

Tıkanma Sarılığı Oluşturulan Ratlardaki Bakteriyel Translokasyon Üzerinde Alfa-Tokoferol, Askorbik Asit ve Pentoksifilinin Etkileri

THE EFFECTS OF ALFA-TOCOPHEROL, ASCORBIC ACID AND PENTOXIFYLLINE ON BACTERIAL TRANSLOCATION IN COMMON BILE DUCT LIGATED RATS

Dr. Mustafa ALDEMİR¹, Dr. M. Faruk GEYİK², Dr. Şerife AKALIN², Dr. Salih HOŞOĞLU²,
Dr. İbrahim TAÇYILDIZ¹

¹ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalları

² Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalları / Diyarbakır.

ÖZET

Amaç: Bu deneysel çalışma tıkanma sarılığı oluşturulan ratlarda, alfa-tokoferol, askorbik asit ve pentoksifilinin bakteriyel translokasyon üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla planlandı.

Durum Değerlendirmesi: Uzamış safra yolu obstrüksiyonu, karaciğer ve immün sistemde sayısız değişikliklere yol açar. Artmış safra kanal basıncı, safra yollarından kana ve lenfatik sisteme bakterilerin translokasyonuna neden olabilir.

Yöntem: 50 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat, randomize olarak, her biri 10'arlı beş gruba ayrıldı. Tüm ratlar, intramüsküler Ketamine (25 mg/kg) ile uyutuldu. Steril şartlarda batin açıldı, koledok bulundu, proksimal ve distali 5/0 ipekle bağlandıktan sonra kesildi. Grup 1 (Sham operasyon)'de batin açıldıktan sonra koledok ortaya kondu, ancak ligasyon yapılmadı. Grup 2'deki ratlara, sadece koledok ligasyonu uygulandı. Grup 3, 4 ve 5'teki ratlara koledok ligasyonu sonrası, 21 gün süreyle sırasıyla alfa-tokoferol, askorbik asit ve pentoksifilin verildi. Ratlardan, postoperatif 21. günde, bilirubin, ALT, AST, ALP ve GGT için kan örnekleri alındı. Ayrıca kültür için mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak ve kan örnekleri alındıktan sonra, ratlar sakrifiye edildiler.

Çıkarımlar: Grup 1'de hiç bir bakteriyel translokasyon yoktu. Ancak grup 2'de bakteriyel translokasyon oranı %82.5 idi. Bu oran grup 3,4 ve 5'te sırasıyla %25, %30 ve %20 idi. Grup 2'de tüm organ ve dokulardaki bakteriyel translokasyon, grup 1'dekinden önemli derecede yüksek idi ($p<0.001$). Yine grup 2'nin mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak ve kandaki bakteriyel translokasyonları, grup 3, 4 ve 5'inkilerden önemli derecede yüksek idi ($p<0.05$). Tedavi gruplarının bakteriyel translokasyonları arasında, istatistiksel önemli farklılık yoktu ($p>0.05$). Kültürlerden elde edilen en sık patojenler, *Esherichia coli* (%42.9), *Klebsiella* spp. (%23.8) ve *Proteus* spp. (%19) idi. Grup 2'nin mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak ve kan kültürlerinde üreyen bakteri sayıları, grup 3, 4 ve 5'inkilerden önemli derecede yüksek bulundu ($p=0.001$).

Sonuçlar: Bu deneysel çalışma, tıkanma sarılığı esnasında verilen alfa-tokoferol, askorbik asit ve pentoksifilinin, bakteriyel translokasyon insidansını azaltabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Tıkanma sarılığı, bakteriyel translokasyon, alfa-tokoferol, askorbik asit, pentoksifilin.

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of alfa-tocopherol, ascorbic acid and pentoxifylline on the bacterial translocation in an animal model of obstructive jaundice. Prolonged biliary obstruction gives rise to numerous changes in the liver and the host defense system. The increased biliary duct pressure may induce transloca-

tion of bacteria from the biliary tract into bloodstream and lymphatic system. Fifty rats were randomized into 5 groups containing 10 rats each. All rats were initially anaesthetized by intramuscularly injection of Ketamine (25 mg/kg). The abdomen was opened and the common bile duct was identified and divided after ligation using 5-0 silk. Sham operated rats (group 1) had a similar incision followed by mobilization of the common bile duct, without ligation or division. In group 2 rats, only common bile duct ligation was performed. In group 3, 4 and 5 rats common bile duct ligation was performed and alfa-tocopherol, ascorbic acid and pentoxifylline were administered for 21 days. The animals were sacrificed at the end of the 21st day, and serum levels of total bilirubin, ALT, AST, ALP and GGT were measured. Mesenteric lymph nodes, liver, spleen and blood were cultured. The bacterial translocations of rats in groups 1-5 were 0%, 82.5%, 25%, 30% and 20%, respectively. Bacterial translocation significantly increased in the mesenteric lymph nodes, liver, spleen and blood of rats in group 2 compared to group 1 ($p<0.001$). Bacterial translocations of the mesenteric lymph nodes, liver, spleen and blood in group 2 was significantly higher than those of group 3-5 ($p<0.05$). There was no significant difference between treatment groups ($p>0.05$). The predominant pathogens obtained from the mesenteric lymph nodes, liver, spleen and blood were *Esherichia coli* (42.9%), *Klebsiella spp.* (23.8%) and *Proteus spp.* (19%). The bacterial counts, colony-forming units per gram tissue (cfu/g), were found significantly higher in mesenteric lymph nodes, liver, spleen and blood of rats in group 2 than those of group 3, 4 and 5 ($p=0.001$). The present experimental study has demonstrated that, during obstructive jaundice, administration of alfa-tocopherol, ascorbic acid and pentoxifylline reduce the incidence of bacterial translocation.

Keywords: Obstructive jaundice, bacterial translocation, alfa-tocopherol, ascorbic acid and pentoxifylline

GİRİŞ

Bakteriyel translokasyon (BT), canlı yerli bakterilerin gastrointestinal sistemden mezenterik lenf nodları (MLN), karaciğer, dalak, böbrekler, kan ve peritoneal kavite gibi normalde steril olan ekstra-intestinal organ ve dokulara yayılması olarak tanımlanır. Tıkanma sarılığı (TS)'nda, karaciğerin retikuloendotelial sistem fonksiyonlarının bozulması, endotoksinlerin enterohepatik dolaşımına portal dolaşıma ve sistemik dolaşıma geçmesi, safra yollarında basınç artışı ve kolanjiyo-venöz reflü ile bakteriyeminin ortaya çıkması gibi pek çok durum BT'ü arttırabilir. Ayrıca, TS'da safra eksikliği, intestinal motilitenin azalmasına, mukozal atrofiye, antiendotoksik deterjan etkilerinin ortadan kalkmasına ve lümen içi bakterilerin çoğalmasına neden olmaktadır^[1-9].

Bir antioksidan ve hücre membran stabilizatörü olan alfa-tokoferolün (E vitamini) ince barsak tıkanmalarında ortaya çıkan BT'ü engellediği^[10,11] ve deneysel TS oluşturulan ratlarda nötrofillerin fagositik fonksiyonlarını arttırdığı^[12] tespit edilmiştir. Askorbik asit (C vitamini), düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunun zincir reaksiyonunu basıkılamak için kullanılan ilk suda çözünen serbest radikal yakalayıcı ajandır ve E vitamini ve glutatyon gibi diğer serbest radikal yakalayıcılarla sinerjistik etki yaptığı bilinmektedir^[13-15]. Deneysel TS oluşturulan ratlarda, sarılığın barsak anastomozlarının iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği ve

pentoksifilinin bu olumsuz etkiyi ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir^[16]. Bu deneysel çalışmada, TS oluşturulan sıçanlarda, alfa-tokoferol, askorbik asit ve pentoksifilinin BT üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar ve deneysel düzen

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda, etik komite onayı alındıktan sonra yapıldı. Ağırlıkları 250-300 gr olan 50 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan, randomize olarak 10'arlı 5 gruba ayrıldı. Deney süresince, tüm sıçanlar standart hayvan yemi ve su ile beslendiler. Sıçanlar intramüsküler ketamin HCl (Ketalar(r) Eczacıbaşı, İstanbul) (25 mg/kg) ile uyutuldu. TS oluşturmak için, steril şartlarda batın orta hat laparotomiyle açıldı. Koledok bulundu, proksimali ve distali 5/0 ipekle bağlandıktan sonra kesildi.

Grup 1 (Sham operasyon)'de batın açıldıktan sonra koledok ortaya kondu, ancak ligasyon yapılmadı. Grup 2'deki ratlara, sadece koledok ligasyonu (KL) uygulandı. Grup 3'teki ratlara KL sonrası 100 mg/kg/gün dozunda ve intramüsküler yolla E vitamini (Evigen ampul, Aksu Farma, İstanbul) verildi. Grup 4' teki ratlara KL sonrası 25 mg/kg/gün dozunda ve intraperitoneal yolla C vitamini (Redoxon ampul, Roche, İstanbul) verildi. Grup 5'teki ratlara KL sonrası 50 mg/kg/gün dozunda ve intraperitoneal yolla pentoksifilin (Trentilin ampul, San-

Tablo 1. Pozitif kültürlerin gruplara göre dağılımı.

	MLN*	Karaciğer*	Dalak*	Kan*	Tüm organlar*
Grup 1	0/10 (%0) ^a	0/10 (%0) ^a	0/10 (%0) ^a	0/10 (%0) ^a	0/40 (%0)
Grup 2	9/10 (%90)	9/10 (%90)	8/10 (%80)	7/10 (%70)	33/40 (%82.5)
Grup 3	3/10 (%30) ^b	3/10 (%30) ^b	2/10 (%20) ^b	2/10 (%20) ^b	10/40 (%25)
Grup 4	4/10 (%40) ^b	4/10 (%40) ^b	2/10 (%20) ^b	2/10 (%20) ^b	12/40 (%30)
Grup 5	3/10 (%30) ^b	3/10 (%30) ^b	1/10 (%10) ^b	1/10 (%10) ^b	8/40 (%20)
Toplam	19/50 (%38)	19/50 (%38)	13/50 (%26)	12/50 (%24)	63/200 (%31.5)

* Pozitif kültür/yapılan kültür.
^aGrup 1'e karşı grup 2, p<0.001,
^bGrup 3,4,5'e karşı grup 2, p<0.05.

ta Farma, İstanbul) verildi. İlaç tedavilerine 21 gün süreyle devam edildi. Yirmi birinci günde steril şartlarda tekrar laparotomi ve torakotomi yapılarak, total bilirübin (TB), ALT, AST, ALP, GGT için kan örnekleri alındı. Ayrıca kültür için MLN, karaciğer, dalak ve kan örnekleri alındıktan sonra, ratlar sakrifiye edildiler.

Bakteriyel translokasyon

Portal venden kan örneği alınarak aerobik kültür için BacTec™ Peds (Becton Dickinson, Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md. USA)'lere ekim yapıldı. Takiben şişeler BacTec 9240 normodiometric cihazına (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) yerleştirilerek 35°C'de enkübyona tabi tutuldu. Bakteri üremesi cihaz tarafından, 10 gün boyunca takip edildi. Bu süre içinde üreme olmayan kültürler negatif kabul edildi. Üreme tespit edilen şişelerden standart plastik özelerle birer damla örnek alınarak, önceden hazırlanıp steril

edilmiş kanlı ve eozin metilen mavisi agar (EMB) besi yerlerine ekim yapıldı. Etüvde 37°C'de 24-48 saat bekletildi. 48 saatte üreme olmayan kültürler negatif kabul edildi. Üreme olan besi yerlerinden bakteri örnekleri alınarak Gram boyamaları yapıldı. Daha sonra Reader-Recorder Sceptor™ System (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) cihazında okunarak bakteri türü tayin edildi.

MLN, karaciğer sağ lobu ve dalak örnekleri cerrahi yoluyla çıkarıldı. Hassas tartı aletinde tartılarak doku ağırlıkları bulundu ve 2 ml beyin-kalp infüzyonu içeren steril şişelerde homojenize edildiler. Her bir homojenatın 1 ml'si kanlı agar ve EMB besi yerlerine ekildi. Tüm ekimler, 37°C'de 24-48 saat gözlendi elde edilen koloniler belirlendi ve 1 gram dokudaki bakteri sayısı [cfu (colony forming unit)] hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizlerde; gruplar arası ölçümsel

Tablo 2. Gruplarda MLN, karaciğer, dalak ve kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizma türleri.

	Grup 1 (n)	Grup 2 (n)	Grup 3 (n)	Grup 4 (n)	Grup 5 (n)	Toplam n (%)
<i>E.coli</i>	0	12	5	6	4	27 (42.9)
<i>Klebsiella spp.</i>	0	8	3	2	2	15 (23.8)
<i>Proteus spp.</i>	0	7	2	2	1	12 (19)
<i>E.cloaca</i>	0	4	0	1	1	6 (9.5)
<i>Mikst</i>	0	2	0	1	0	3 (4.8)
Toplam	0	33	10	12	8	63 (100)

Tablo 3. Gruplara göre MLN, karaciğer ve dalak kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların hesaplanan CFU sayıları.

Gruplar	CFU (MLN)*	CFU (KC)*	CFU (Dalak)*
Grup 1	0	0	0
Grup 2	1902222±379004	1583333±276947	660000±179523
Grup 3	556666±299388 ^a	400000±469361 ^a	1410000±1315218 ^a
Grup 4	203250±40310 ^a	290000±276526 ^a	1160000±56568
Grup 5	183333±25166 ^a	200000±65574 ^a	100000 ^a

*Aritmetik ortalama ±Standart sapma
^aGrup 3,4,5'e karşı grup 2, p=0.001.

Tablo 4. Grupların biyokimyasal değerleri.

Gruplar	TB (mg/dl)*	ALP (IU/L)*	ALT (IU/L)*	AST (IU/L)*	GGT (IU/L)*
Grup 1	0.5±0.3 ^a	111.4±13 ^a	74.1±13.2 ^a	68.2±11.2 ^a	39.4±5.2 ^a
Grup 2	10.6±1.3	406.7±10.3	384.1±14.2	449.6±31.01	86.2±11.9
Grup 3	10.3±1.4	401.4±8.6	380.4±14.7	441.6±15.2	90±9.3
Grup 4	11.5±3.2	402±14	377.8±19.1	450.5±17.8	85.9±5.2
Grup 5	10.5±0.9	406±11.9	385.1±17.8	454.9±17.5	83.1±5

*Aritmetik ortalama ±Standart sapma,
^aGrup 1'e karşı grup 2-5, p<0.001.

değerlerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve posthoc TUKEY HSD testi uygulandı. Gruplar arası kategorik değişkenlerin karşılaştırmaları nonparametrik tek yönlü varyans analizi (Kruskal-Wallis H testi) ile yapıldı. Bu analiz sonunda anlamlılık bulunduğu, Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama± standart sapma olarak verildi.

SONUÇLAR

Deney süresince hiç bir rat ölmedi. Grup 1'de hiç bir organda üreme olmadı. Ancak grup 2'de BT oranı %82.5 idi. Bu oran grup 3,4 ve 5'te sırasıyla %25, %30 ve %20 idi. Grup 2'nin tüm dokulardaki BT'nu, grup 1'inkinden önemli derecede yüksek idi (p<0.001). MLN'da, grup 2'nin BT'nu grup 3,4 ve 5'e oranla önemli derecede artmıştı (p<0.05). Grup 2'nin karaciğerdeki BT'nu grup 3,4,5'inkinden önemli derecede yüksek idi (p<0.05). Grup 2'nin hem dalak hem de kanda BT'u, grup 3,4 ve

5'inkilerden önemli derecede fazla bulundu (p<0.05). Tedavi gruplarının (grup 3-5) BT'ları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık yoktu (p>0.05) (Tablo 1).

MLN, karaciğer, dalak ve kan kültürlerinden elde edilen en sık patojenler, *Esherichia coli* (%42.9), *Klebsiella spp.* (%23.8) *Proteus spp.* (%19) idi (Tablo 2). Grup 2'nin MLN, karaciğer, dalak ve kan kültürlerinde üreyen bakteri sayıları, grup 3,4 ve 5'inkilerden önemli derecede yüksek bulundu (p=0.001) (Tablo 3). Grup 2,3,4,5'in serum bilirübin, AP, ALT, AST, GGT düzeyleri, grup 1'in düzeylerine kıyasla önemli derecede yüksek bulundu (p<0.0001). Bununla beraber, sarılık oluşturulan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunamadı (p>0.05) (Tablo 4).

TARTIŞMA

Artmış intestinal permeabilite ve BT, hem deneysel safra yolu obstruksiyonu oluşturulan ratlarda hem de sarılıklı insanlarda gösterilmiştir^[9,17]. Sarılıklı ratlarda, villüslerin yüksekliğinin ve total

kalınlığının azalması ile ortaya çıkan ileal mukozal hasarın morfometrik kanıtı gösterilmiştir^[18]. Çakmaçi ve arkadaşları^[19], TS oluşturulan sıçanlarda, MLN, karaciğer ve dalakta ortaya çıkan BT oranlarının, sırasıyla %67, %33 ve %40 olduğunu tespit etmişler. Çiftçi ve arkadaşları^[20], aynı deneysel modelde bu oranları, %73, %60 ve %47 bulmuşlar. Bizim çalışmamızda TS sonucu, MLN (%90), KC (%90), dalak (%80) ve kandaki (%70) BT anlamlı şekilde arttı. BT oranlarımızın yüksek seyretmesi, sarılık süresinin uzun olmasına bağlanabilir.

Hayvan deneylerinde, gastrointestinal sisteme safranın tekrar geri dönüşünün, postoperatif endotoksemi, renal bozukluk ve mortaliteyi azalttığı tespit edilmiştir^[21,22]. İnternal safra drenajının, mononükleer fagosit fonksiyonlarında bir iyileşmeye neden olabileceği düşünülmektedir^[23,24]. Safra yolu bağlanmış sıçanlarda, cerrahi sonrası 3 ile 7. günler arasında MLN'da %33 oranında BT görülmüş ve bu translokasyon oranı ikinci haftanın sonunda %47'ye kadar yükselmiştir. Safra yolu ligasyonu sonrası, çekumdaki *E.coli* ve diğer aerob mikroorganizmaların miktarı kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek bulunmuş, fakat kan ve safra kültürlerinde üreme olmamıştır^[11]. Bizim çalışmamızda, MLN, karaciğer, dalak ve kan kültürlerinden en sık elde edilen patojenler, *Esheria coli* (%42.9), *Klebsiella spp.* (%23.8) *Proteus spp.* (%19) idi. TS grubunda, MLN, karaciğer ve dalak kültürlerinde izole edilen ortalama CFU, ilaç tedavisi verilen diğer gruplardan istatistiksel olarak önemli derecede fazla idi.

Reis ve arkadaşları^[10], barsak tıkanması oluşturdukları deneysel modelde, E vitamini ile mukozal hasarı ve BT'nu azaltıklarını bildirmişlerdir. Alfa-tokoferolün en önemli özelliği, antioksidan olması ve serbest oksijen radikallerini temizlemesidir^[25]. Hücre membranında yerleşerek, serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinde etkili olan E vitamininin retikuloendotelial sistem (RES) fonksiyonlarını, humoral immün cevabı ve T yardımcı hücre aktivitesini arttırdığı bilinmektedir^[26-29]. Çiftçi ve arkadaşları^[20], deneysel TS modelinde, E vitamini ve ursodeoksikolik asidin ayrı ayrı ve beraber verilmesi ile BT'nun azaldığını tespit etmişlerdir. Schimpl ve arkadaşları^[30], tıkanma sarılıklı ve kronik portal hipertansiyon oluşturulan ratlarda, C ve E vitaminlerinin, BT insidansını azalttığını, hepatik ve ileal glutatyon seviyelerini arttırdığını ve ileal mukozal lipid peroksidasyonunu azalttığı-

nı tespit etmişlerdir. C vitamini, düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunun zincir reaksiyonunu baskılamak için kullanılan ilk suda çözünen serbest radikal yakalayıcı ajandır. C vitamini, E vitamini ve glutatyon gibi diğer serbest radikal yakalayıcılarla sinerjistik etki yapabilmektedir^[13-15]. Bizim çalışmamızda, hem alfa-tokoferol hem de askorbik asit, TS'na bağlı oluşan BT'u, TS grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde azaltmıştır. Bu etki, ilaçların TS'da bozulmuş olan immün sistem üzerindeki iyileştirici etkilerine bağlanabilir.

Bir metilksantin türevi olan pentoksifilinin, sepsiste pek çok yararlı etkileri vardır. Pentoksifilinin, intestinal obstrüksiyon ve hemorajik şok oluşturulan sıçanlarda ortaya çıkan BT'u azalttığı tespit edilmiştir^[31,32]. Ayrıca, dokulardaki prostaglandin E2'yi artırma ve transaminazları da azaltma yoluyla, karaciğer reperfüzyon hasarını azaltmaktadır^[33]. Bemelmans ve arkadaşları^[34] TS oluşturulan ratlarda, hem monoklonal anti-TNF antikorları hem de pentoksifilinin, TNF seviyelerini azalttığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, pentoksifilin verilen grubun BT oranı (%20), tedavi verilmeyen sarılık grubunun BT oranından (%82.5) önemli derecede az bulundu. Tedavi grupları arasında, BT açısından fark tespit edilmedi. Pentoksifilinin BT üzerindeki bu yararlı etkisi, TNF gibi pek çok inflamatuvar mediyatör üzerine olan inhibitör etkisinden kaynaklanabilir.

Sonuçta, bu çalışma alfa-tokoferol, askorbik asit ve pentoksifilinin, tıkanma sarılığında ortaya çıkan BT'nu çeşitli düzeylerde önlemede etkili olabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Willen R, Bengmark S: Obstructive jaundice impairs reticuloendothelial function and promotes bacterial translocation in the rat. *J Surg Res* 1994; 57:238-45.
2. Parks RW, Clements WD, Pope C, Halliday MI, Rowlands BJ, Diamond T: Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. *J Anat* 1996; 189: 561-5.
3. Deitch EA: Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990; 30:S184-9.
4. Dixon JM, Armstrong CP, Duffy SW, Davies GC: Factors affecting morbidity and mortality after surgery for obstructive jaundice: a review of 373 patients. *Gut* 1983; 24:845-52.
5. Wait RB, Kahng KU. Renal failure complicating obstructive jaundice: *Am J Surg* 1989; 157:256-63.
6. Bailey ME: Endotoxin, bile salts and renal function in