğinin bir göstergesi olarak yorumlandı.

Kapiller geçirgenlik çalışmalarında, bir hasarlanma etkisiyle karşılaşılan ilk organın, kan-doku sınırında bulunan endotel hücreleri olduğu gösterilmiştir (31,32). ACE, endotel hücrelerinin membranlarına bağlı olarak bulunur ve vazokonstriktör angiotensin II oluşumunu katalize ederken, bradikinin'i de (kininaz II olarak) inaktive eder (33). Bradikinin, nitrik oksit salınımına neden olur ve trombosit agregasyonunu inhibe eder (34). CTP'in vazodilatör etkisi ise rennin-angiotensin sisteminden bağımsızdır (35,36).

CTP'in SH grubunun vazodilatasyonu yönlendirmedeki rolü halen araştırılmaktadır. SH gruplarının hücre içinde inorganik nitrit ile tepkimeye girerek nitrik oksit serbestleştirdiği bilinmektedir. Bu durumda, sülfidril bileşenleri nitrik oksit oluşumu ve/veya salınımını düzenliyor olabilir (37). Bir diğer olası mekanizma da SH

bileşenlerinin nitrik oksit ile tepkimeye girip kimyasal olarak daha duragan ve/veya güçlü S-nitrosothiol oluşturmasıdır. S-nitrosothiol damar düz kasının gevşemesine ve GMP birikimine neden olmaktadır (38). Deneysel ortotopik böbrek naklinde reperfüzyon hasarı ile endotelin-1,2 düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır (39). CTP'in, endotelin-1,2 düzeylerini de etkileyerek barsakta ve böbrekte reperfüzyon hasarını önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir (40,41).

Bu çalışmada, CTP'in, özellikle hücresel düzeyde organ prezervasyonuna katkıda bulunduğu görülmektedir. EC ve UW solüsyonlarının etkinliğinin belirgin ölçüde artmış olmasıyla, prezervasyon sürelerinin uzayabileceği ve aynı zamanda organ kalitesinin de yükseleceği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, maliyet değerleri karşılaştırıldığında UW solüsyonuna göre çok daha ucuz olan EC solüsyonunun daha geniş bir kullanım alanına kavuşabileceği düşünülmüştür. Bunun gerçekliğinin ortaya konulması için CTP'in *in vivo* ve *in vitro* daha ileri modellerde değişik konsantrasyonlarda denenmesinin değerli olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Groot H de: *Reactive oxygen species in tissue injury. Hepato-Gastroenterol* 1994; 41:328-332.
2. Southard JH, Senzig KA, Belzer FO: *Effect of hypothermia on canine kidney mitochondria. Criobiology* 1980; 17:540-548.
3. Cunarro JA, Johnson WA, Uehling DT, Updike SJ, Weiner MW: *Metabolic consequences of low temperature kidney preservation. J Lab Clin Invest* 1976; 88:873-884.
4. Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO: *72-hour preservation of the canine pancreas. Transplantation* 1987; 43:5-9.
5. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO: *Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple storage with UW solution. Transplantation* 1988; 46:517-522.
6. Ploeg RJ, Coosens D, Vreugdenhil P, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO: *Successful 72-hour cold storage kidney preservation with UW solution. Transplantation* 1988; 46 (2):191-196.
7. Ploeg RJ, vanBockel JH, Lengendijk TH, Groenowegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, Thorogood J, Hermans J: *Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. Lancet* 1992; 340:129-137.
8. Goldschmidt JE, Tallarida RJ: *Pharmacological evidence that Captopril possesses an endothelium-mediated component of vasodilatation:*

- effect of sulfhydryl groups on endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257:1136-1145
9. Chopra M, Scott N, McMurray J, McLay J, Bridges A, Smith WA, Belch JJ: Captopril: a free radical scavenger. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 27:396-399.
 10. Flaherty JT, Weisfeldt ML: Reperfusion injury. *Free radic Biol Med* 1988; 5:409-19.
 11. Graeff PA de, Gilst WH van, Bel K, Langen CDJ de, Kingma JH, Wesseling H: Concentration-dependent protection by captopril against myocardial damage during ischemia and reperfusion in a closed chest pig model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9(Suppl.2):37-42.
 12. Westlin W, Mullane K: Does captopril attenuate reperfusion induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals. *Circulation* 1988; 77(suppl 6):130-9.
 13. Yussim A, Sandbank J, Nakache R, Shaharabani E, Shmueli D, Lustig S, Bar-Nathan N, Geyer E, Sobolev V, Or H, Shapira Z: Detection of preservation-induced tubular damage by fine needle aspiration and tetazolium-based quantitative cell viability assay. *Transplant Proc* 1994; 24(4):2379-2381.
 14. Ferrera R, Larese A, Berthod F, Guidollet J, Rodriguez C, Dureau C, Dittmar A: Quantitative reduction of MTT by hearts biopsies in vitro is an index of viability. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25:1091-1099.
 15. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M: An improved MTT assay. *J Immunol Meth* 1993; 157:203-207.
 16. Carmichael J, deGraff WC, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: Evaluation of a tetrazolium semiautomated colorimetric assay. *Cancer Res* 1987; 47:943-946.
 17. Killinger WA, Dorofi DB, Keagy BA, Johnson G: Improvement of endothelial cell viability at 4°C by addition of Lazaroid U74500A to preservation solutions. *Transplantation* 1992; 53:983-986.
 18. Southard JH, Belzer FO: New concepts in organ preservation. *Clin Transplantation* 1993; 7:134-137.
 19. Besarab A, Martin GB, Mead T: Effect of plasma proteins and buffers in flushing solutions on rat kidney preservation by cold storage. *Transplantation* 1984; 37:239-245.
 20. Lambotte L: Persistence of active and passive ionic transport during low temperature liver preservation. *Surgery* 1973; 73:8-14.
 21. Collins GM, Green RD, Halasz NA: Importance of anion content and osmolality in flush solutions for 48- to 72-hour hypothermic kidney storage. *Criobiology* 1979; 16:217-220.
 22. Biguzas M, Jablonski P, Howden BO, Tomas AC, Walls K, Scott DF, Marshall VC: Evaluation of UW solution in rat kidney preservation: The effect of pharmacological additives. *Transplantation* 1990; 49:1051-1055.
 23. Paller MS, Sikora JJ: Renal work, glutathione and susceptibility to free radical mediated postischemic injury. *Kidney Int* 1988; 33:843-849.
 24. Kalayoglu M, Sollingen HW, Stratta RJ: Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* 1988; 2:617-619.
 25. Turrens JF, Boveris A: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980; 191:421-427.
 26. McCord JM: Oxygen-derived radicals: A link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987; 46:2402-2406.
 27. Migdalof BH, Antonaccio MJ, McKinstry DN, Sindhvi SM, Lang S, Egli P, Kripalani KJ: Captopril: Pharmacology, metabolism and disposition. *Drug Metab Rev* 1984; 15:841-869.
 28. Ondetti MA: Structural relationships of angiotensin converting enzyme inhibitors to pharmacologic activity. *Circulation* 1983; 77 suppl 1:174-178.
 29. Anaise D, Lane B, Waltzer WC, Rapaport FT: The protective effect of calcium inhibitors and of Captopril on the renal microcirculation during reperfusion. *Transplantation* 1987; 43: 128-132.
 30. Ghaemi M, Aktan AÖ, Yeğen C, Cingi A, Okar İ, Yalın R: Böbreklerin basit-hipotermik korunmasında Kaptopril'in etkisi. *Ulu Cerr Der* 1998; 14:237-244.
 31. Jarasch ED, Bruder C, Heid HW: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand (suppl)* 1986; 548:39-46.
 32. Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81:22-29.
 33. Epstein FH: Regulatory mechanisms of the vascular endothelium. *N Eng J Med* 1990; 323: 27-36.
 34. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*. 2nd edition Clarendon press, Oxford, 1987:407-408.
 35. Thurston H, Sales JD: Converting enzyme inhibitor and saralasin infusion in rats: Evidence for an additional vasodepressor property of converting-enzyme inhibitor. *Circ Res* 1978; 42:588-592.
 36. Marks ES, Bing RF, Thurston H, Sales JD: Vasodepressor property of the converting enzyme inhibitor Captopril (SQ 14 225): The role of factors other than rennin-angiotensin blockade in the rat. *Clin Sci* 1980; 58:1-6.
 37. Ignarro LJ: Endothelium derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J* 1989; 3:31-36.
 38. Ignarro LJ: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30:535-560.
 39. Büyükgebiz O, Aktan AÖ, Haklar C, Yalçın AS, Yeğen C, Yalın R, Ercan ZS: BQ-123, a specific endothelin (ETA) receptor antagonist, prevents ischemia-reperfusion injury in kidney transplan-

- tation. *Transplant Int* 1996; 9: 201-207.
40. Büyükgebiz O, Aktan AÖ, Yeğen C, Yalçın AS, Haklar C, Yalın R, Ercan ZS. Captopril increases endothelin serum concentrations and preserves intestinal mucosa after mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Res Exp Med* 1994; 194:339-348.
41. Cüenal Ö, Aktan AÖ, Yeğen C, Kurtel H, Yalın R: Captopril prevents the oxidative damage to pro-

teins after renal ischemia reperfusion injury: role of endothelin-1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 56:23-27.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr.Oğuzhan BÜYÜKGEBİZ
Kocaeli Üniversitesi Hastanesi
41900, KOCAELİ

Total Enteral Nutrisyonun İmmunolojik Reaksiyonlara Etkisi

THE EFFECTS OF TOTAL ENTERAL NUTRITION TO IMMUNOLOGIC REACTIONS

Dr. Nihat KAYMAKÇIOĞLU*, Dr. Abdurrahman ŞİMŞEK*, Dr. Mutlu YAKUT*,
Dr. Serhat OĞUZ*, Dr. Akif TAN*, Dr. Ali ŞENGÜL**, Dr. Saadettin ÇETİNER*

GATA, (*) Genel Cerrahi ABD, (**) İmmunoloji BD, ANKARA

ÖZET

Amaç: Cerrahi hastalarda malnutrisyonun değerlendirilmesi ve Total Enteral Nutrisyonun (TEN) immunolojik reaksiyonlar üzerindeki etkilerini araştırmak.

Durum Değerlendirmesi: Beslenme yetersizliği görülen hastalarda immunolojik reaksiyonların baskılanmış olması morbidite ve mortalite için önemli bir risk faktörüdür. Bu hastalarda Nutrisyonel tedavinin uygulanabilirliği cerrahları malnutrisyonu erken tanıma ve beslenme durumunu ortaya koymak için daha güvenilir metodlar aramaya yöneltmiştir.

Yöntem: Bu prospektif randomize klinik çalışmada 16 hastaya 10 gün süre ile TEN uygulanmıştır. Nitrojen dengesi hesaplanarak malnutrisyon değerlendirilmiştir. İmmunolojik değerlendirmede Immunglobulin ve komplaman düzeyleri, fitohemaglutinine lenfositik cevap ve elektroforetik protein düzeyleri ölçülmüş, gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonuna bakmak için cilt testi yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirme için wilcoxon matched testi kullanılmıştır.

Çıkarımlar: TEN öncesi ve sonrası nitrojen değerleri karşılaştırıldığında azot dengesinin anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,01$). TEN sonrası total lenfosit sayısında, albumin / globülin oranında T-lenfosit aktivasyonundaki artma anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Fitohemaglutinine karşı oluşan lenfositik cevabın oldukça önemli bir parametre olduğu tespit edilmiştir. TEN öncesi ve sonrası cilt testi sonuçları arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p<0,02$).

Sonuç: TEN'in malnutrisyonlu hastalarda anerjik reaksiyonları düzeltici etkisi vardır. TEN uygulanmasının hücrel immun cevabı düzelttiği ve güçlendirdiği tesbit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Cerrahi, malnutrisyon, total enteral nutrisyon, immunoloji

SUMMARY

Investigating the malnutrition of surgical patients and the effects of total enteral nutrition TEN on immunologic reactions. Malnutrition is an important risk factor for mortality and morbidity as it causes immunologic deficiency. In these patients the possibility of nutritional treatment, surgeons tend to find methods of early diagnosis of malnutrition and the nutrition status of the patients. In this prospective randomized clinic trial; 16 patients were given TEN for 10 days. The malnutrition is evaluated by nitrogen balance. In order to evaluate immunologic status, immunoglobulin and complement levels, lymphocytic response to phytohemagglutinin, the levels of electrophoretic proteins, and skin tests of delayed hypersensitivity is used. Wilcoxon matched test is used for statistical analysis. When we compared the nitrogen balance before and after the TEN, we found on significant increase ($p<0,01$) The increase of total lymphocyte count, albumin /globülin ratio, and T-lymphocyte activation is found significant. ($p<0,05$) The lymphocytic response to phytohemagglutinin is found to be a quite important parameter. The results of the skin tests before and after the TEN is found to be significant ($p<0,02$). TEN has a positive effect on anergic reactions in malnourished patients. It is found that TEN corrects and improves the cellular immune response.

Keywords: Surgery, malnutrition, total enteral nutrition, immunology

Malnutrisyon; organizmanın gereksinimi olan makro ve mikro besin elemanlarından yoksun kalması sonucunda organ fonksiyon bozukluklarının ortaya çıkması şeklinde tanımlanmaktadır (1).

Beslenme bozukluğu olan hastalara ameliyat öncesi ve sonrası nutrisyonel destek sağlanması oldukça önemlidir. Nutrisyonel destek, postoperatif dönemde artan protein, kalori ve esansiyel besin maddelerinin teminini sağlayarak protein depolarını korumayı ve strese karşı oluşan metabolik cevabı minimuma indirmeyi amaçlamaktadır (2,3). Malnutrisyon sonucunda immun depresyona bağlı olarak enfeksiyonlara eğilim artmakta, yara iyileşmesi gecikmekte hipoproteinemiye bağlı ödem ve sütürlerin açılması görülmekte ve hastanede kalış süresi uzamaktadır (4,5,6,7). Çok önceden beri yetersiz beslenmenin immün sistemi etkilediği bilinmektedir. Ancak Protein Enerji Malnutrisyonu (PEM)'nin immun sistem üzerindeki etkilerini ortaya koyabilmek o kadar kolay olmamaktadır. Operasyon sonrası birkaç gün süre ile ağızdan alamayıp intravenöz mayilerle beslenen hastalar dışarıdan iyi görünebilmekte ancak malnutrisyon cerrahi stres ile birleşince immun sistemi baskılayıp hastayı enfeksiyona açık hale getirebilmektedir. Kronik ve devam eden malnutrisyon ise kronik enfeksiyonlara yol açmakta bu nedenle elde edilen verilerin hangisinin malnutrisyona, hangisinin ise enfeksiyona ait olduğuna karar vermek oldukça zor olabilmektedir (8,9).

Bu çalışmada cerrahi kliniğinde yatarak tedavi gören hastalarda malnutrisyon değerlendirilmiş ve Total Enteral Nutrisyonun (TEN) immunolojik reaksiyonlar üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Genel Cerrahi Anabilim Dalı kliniğinde Kasım 1996-Mayıs 1998 tarihleri arasında nutrisyonel desteğe gereksinimi olan, oral gıda alımına kontrendikasyon durumu bulunmayan, randomize seçilen çeşitli yaş, cinsiyet ve benign hastalık grubundaki 16 hastaya 10 gün süreyle Total Enteral Nutrisyon (TEN) uygulanmış ve TEN'in immun sistem üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmaya alınan hastalara TEN öncesi ve sonrası Azot dengesi, Nutrisyonel Prognostik (PNI) ve Risk indeksleri,

(NRI), günlük ihtiyaç duyulan kalori hesaplamaları yapılmıştır. Çalışma öncesi ve sonrası Hipersensitivite reaksiyonunu ölçmek için cilt testi, rutin biyokimya ve idrar tetkikleri, serum total protein, albumin, transferin, total lenfosit düzeyi, IgA,G,M, Kompleman, C3, C4 protein elektroforezi fitohemaglutinine lenfositik cevap, lenfosit subgrup tayinleri yapılmıştır.

TEN hastaların enerji ve besi öğelerini karşılayacak şekilde verildi. Günlük enerji ve protein ihtiyaçları Harris-Benedict Formülü ile hesaplandı. Tespit edilen günlük enerji ve besin öğelerini ihtiva eden enteral beslenme solusyonları, hergün 07-24 saatleri arasında eşit zaman aralıklarına ve miktarlarına bölünerek verildi. Bu zaman sürecinde başka nutrisyonel işlem uygulanmadı. Enteral beslenme ürünü olarak 500 cc. Biosorb standart*, 500 cc lik Biosorb Fiber*, 300 cc Alitraq**, 250 cc lik Ensureplus**, 250 cc lik qlucerna** ve 250 cc lik perative** kullanılmıştır (*Nutricia Impeks - İstanbul, **Abbott - İstanbul).

TEN öncesi ve sonrası ilk gün azot dengesi saptandı. Azot dengesi hesaplarırken idrarda 24 saatlik üre miktarı, total protein ve albumin değerleri ölçüldü Coulter Electronics Inc-DACAS model otoanalizörü. Hastalara 0,18-0,24 kg/gün değerleri arasında nitrogen desteği sağlandı. Organa ve strese yönelik nutrisyon programı uygulandı.

Transferin düzeyi, total demir bağlama kapasitesi üzerinden hesaplanırken (RA-100 Technicon IRELAND cihazında) otomatik olarak kapasite ölçümü yapıldı. Total lenfosit sayısı, tam kan sayımı sonucu elde edildi. TEN uygulamasına başlamadan hemen önce her hastaya hücrel immüitenin göstergesi olan gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonunu ölçmek için cilt testi tatbik edildi. Cilt testi Mullen ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle gerçekleştirildi (10). (Multitest-CMI, Merieux FRANCE) Cilt testi 7 antijen ve bir kontrol amaçlı gliserin solusyonu içeren. (Tetanoz toksoidi 550.000 ü/ml, Difteri antijeni 1.100.000 ü/ml, streptokok group C antijeni 2000 ü/ml, Tbc basili purifiye protein derivasyonu (PPD), Tüberkülin antijeni 300.000 ü/ml, kontrol amaçlı gliserin solusyonu 0,70 g/ml. candida albicanc antijeni 2000 ü/ml. Trikofiton (mentagrophytes/antijeni 150 ü/ml, proteus mirabilis antijeni 150 ü/ml). Cilt testi apareyi her hastanın önkol iç yüzüne uygulandı. 36-48 saat içinde oluşan

endürasyonlar değerlendirildi. Beş mm.den büyük endürasyona 2 puan verildi ve gecikmiş tip hipersensivite reaksiyonu normal olarak kabul edildi. Beş mm.den küçük endürasyona 1 puan verildi. Beş mm.den küçük endürasyon sellüler immunitenin var olduğunu ancak ümmün sistemin baskı altında olduğu şeklinde değerlendirildi. Ciltte reaksiyon gözlenmemesine sıfır puan verildi ve bu hastalar anejrik kabul edildi.

İmmunolojik ölçümler GATA Biyokimya ve İmmunoloji araştırma laboratuvarlarında yapıldı. Protein elektroforezi için Gelman 2020 Aleti ve Helana hazır kiti kullanıldı. Ölçüm sonrası fraksiyonlardaki değişiklik incelendi. Protein elektroforajı ve Ig'ler ile C3 ve C4 çalışılmak üzere iki adet tüpe (Meylan cadex, France) 5cc düzkan ve ayrıca EDTA'lı bir tüpe 5cc'kan alındı. Lenfosit subgruplarını belirlemek için Asit-Citrat-Dekstroz (ACD)'li bir adet tüpe 7 cc'kan ve Fitohemaglatinine cevabın ölçülmesi için Lityum – heparin içeren bir adet tüpe 10cc'kan alınarak buz içinde ivedilikle araştırma laboratuvarına gönderildi.

Ig G, A, M ve C_{3c} - C₄ düzeyleri için deep-freeze de bekletilen serumlar çalışma gününde, oda ısısında bir kez çözündürülmesinden sonra (BN-100 Nefelometri cihazı ve antiserumları kullanılarak Behringwerke AG, GERMANY) nefelometrik yöntemle ölçüldü.

Lenfositlerin fitohemaglutininlere cevabının ölçülmesi için, ilk aşamada alınan kanlardan Ficoll-dansite gradiyenti ile lenfositler elde edildi. Her örnekten elde edilen lenfositler, hücre kültürü vasatı ile 2x10⁶ hücre/ml konsantrasyonuna getirildikten sonra %20 otolog serumla destekli mitojenli ortamlara 10 mg/ml fitohemaglutinin (PHA, sigma USA) ilave edilerek 37 °C de %5 lik CO₂ ve %95 lik Atmosfer havalı inkübatörde 72 saat kültüre edildi, kültür sonrası ikinci aşamada, 0.5 MCI 3H-timidin ilave edilerek 18 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üçüncü aşamada hücreler, hücre hasatı cihazı kullanılarak özel cam elyaftan yapılmış kağıtların üzerinde hasat edildi. Hücre DNA'sı içine giren radyoaktif timi-

din miktarı, Beta sayıcısından CPM (dakika/sayım) olarak belirlendi. Lenfosit subgrup tayini için özel ACD'li tüplerde gönderilen kanlar engeç 30 dk. içinde çalışmaya alındı. FITC ve PE ile işaretili monoklonal antikorlar kullanılarak işaretlenen hücreler flow – cytometrede incelendi. (Becton DICKINSON Immunocytometry systems – San Jose, California – USA).

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS for windows 7,5 istatistik paket programı kullanılarak veriler bilgisayara aktarılmış ve analizlerde Wilcoxon matched testi (iki eř arası farkın önemliliği testi) kullanılmıştır.

SONUÇLAR

Hastaların yaş ortalaması 49.75 ± 5.19 olup (21-79 yaş) 13'ü erkek (%81.25), 3'ü kadın (%18.75) dir. Total enteral nutrisyon uygulanan hastaların tanıları Tablo 1 dedir.

TABLO 1: TEN UYGULANAN HASTALARIN TANILARINA GÖRE DAĞILIMI

Tanı	Hasta Sayısı (N = 16)
Kısa Barsak Sendromu	2
İnflamatuar Barsak Hastalığı	3
Künt Abdominal Travma	2
Kranial Travma	2
Safra fistülü (orta debili)	2
Ateşli Silah Yaralanması (Ameliyat Sonrası)	2
İleus Nedeniyle (Ameliyat Sonrası)	3
TOPLAM	16

TEN öncesi hastaların malnutrisyon düzeyleri eşit bulunmamış olup hastaların %50'sinde ciddi, %37.5'inde orta, %12.5 inde hafif düzeyde malnutrisyon var iken TEN sonrası %26.5'inde ciddi, %16.2'sinde orta, %7.3'ünde hafif düzeyde malnutrisyon tespit edilmiştir. TEN ortalama

TABLO 2: NİTROJEN BALANSI, NRI VE PNI DEğERLERİ

	TEN Öncesi	Sonrası	İstatistiki Değerlendirme
Nitrojen Balansı	-9.85±1.24 gr/gün	+ 2.59±1.40 gr/gün	p=0.0063 p < 0.01
NRI	84.08±10.31	91.05±10.31	p=0.0491 p < 0.05
PNI	66.27±12.9	52.9±20.1	p=0.0469 p < 0.05

TABLO 3: TEN ÖNCESİ BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER (n = 16)

Tetkikler	Normal Değerler	TEN Öncesi	Sonrası	İstatistiki Sonuçlar
Serum Albumin	(3.5- 5.5 gr/dL)	3.12±0.68	3.54±0.68	p=0.1641 p>0.05
Serum Transferin	> 250mg/dL	129.50±26.2	131.69±46.15	p=0.8613 p>0.05
Serum total protein	(5.5-7.5 gr/dL)	5.73±0.67	6.88±1.03	p=0.0015 p<0.05
Protein elektroforezi				
Albumin/globulin		0.8±0.18	0.92±0.21	p=0.1422 p>0.05
Albumin	(%52-65)	45.05±5.54	49.9±5.3	p=0.1240 p>0.05
α-1 globulin	(%2.5-5)	6.27±1.6	5.03±1.4	p=0.0427 p<0.05
α-2 globulin	(0.7-13)	12.36±2.06	11.81±2.18	p=0.2489 p>0.05
β-globulin	(%8-14)	13.34±2.52	12.43±2.01	p=0.2489 p>0.05
Gama -globulin	(%12-22)	22.9±6.4	25.1±5.9	p=0.0253 p<0.05

9.43±0.30 gün süreyle kesintisiz olarak uygulandı. Tablo 2'de Nitrojen balansı, Nutrisyonel Risk indeksi ve prognostik Nutrisyonel indeks durumu belirtilmektedir.

Biyokimyasal değerlendirmeler Tablo 3'de belirtilmiştir.

Cilt testleri ile TEN öncesi hastaların %2.5'inde anerji, %37.5'inde 5 mm.den küçük reaksiyon tespit edilmişken, TEN sonrasında hastaların %37.5'inde anerji, %22'sinde 5 mm'den büyük reaksiyon tespit edilmiştir. TEN öncesi cilt testi reaksiyon şiddeti 0.37±0.12 iken TEN sonrası 1.12±0.39 olarak saptanmıştır. Cilt testi sonuç-

ları arasındaki farklılık istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur. (p=0.0120 p<0.02) Tablo 4 te immunolojik tetkik değerlendirmeleri belirtilmiştir.

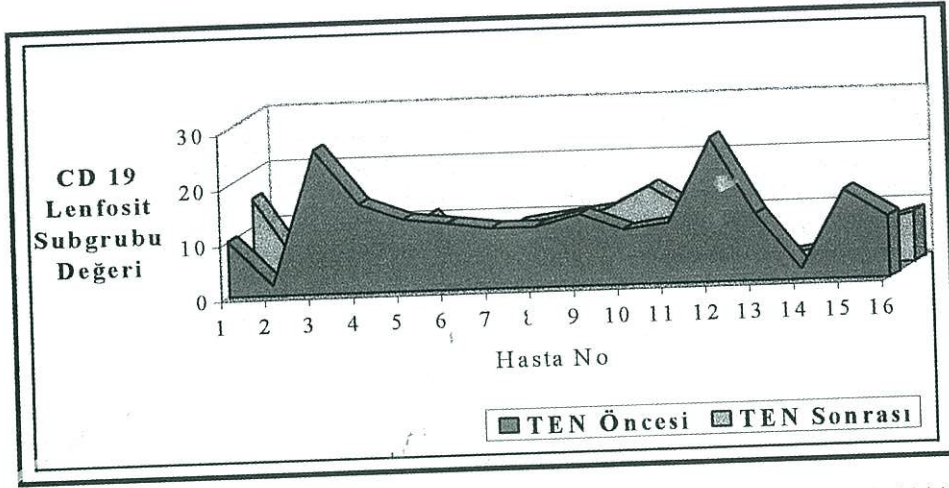
TEN öncesi ve sonrası CD-19 lenfosit sub grubu değeri arasındaki fark Şekil 1 'de şematize edilmiştir.

TARTIŞMA

Cerrahi iyileşmeyi etkileyen faktörlerden birisi hastanın beslenme dengesidir. Beslenme bozukluğu sonucunda malnutrisyon tablosu ortaya çıkmaktadır. Malnutrisyona bağlı olarak immün

TABLO 4: İMMUNOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Tetkik	Normal Değerler	TEN Öncesi (n = 16)	Sonrası (n = 16)	İstatistiki Sonuçlar
Serum total				
Lenfosit sayısı / mm ³		1541.75 ± 859.9	2143.2 ± 1211.4	p = 0.0435 p < 0.05
İmmun globulinler:				
A	(0.86-4.10g/L)	3.07±1.93g/L	4.16±1.85g/L	p = 0.0401 p < 0.05
G	(6.90-14.0g/L)	10.57±9.25g/L	12.80±7.79g/L	p = 0.0409 p < 0.05
M	(0.34-2.10 g/l)	1.01±0.39g/L	1.07±0.49g/L	p = 0.7983 p > 0.05
Kompleman 3(C ₃)	(0.75-1.40g/L)	1.25±0.65g/L	1.18±0.39g/L	p = 0.8203 p > 0.05
Kompleman 4(C ₄)	(0.10-0.34g/L)	0.22±0.09g/L	0.26±0.11g/L	p = 0.5321 p > 0.05
Fithemaglutinine				
Lenfositik cevap				
T lenfosit (CD 3)	(%60-85)	%67.3±13.9	%72.14±5.7	p = 0.0008 p < 0.01
Aktive T lenfosit (CD 3-DR)	(%10-19)	%18.1±19.2	%19.6±15.9	p = 0.426 p < 0.05
T helper (CD-4)	(%29-59)	%47.4±12.6	%45.5±11.5	p = 0.379 p > 0.05
T supresör (CD-8)	(%19-48)	%39.2±8.0	%38.0±7.9	p = 0.552 p > 0.05
CD4 / CD8 oranı	(%0.6-2.8)	38 ± 0.06	1.29 ± 0.06	p = 0.2660 p > 0.05
NK lenfosit (CD 16 + 56)	(%6-29)	%20.5±9.4	%21.5±7.7	p = 0.629 p > 0.05
B-lenfosit (CD 19)	(%7-23)	%12.9±6.5	%8.9±4.3	p = 0.0072 p < 0.01



şekil 1: TEN öncesi ve sonrası CD 19 lenfosit subgrup değerleri arasındaki farklılık

sistem deprese olmakta , enfeksiyonlara eğilim artmakta yara iyileşmesi gecikmekte, hipoproteinemiyeye bağlı ödem ve süturlerin açılması sık olarak görölmektedir. Aşıkar malnutrisyon tablosunu, kas zaafiyeti, halsizlik, güçsüzlük, periferik ödem ve belirgin immün sistem disfonksiyonu gibi bulguları tanımak kolaydır. Ancak malnutrisyonu saptamak düşünöldüğü kadar kolay olmayabilir (1). Malnutrisyon tedavisinde beslenme durumunun değerlendirilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (1,11).

Cerrahi hastalarında beslenme desteğinin amacı hastanın bozulmuş, beslenme durumunu düzeltmek veya artan protein enerji gereksinimini karşılayarak ameliyat sonrası morbidite ve mortaliteyi azaltmaktır. Komplikasyonsuz bir ameliyatta enerji gereksinimi %10 artarken, peritonitte %30-50 ve geniş yanıklarda %60-95 oranında artmaktadır. Ağır stres durumunda günde 200-250 gr kas proteini yıkılmakta ve idrarla 30-40 gr azot atılmaktadır. Bunun sonucunda multi organ yetmezliği gelişme riski artmakta ve mortalite yükselmektedir (12,13,14). Gastrointestinal kanalda oral alımı engelleyecek patolojiler olması ve yapılan ameliyatın erken dönemde oral alıma engel olması nedeniyle Total Parenteral Nutrisyon normal şartlarda ilk alternatiftir. Ancak oral gıda alabilen veya beslenme tüpleriyle yapılabilecek enteral beslenmenin erken evre intestinal ameliyatlı hastalarda bile ne kadar avantajlı olduğu bilinen gerçeklerdir (1,12,13,14). Enteral nutrisyon tanım olarak ağızdan veya beslenme tüpleriyle normal veya normale yakın çalışan gastrointestinal sistem aracılığı ile beslenme desteğinin sağlanmasıdır (2,3). Bu

yöntem bir bakıma doğal beslenme yoludur. TEN'i seçmenin en önemli nedeni açlık ve Total parental nutrisyonda ince barsak mikroflora değişikliği, immün fonksiyon bozukluğu ve mukozal bariyerin devamlılığın kaybolması gibi fizyopatolojik değişikliklerin görölmüsidir. Enteral uyarının olmadığı durumlarda barsaklarda hücresel kitle azalmakta, enterik flora değişmekte, endotoksinlere karşı geçirgenliği artmakta, barsak immunitesi azalmakta, gastrointestinal hormon salınımı değişmekte ve bakteriyal translokasyon gelişimi kolaylaşmaktadır (4,3,6,7).

Hastanın günlük protein gereksiniminin belirlenmesinde ve uygulanan beslenme programının yeterli olup olmadığının değerlendirilmesinde altın standart azot dengesinin saptanmasıdır. Operasyondan hemen sonra uygulanan nutrisyonel destek negatif azot dengesini düzeltir. Yara iyileşmesini kolaylaştırır ve ve enfeksiyon oranını azaltır (12). Kanserli hastaların %30-100 ünde nitrojen balansı negatiftir. Nitrojen balansı negatif olan kanserli hastalarda, erken postoperatif dönemde başlanan enteral nutrisyon destek sonrası tümör ve cerrahi stresin neden olduğu immün disfonksiyonun düzeldiği ve azot dengesinin pozitif düzeyde çıktığı bir çok çalışmada gösterilmiştir. (16,17,18,19). Yapmış olduğumuz çalışmada TEN öncesi ve sonrası nitrojen değerleri karşılaştırıldığında azot dengesinin istatistiki yönden anlamlı ölçüde farklılık gösterdiği tesbit edilmiştir (P < 0,01).

Protein sentezinde meydana gelen artış ile immün sistemin gelişimi arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Protein enerji malnutrisyonu sonucu ortaya çıkan immün sistem yetmezliği

cerrahi hastalarda septik komplikasyon görülme insidensinde artışa yol açmaktadır (20). Protein enerji malnutrisyonu immün sistemin hücrel komponentini etkilediği bildirilmektedir. Hücrel immünitadaki bozulmanın, humoral immünitadaki bozulmadan çok daha erken ve belirgin ölçüde gerçekleştiği. Sonuçta timus atrofisi geliştiği, dalağın küçüldüğü, lenfoid organların gelişiminin yavaşladığı, polimorf nüveli lokosit ve makrofaj aktivitesinde depresyon olduğu bildirilmektedir. T lenfositlerin oranı normalin altına düştüğü Lenfositlerin mitojenlere cevabında meydana geldiği ve depresyon deri testlerinde enerji görüldüğü ve Ig lerin seviyelerinin normal gibi gözükse de stimulusa karşı zayıf humoral cevap ortaya çıkarıldığı bildirilmektedir. (9,15).

Yapılan çalışmalarda nutrisyonel destek ile serum protein düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon olduğu , nutrisyonel desteğin tüm vücut protein metabolizmasını uyarıcı yönde etki yaptığı , protein yıkımında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (16,17,18). Buna nutrisyonel desteğin protein metabolizmasına etki yapmadığını bildiren yazılarda mevcuttur (6,18,21).

Çalışmamızda TEN-sonrası total protein düzeylerindeki artış anlamlı bulunmuştur ($P < 0,01$).

Birçok klinisyen kanserli hastalardaki hypoalbuminemiyenin hastalıkların bir sonucu olarak meydana geldiğini, nutrisyonel durumlarını yansıtmayacağını ifade etmektedirler. Serum albumin düzeyi malnutrisyon değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Protein enerji malnutrisyonunda albumin sentezi azalmaktadır (22). Serum albumin seviyesi ve ağırlık kaybındaki artışa göre NRI değerlendirilmektedir. Malnutrisyonun ciddiyetini belirlemede klinik kullanım alanına sahip olduğu ve peroperatif nutrisyonel destek sırasında iyi bir takip göstergesi olduğu belirtilmektedir (1,11,23). Çalışmamızda TEN öncesi ve sonrası değerler karşılaştırıldığında ortalama serum albumin düzeyinin belirgin bir şekilde değişmemesi, hastaların tedaviden olumlu yönde fayda göremeyebilecekleri anlamını çıkarsa da malnutrisyonlu hastaların yapılan nutrisyonel destekten istifade edip etmediklerini değerlendirmede parametre olarak sadece albumin düzeyini esas alan böyle bir indeksin tek başına kullanılması doğru değildir. Nitekim çalışmamızda TEN sonrası albumin düzeyinde artış görülmüş ancak bu artış anlamlı kabul edilmemiştir.

TEN'in etkinliğini saptamak için hastalık PNI'ye göre değerlendirildiğinde PNI değeri

yükseldikçe komplikasyon görülme oranı da artmaktadır,(10). Çalışmamızda hastalarda TEN sonrasında kayda değer komplikasyonların ve mortalitenin görülmemesi risk yüzdesinin azalması anlamlıdır ($p < 0,05$).

Yapılan bazı çalışmalarda TEN uygulanan hastalarda transferrin düzeyinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (6,21,24). Aynı şekilde çalışmamızda da TEN sonrası transferrin düzeyleri artmış ancak anlamlı bulunmaması dolayısıyla malnutrisyon değerlendirilmesi için transferrin düzeyinin iyi bir gösterge olmadığı sonucuna varılmıştır. Protein elektroforezi ile belirten spesifik serum protein profilinde prealbumin ve α_2 -globulin yapısal proteinlerdir. Çalışmamızda TEN sonrası albumin/globulin oranında meydana gelen artma anlamlı tespit edilmiştir. Alfa-1 globulin düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Beta-globulin düzeylerinde azalma olması anlamlı bulunmamıştır. Gama fraksiyonu sonuçlarına bakıldığında artış anlamlıdır ($p < 0,03$). Gama globulin düzeyinde artış beklenen sonuçtur. Akut faz proteinlerini ihtiva eden α_1 ve β globulin düzeyindeki bu farklı sonuçlardan TEN her iki fonksiyondan da önemli değişiklikler yapmadığı sonucu çıkartılmıştır. Bunda da en önemli neden stres faktörlerinin varlığıdır. Nutrisyonel destek ile kayıpların önüne geçilmeye çalışılır. Ancak desteğin yapılmadığı durumlarda α_2 β düzeylerindeki azalmaların anlamlılık kazanacağı aşikardır. TEN uyguladığımız hastaların bir kısmının çok azda olsa uyumsuzluk göstermesi , beslenme periyotlarına nadiren de olsa riayet etmemesi de sonuçları etkileyen bir başka sebep olabilir.

Hücrel immün cevap deri testleriyle değerlendirilebilmekle birlikte humoral immün sistem elemanı olarak Ig düzeylerinin gösterilmesinin malnutrisyon yönünden daha önemli gösterge olduğu savunulmaktadır (26,27). Alverdy ve ark TEN uygulanan grupların işlemde 1 hafta sonra IgA düzeylerinde değişiklik olmadığını belirtmişlerdir (28). Yashiden ve ark ise TEN uygulanan hastalarda IgA düzeyinde 2. hafta istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış olduğunu rapor etmişlerdir (29). Yine Gupta ve ark malnutrisyondan en sıklıkla IgA düzeylerinin etkilendiğini belirtmektedirler (15). Çalışmamızda TEN sonrası IgA düzeyleri artmıştır. Bu durum anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). IgG de anlamlı ölçüde artış olmuştur ($p < 0,05$). IgM artışı ise anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Kompleman düzeyleri TEN sonrası azalma göster-

miş ancak meydana gelen bu azalma anlamlı kabul edilmemiştir. Nutrisyonel destek saptanan hastalarımızda Immuglobulinlerin belirgin olarak artması, immunitenin nutrisyonel destekten olumlu yönde etkilendiği sonucunu ortaya çikarmıştır.

TEN uygulanan hastalarda protokol öncesi ve sonrası total lenfosit düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadığı bildirilmektedir (21). Total lenfosit sayısının %34 oranında yanlış pozitif, %50 oranında da yanlış negatiflik oranına sahip olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle sensitivite ve spesifitesinin düşük olmasından dolayı nutrisyonel değerlendirmeyi tam olarak yansıtmamaktadır (25).

Çalışmamızda total lenfosit sayısındaki artış anlamlıdır ($p < 0,05$). Ancak yanlış pozitif ve yanlış negatiflik oranı bu kadar yüksek olan bir parametre nutrisyonel değerlendirmeyi tam olarak yansıtmaz, çünkü lenfosit artışına yol açan birçok neden bulunmaktadır. Bu nedenle total lenfosit sayısı ancak diğer nutrisyonel parametreleri desteklemek amacıyla kullanılmalıdır.

Bir stimulan antijen ya da nonspesifik mitojenle karşılaşmayı takiben, lenfositlerin hızla proliferasyona gitmesi blastik transformasyon olarak isimlendirilmektedir. Genelde malnutrisyonlu hastalardan fitohemaglutinin gibi mitojenlere karşı oluşan lenfositik cevapta zayıflama görülmektedir. Ancak bu zayıflamış lenfositik cevap nutrisyonel tedavi ile düzeltilebilmektedir (30).

Chandra malnutrisyonda T lenfosit yüzdesinin ve mitojenlere karşı lenfositik cevabın azaldığını, bu azalmanın fitohemaglutininle sitimüle edilen lenfositlerin proliferasyonu için gerekli olan DNA sentezindeki azalma ile paralellik gösterdiğini, ancak bu lenfosit aktivasyonunda meydana gelen azalmanın, timusta primer bir patoloji yoksa nutrisyonel destek ile kısa sürede geri döndüğünü belirtmiştir (31). Enteral besleme uygulanan bazı deneysel çalışmalarda argininden zengin diyetlerin, timus boyutlarında ve mitojenlere karşı lenfositik proliferasyonda artışa yol açarak hücrel immünite üzerinde olumlu etki yaptığı gösterilmiştir (32,33). Çalışmamızda T-lenfosit aktivasyonunda meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). İmmünitenin değerlendirilmesinde fitohemaglutinine karşı oluşan lenfositik cevap oldukça önemli bir parametredir. Çünkü malnutrisyonda ilk olarak hücrel immünite zarar görmektedir. Bu nedenle zarar gören hücrel immüniteyi tespit edebilmek için mitojenlere karşı lenfositik cevabın ölçülmesi uygun olacaktır.

Malnutrisyonun humoral ve özellikle hücrel immün yanıtları bozduğu ancak nutrisyonel destek ile bozulan immunitenin geriye döndürülebildiği uzun zamandan beri ileri sürülmektedir. Ciddi malnutrisyon tablosu, T lenfosit subgruplarında değişikliğe yol açtığı bunun sonunda dokunun T helper (CD4)⁺ ve T supresör (CD8)⁺ lenfositlerin oranında bir azalma meydana geldiği bildirilmiştir (34). Bizim CD4/ CD8 oranımızı TEN öncesi 1.36 ± 0.06 iken TEN sonrası 1.29 ± 0.06 olarak bulunmuş azalma istatiki yönden anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Deneysel çalışmalarda argininden zengin diyetlerin antitümöral etki gösteren NK hücresi ve makrofoljların hücre sayısı ve Lith yeteneklerinde artışa yol açtığı, lenfositlerden IL-2 üretimini artırdığı dolayısıyla hücrel immünite üzerinde olumlu etki yaptığı gösterilmiştir (32, 33). Çalışmamızda CD4⁺, CD8⁺, CD 16 + 56⁺ hücre oranlarına ve CD4⁺/CD8⁺ hücre oranında anlamlı bir değişiklik olmadığı, CD3⁺ ve CD3⁺HLADR⁺ hücre oranlarında artış meydana geldiği ancak CD3⁺ hücre oranlarındaki artışın anlamlı olmadığı CD3⁺ DR⁺ hücre oranlarında ise meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). CD19⁺ hücre oranlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0,01$).

Azalan immün cevabın malnutrisyonla ilişkili olmasından dolayı cilt testleri nutrisyonel değerlendirmede yararlı bir parametredir. Ancak rutin uygulaması oldukça güçtür. Pozitif reaksiyonun olmaması anerjiyi gösterir, sadece bir antijene cevap veren immunitede zayıflamadan, iki veya daha fazla antijene cevap varsa normal cevaptan bahsedilir (35). Anerjiye sebep olan birçok faktör bulunmaktadır. Kanser, immun hastalıklar, infeksiyon, cerrahi, kemoterapi veya radyoterapi bunlardan birkaçıdır. Böyle pekçok farklı sonuçlara sahip cilt testinin anerjiye yol açan hastalıkların varlığında nutrisyonel değerlendirme amacıyla tek başına kullanılması uygun değildir (36). Çalışmamızda TEN öncesi ve sonrası cilt testleri oranında olumlu yönde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0.02$). TEN öncesi hastaların %62.5 inde anerji, %37.5 inde 5mm den küçük reaksiyon tespit edilirken, protokol sonrasında %37.5 inde anerji, %40.5'inde 5 mmden küçük %22'sinde 5mm den büyük reaksiyon saptanmıştır. Bu duruma göre TEN malnutrisyonlu hastalarda anerjik reaksiyonları düzeltici etkisi mevcuttur. Fakat hastanın immun durumunun değerlendirilmesinde cilt testi tek başına güvenilir değildir ve rutin olarak kullanıla-

mayacağı anlaşılmıştır.

Sonuç olarak: TEN uygulaması hücrel immüniteyi aktive etmekte ve immünite üzerine etkili olmaktadır. Uygulama ve takibinin kolay ve ucuz olması, fizyolojiye uygunluğu intestinal sistemi koruması, komplikasyonların seyrek görülmesi ve mortalitenin düşük olması nedeniyle, kontrendikasyon yoksa her hastaya total enteral nutrisyon desteği uygulanmalıdır. Bu işleme hastanın arzu ettiği gıdalarında ilave edilmesiyle immün sistemi daha belirgin şekilde olumlu yönde etkilenecektir.

KAYNAKLAR

1. Kılıçturgay S: Malnutrisyon ve hastaların beslenme durumlarının değerlendirilmesi. *Enteral Parenteral Beslenme* 1996; 8:6-16.
2. Bozkurt N: Enteral ve parenteral beslenmenin önemi. *Enteral-parenteral Beslenme* 1996; 8:1-5.
3. Ford E.C., Andrassy RJ.: *Enteral Nutrition. Handbook of Surgical Nutrition.* (Ed) Van Way III C.W. Philadelphia, Pennsylvania. J.B. Lippincott Co. 1992. 93-106.
4. Braga M, Vignali A, Cíanotti L, Cestari A, Profili M, Dicarolo V: Immune and nutritional effects of early enteral nutrition after major abdominal operation *Eur J Surg* 1996. 162, 105.
5. Kudsk KA, Wojtyasiak S.L., Minard G: Enteral and parenteral feeding after trauma ; effect on visceral proteins *J PEN* 1992. 16. 18 p.
6. Moore FA, Feliciano DV, Androssy RJ, Mc Ardle AH, Booth FV: Early enteral feeding Compared with parenteral , reduces postoperative septic complications the result of a meta analysis. *Ann Surg* 1992; 216,172.
7. Wagner DR, Elmore MF, Tate JT: Combined parenteral and enteral nutrition in severe trauma. *Nutr Clin Pract* 1992; 7, 113.
8. Chandra RK: Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991; 53,1087-1101.
9. Van Way III CW: Nutrition, Inflammation and the Immune System. *Handbook of surgical Nutrition* (Ed) Van Way III C.W. Philadelphia, Pennsylvania. JB Lippincott Co. 1992 14-29.
10. Mullen JL, Buzby ÇP, Matthews DC: Reduction of operative morbidity and mortality by combined preoperative and postoperative nutritional support. *Ann Surg* 1980 192. 604-613.
11. Einstein C, Van Way III C.W. Nutritional assesment. *Handbook of Surgical Nutrition* (Ed) Van Way III.C.W. Philadelphia, Pennsylvania J.B. Lippincott Co. 1992, 107-118.
12. Detsky JM, Baker JP, O'Rourke K: Perioperative parenteral nutrition. A meta Analysis *Ann Intern Med* 1987. 107,195,203.
13. Gündoğdu H: Hastalıklara özel beslenme desteği. *Enteral beslenme* 1996. 8. 96-102.
14. Mc Cool C, Van Way III C: *Energy expenditure and its measurement. Handbook of surgical Nutrition* (Ed). Philadelphia, Pennsylvania, J.B. Lippincott Co. 1992; 119-131.
15. Gupta S: Malnutrition and lymphocyte subpopulation responses in humans. *Nutrient Modulation of the immune response.* New York Marcel Dekker Inc. 1993. 441-454.
16. Burt ME, Stein TP, Schwade JG Brennan MF: Whole-body protein metabolism in cancer bearing patients. Effect of TPN and associated serum insulin response. *Cancer* 1984. 53: 1246.
17. Daly JM, Massar E, Giacco C: Parenteral nutrition in esophageal cancer patients. *Ann Surg.* 1984; 124: 203.
18. Jevanandam M, Lagospi A, Lowry SF. Horowitz ÇD.: Effect of TPN on whole body protein kinetics in cachectic patients with benign or malignant disease *JPEN* 1988. 12: 229.
19. Muggia-Sullam M, Bower RH, Murphy RF: Postoperative enteral versus parenteral nutritional support in gastrointestinal surgery. *Am J Surg* 1985; 149, 106.
20. Casey J, Flinn WR, Yao JST, Fahey V, Pawlowski J: Correalation of immune and nutritional statuses with wound complications in patients undergoing vascular operations. *Surgery* 1983; 93. 822.
21. Sufgurtekin H, Sufgurtekin U, Serin S, Gönüllü M: Gastrointestinal cerrahi sonrası erken enteral beslenmenin önemi. *Türk Anest Rean Mecmuası* 1997; 25: 361-366.
22. Feldman M: Selected Summaries: The Muth of serum albumin as a measure of nutritional status *gastroenterology* 1990; 99: 1845,
23. The Veterans Affairs Total parenteral Nutrition Cooperative Study Group: Perioperative total parenteral Nutrition Cooperative study Group: Perioperative total parenteral nutrition in sureical patiets. *N Engl J Med* 1991; 325: 525.
24. Cerra FB, Lehmann S, Konstantinides N, Dzik J, Fish J: Improvement in immune function supplemented patients by enteral nutrition supplemented with arginine, RNA and Menhadon oil is independent of nitrogen balance. *Nutrition* 1993; 7, 193.
25. Forse RA, Rompre C, Crosilla P: Reliability of the total lymphocyte Count as a parameter of nutrition *Lan J.Surg* 1985; 28,216.
26. Law DIC, Dudrick SJ, Abdou NI: The effect of dieatry protein depletion on immurocompetence: The Importance of nutritional repletion prior to immurologic induction. *Ann Surg* 1974; 179.168.
27. Steffee WP: Malnutrition in hospitalized patients. *JAMA* 1980; 244,2630.
28. Alverdy JC, Chi HS, Sheldon ÇF: The effect of parenteral nutrition on gut immunity, the importance of enteral stimulation. *Ann Surg* 1985;

- 202,681.
29. Yashida S, Matsui M, Shirozu Y, Fujita H, Yamana H, Shirozu K: Effect of glutamic supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. *Ann Surg* 1998; 127, 485-91.
 30. Kahon BB.: Nutrition and host defence mechanisms. *Surg Clin N Am* 1981;61-557-570.
 31. Chandra RK: Rosette-Forming T Lymphocytes and cell-mediated immunity in malnutrition *Br J Med* 1974; 3: 608.
 32. Kirk SJ, Barbul A: Role of arginine in trauma, sepsis and immunity. *JPEN* 1990;14;2268.
 33. Reynolds JV, Daly JM, Zhang S: Immunomodulatory mechanisms of arginine. *Surgery* 1988; 104.142,
 34. Cogos CA, Kalferantzou FE, Zoumbos NC: Effect of different types of total parenteral nutrition on T. Lymphocyte subpopulations and NK Cells. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 119-122.
 35. Linn BS: Delayed hypersensitivity skin testing in nutritional assessment *Ann Surg* 1987; 53. 628.
 36. Smonowitz DA, Dellinger EP, Oreskovich MR: Stathert JC: Anergy in high risk surgical patients: the role of parenteral nutrition. *West J Med* 1982; 137.181.

YAZIşMA ADRESİ:

Dr.Nihat KAYMAKÇIOĞLU
GATA Genel Cerrahi AD
06018 Etlik, ANKARA