TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KISA BARSAK SENDROMUNDA KARACİĞERDE ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER VE CD14 EKSPRESYONU (SIÇANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Gülnur GÖLLÜ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç Dr. Aydın Yağmurlu

ANKARA
2008

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KISA BARSAK SENDROMUNDA KARACİĞERDE ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER VE CD14 EKSPRESYONU (SIÇANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Gülnur GÖLLÜ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç Dr. Aydın Yağmurlu

Bu tez, Ankara Üniversitesi Araştırma fonu tarafından
2005.08.09.005-HPD
proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
2008

ÖNSÖZ

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2005.08.09.005-HPD proje numarası ile desteklenmiştir.

Eğitimim boyunca ve bu çalışmanın her aşamasında gösterdiği yardım ve destek için danışmanlarım Prof. Dr. İ Haluk Gökçora ve Doç. Dr. Aydın Yağmurlu'ya, asistanlığım süresince benden emeklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hüseyin Dindar, Prof. Dr. Tanju Aktuğ, Doç. Dr. Meltem Bingöl- Koloğlu ve merhum Prof. Dr. Meral Barlas'a, tez kapsamındaki cerrahi işlemlerin uygulanmasında verdikleri destekler için T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlusu Hüsnü Sakal ve ekibine, plazma ve karaciğer örneklemelerinin alınmasındaki katkı ve yardımları için Ankara Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Mehmet Melli ve Doç. Dr. Hakan Ergün'e, CD14 ekspresyonları ile ilgili çalışmalardaki katkı ve yardımları için Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Aykut Özkul ve Veteriner Hekim Elvin Güngör'e, biyokimyasal çalışmalar için Ankara Üniversitesi Merkez Labaratuvarı'ndan Uz. Dr. Haluk Güriz 'e, tezimin her aşamasında birlikte çalıştığımız Uz. Dr. Mine Fedakar Şenyücel'e, asistanlığım boyunca birlikte çalışma olanağı bulduğum başta Uz. Dr. Rahşan Vargün Yıldız'a, ve asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire ve sağlık personeline, dostlarım Dr. Berktuğ Bahadır, Dr. Esra Temeltaş'a, Dr. Ufuk Ateş'e bugünlere gelmemdeki katkıları ve sağladıkları eğitim için sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gülnur GÖLLÜ

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay i
Önsöz ii
İçindekiler iii
Simgeler ve Kısaltmalar vi
Şekiller Dizini viii
Tablolar Dizini ix
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Kısa Barsak Sendromu 3
2.1.1. Tanım 3
2.1.2. Tarihçe 3
2.1.3. Etyoloji 3
2.1.4. Fizyopatoloji 5
2.1.5. Komplikasyonlar- Karaciğer Yetmezliği 5
2.1.5.1. Kolestaz 6
2.1.5.2. KBS'da TPB ve Karaciğer Yetmezliği 8
2.1.5.3. KBS'da Enterik Staz ve Portal Venöz Endotoksemi 9
2.1.5.4. Endotoksinler ve Karaciğer Hasarlanması 11
2.1.5.5. Karaciğer Hasarlanmasında CD14'ün Rolü 12
3. GEREÇ ve YÖNTEM 14
3.1. Deney Hayvanları ve Çalışma Yeri 14
3.2. Deney Protokolü, Hayvan Modeli 14
3.2.1. Anestezi 15
3.2.2. Cerrahi İşlem 15
3.2.2.1. Kısa Barsak Sendromu Grubu 15
3.2.2.2. Sham Grubu 15
3.2.3. Ameliyat Sonrası Bakım 17
3.2.4. Doku Örneklerinin Alınması 17
3.3. Biyokimyasal Değerlendirme 18
3.3.1 Gama Glutamil Transferaz (GGT) Test Düzeni 18

3.3.2 Alkalen Fosfataz (ALP) Test Düzeni 19
3.3.3 Total Bilirubin Test Düzeni 20
3.3.4 Aspartat Aminotransferaz (AST) Test Düzeni 20
3.3.5 Alanin Aminotransferaz (ALT)Test Düzeni 21
3.4. Histopatolojik ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar 21
3.4.1 Işık Mikroskopik İnceleme 21
3.4.2 Elektron Mikroskopik İnceleme 22
3.5. Karaciğerde CD14 mRNA Ekspresyonları 24
3.5.1. RNA İzolasyonu 24
3.5.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi 25
3.5.3. cDNA Sentezlenmesi ve Amplifikasyonu 26
3.5.4. Semikantitatif RT- PZR 27
3.5.5. RT-PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi 28
3.6. Bulguların analizi 29
4. BULGULAR 30
4.1. Hayvanlar ve Ameliyat Sonrası Durumu 30
4.1.1. Ameliyat Sonrası Ağırlık Değişimleri 30
4.2. Biyokimyasal Değişiklik 31
4.2.1. ALP Ölçümleri 31
4.2.2. Total Bilirubin Ölçümleri 32
4.2.3. AST Ölçümleri 33
4.2.4. ALT Ölçümleri 33
4.2.5. GGT Ölçümleri 34
4.3. Işık Mikroskopisi Değerlendirmeleri 34
4.3.1. İnflamasyon 34
4.3.2. Fibrozis 36
4.3.3. Yağlı Değişiklikler 38
4.3.4. Kolestaz 40
4.4. Elektron Mikroskopisi Değerlendirmeleri 41
4.4.1. Mikrovillus Kanaliküller Boyu 41
4.4.2. Lümende Granüler Biliyer Materyal Varlığı 42
4.4.3. Kanaliküler Lümen Boyutu 44

4.4.4. Perikanaliküler Alan Genişlemesi 45
4.4.5. Mikrofilaman Hiperplazisi 45
4.5. Karaciğerde CD 14 Ekspresyonları 45
5. TARTIŞMA 48
6. SONUÇLAR 51
ÖZET 52
SUMMARY 53
KAYNAKLAR 54
EKLER 60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
˚ C	Derece
Ca^+	Kalsiyum
Cl^-	Klor
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
dL	Desilitre
dNTP	Deoksi-nükleotit tri-fosfat
g	Gram
GGT	Gama glutamil transferaz
HCO_3	Bikarbonat
H&E	Hemotoksilen- Eozin
IL-1	Interlökin 1
IL-6	Interlökin 6
K^+	Potasyum
KBS	Kısa Barsak Sendromu
Kg	Kilogram
LPS	Lipopolisakkarit
m	Metre
M	Molar
Mg	Miligram

mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
Na^+	Sodyum
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PAS	Periodik Asid Schiff
RT-PZR	Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TNF-α	Tümör nekrozis faktör α
TPB	Total Parenteral Besleme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: KBS grubunda uygulanan cerrahi işlemin basamakları

Şekil 2: Deneklerden karaciğer ve plazma örneklerinin alınışı

Şekil 3: Sham grubu ile KBS grubundaki deneklerin ağırlık değişim grafiği

Şekil 4: Deneklerin ALP düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 5: Deneklerin total bilirubin düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 6: Deneklerin AST düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 7: Deneklerin ALT düzeylerinin karşılaştırılması

Şekil 8: Sham grubundaki deneklerde inflamasyon

Şekil 9: KBS grubundaki deneklerde inflamasyon

Şekil 10: Sham grubundaki deneklerde fibrozis

Şekil 11: KBS grubundaki deneklerde fibrozis

Şekil 12: Sham grubunda yağlı değişiklik

Şekil 13: KBS grubunda yağlı değişiklik

Şekil 14: Sham grubunda spesifik patoloji göstermeyen örnek

Şekil 15: KBS grubunda parankimi etkileyen kolestaz

Şekil 16: Elektron mikroskopik olarak mikrovilluslarda artış

Şekil 17: Elektron mikroskopik olarak lümende granüler materyal varlığı

Şekil 18: Elektron mikroskopik olarak kanaliküler lümen boyutunda artış

Şekil 19: KBS grubunda karaciğerde CD14 ekspresyonu

Şekil 20: Sham grubunda karaciğerde CD14 ekspresyonu

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: RNA konsantrasyonuna göre hazırlanan karışımların içeriği

Tablo 2: PZC amplifikasyonunda kullanılan maddeler, miktarları ve PZR programı

Tablo 3: RT-PCR incelemelerinde kullanılan primerler

Tablo 4: Deneklerin inflamasyon açısından karşılaştırılması

Tablo 5: Deneklerin fibrozis açısından karşılaştırılması

Tablo 6: Deneklerin yağlı değişiklik açısından karşılaştırılması

Tablo 7: Deneklerin kolestaz açısından karşılaştırılması

Tablo 8: Deneklerin mikrovillus boyutu açısından karşılaştırılması

Tablo 9: Deneklerin lümende granüler biliyer materyal bulunma açısından karşılaştırılması

Tablo 10: Deneklerin kanaliküler lümen boyutu açısından karşılaştırılması

Tablo 11: Deneklerin perikanaliküler alan genişlemesi açısından karşılaştırılması

Tablo 12: Deneklerin mikrofilaman hiperplazisi açısından karşılaştırılması

Tablo 13: Kısa barsak grubu ile sham grubu arasında CD14 ekspresyonu açısından karşılaştırılması

1. GİRİŞ

Kısa barsak sendromu (KBS) kavramı, masif barsak rezeksiyonu sonrası, kısalan barsak geçiş zamanı, yetersiz sindirim ve emilimi kapsar. Geniş barsak rezeksiyonları, yenidoğanda daha çok; gastroşizis, barsak atrezileri, volvulus ya da nekrotizan enterokolit nedeniyle, daha büyük çocuklarda; Crohn hastalığı, mezenter infarktı, barsak neoplazisi ya da travma sonucu uygulanır (1-4). Kısa barsaklı çocukların kaybedilmesinden malabsorbsiyon ve malnutrisyondan daha fazla karaciğer yetmezliği sorumludur. Masif barsak rezeksiyonları sonrası uzun dönem parenteral beslenme, hastalar için hayat kurtarıcıdır. Araştırmacılar tarafından karaciğer yetmezliğinin temel nedeni TPB (total parenteral besleme) olarak gösterilmiştir (1,5). Ancak hastalara parenteral beslenme uygulanmasına karşın her hastada kolestaz gelişmez. Diğer yandan damar içi beslenmenin süresi ile kolestazın şiddet ve yaygınlığı arasında doğrudan bağlantı da kurulamamıştır (6).

Gastrointestinal sistem, lümen içerisindeki bakteri ve toksinlerin diğer organlara ulaşmasını engelleyen mukozal bir bariyere sahiptir. Barsakta oluşan staz sonucu bu bariyer hasarlanabilir (7). İntestinal motilitenin ve ince barsak mikroflorasındaki normal dengenin bozulması ile bakteriler aşırı çoğalır ve bariyeri yıkarlar. Mezenter lenf nodları, kan, dalak ya da karaciğer gibi organların içerisine bu mikroflora geçer. Ayrıca barsak immunitesi zayıflar, intestinal immunglobulinler (IgA) azalır, hepatotoksik sitokinlerin yapımı artar. Bakteriyel translokasyon ile gelişen sepsis, bakteriyel endotoksinler ve sitokinlerin de karaciğere zararlı etkileri olduğu bilinmektedir (1,8-9). Gram negatif mikroorganizmaların lipopolisakkarid endotoksini, Gram negatif ve pozitif mikroorganizmaların peptidoglikan- polisakkaridi karaciğer Kupffer hücrelerinden IL-1, IL-6, TNF-α salgılanmasına yol açarlar. Bunlar akut ve kronik hepatik inflamasyon ve fibrozisin nedeni olarak suçlanmaktadır. Lipopolisakkaridler (LPS) ve lipopolisakkarid bağlayıcı protein kompleksinin Kupffer hücrelerinde yer alan CD14 reseptörüne

afinitesi oldukça yüksektir. Hepatik inflamasyon ve fibrozisi göstermede CD-14 ekspresyonunun gösterilmesi önemlidir (6,9-12).

Kısa barsak sendromu olan çocuklarda en sık ölüm nedeni karaciğer yetmezliğidir. Hayat kurtarıcı olmakla birlikte uzun süreli TPB uygulamaları bu hastalardaki karaciğer yetmezliği etyolojisinde rol oynamaktadır. Buna rağmen kısa barsağın kendisinin yol açtığı intestinal staz, bakteriyel aşırı çoğalma ve translokasyonun kolestaz gelişimine katkısı çok iyi tanımlanmamıştır. Hepatik hasarlanmada endotoksinlerin mediatör olarak rol oynadığı da çok iyi tanımlanmış bir diğer durumdur. Bu çalışma ile TPB'den bağımsız olarak kısa barsağın kendisine bağlı olarak ultrastrüktürel düzeyde karaciğer hasarlanması gelişip gelişmediğinin gösterilmesi amaçlandı. Karaciğer hasarlanması gelişiyorsa, etkili olan faktörler açısından karaciğer dokusunda LPS uyarısıyla özellikle Kupffer hücrelerinde CD14 ekspreyonunun artıp artmadığının, dolayısıyla indirek olarak kısa barsak sendromuna sekonder gelişen portal venöz endotokseminin karaciğer hasarlanmasına etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Literatür taramalarında kısa barsak sendromu ve karaciğer hasarlanması üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır, ancak bunların hemen hepsi kısa barsak sendromu ve TPB birlikteliği üzerinedir. Bu çalışma TPB'den bağımsız bir kısa barsak sendromu modelinde ultrastrüktürel düzeyde karaciğer hasarlanmasını ve etki mekanizmalarını ortaya koyan ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kısa Barsak Sendromu

2.1.1. Tanım

KBS; masif barsak rezeksiyonu sonrasında, kısalan barsak geçiş zamanı, yetersiz sindirim ve emilimi kapsar (1). Yaşamı devam ettirmek ya da normal büyüme ve gelişme için gereken besin maddelerinin sindirimi ve emilimi için yeterli ince barsağı bulunmayan bebek ve çocuklarda gelişir (2).

2.1.2. Tarihçe

1888'de Senn; ince barsakların üçte birinin marasmus gelişmeden rezeke edilebileceğini belirtmiştir. Daha sonra Flint; ince barsakların %50'sinin önemli metabolik sonuçlar olmaksızın rezeke edilebileceğini göstermiştir. 1950'lerde ileoçekal valv ve bir kısım ileumun korunması ile ince barsakların %70'inin rezeksiyonunun birkaç komplikasyon ile tolere edilebileceği bildirilmiştir. Daha sonraki ilerlemeler, TPB'nin kullanıma girmesi ile birlikte KBS'li hastaların yaşam beklentisinde önemli düzelmeler olmuştur (13).

2.1.3. Etyoloji

Çocuk ve süt çocuklarındaki KBS oluşturan nedenler arasında nekrotizan enterokolit (%35), volvulus (%18), intestinal atreziler (%23), gastroşizis (%14), uzun segment aganlionozis (%7), mekonyum ileusu (%1), travma, Crohn başta olmak üzere inflamatuvar barsak hastalıkları, mezenter infarktı, barsak neoplazisi, idiopatik intestinal psödoobstruksiyon, ayrıca invaziv aort monitörizasyonu, yenidoğan aort trombozu, kardiyak emboliye ikincil gelişen mezenterik damarsal tıkanıklık, kardiyonejik, hipovolemik,

septik şok sırasında gelişen perfüzyon azalması ya da vazokonstrüktif inotrop ajanların kullanımı sayılabilir (1-3,13).

Barsak kaybı

Orta barsak volvulusu

Çoklu ince barsak atrezileri

Mekonyum ileusu

Total kolonik aganglionozis

Omfalosel

Gastroşizis

Nekrotizan enterokolit

Travmatik devaskülarizasyon

Mezenterik venöz ya da arteriyel oklüzyon

İnflamatuvar barsak hastalıkları nedeni ile yapılan rezeksiyonlar

Ehler- Danlos sendromu

Konjenital kısa barsak

Mukozal emilim bozuklukları

Nekrotizan enterokolite bağlı mukoza zedelenmeleri

Rejional enterit

Radyasyon enteriti

Kistik fibrozis

Süt allerjisi

Malrotasyon, yapışıklıklara ve konjenital bantlara bağlı kronik volvulus

Barsak stenozları

İntestinal lenfanjiektazi

Fonksiyonel kısa barsak

Proksimal enterostomi

Kloakal ekstrofi

İntestinal psödoobstruksiyon (14-16)

2.1.4. Fizyopatoloji

Geniş ince barsak rezeksiyonlarının ardından, emilim yüzeyinin azalması, geçiş zamanının kısalması ve karbohidrat, protein, yağ, elektrolit, safra asitleri, pankreas enzimleri ve vitamin emiliminin bozulmasıyla ciddi nutrisyonel ve metabolik sorunlar yaşanır. KBS'da intestinal fonksiyonu etkileyen faktörlerden en önemlisi arta kalan barsak uzunluğudur, ayrıca mide, jejenum ya da kolonun çıkartılması ileal rezeksiyona göre daha iyi tolere edilmektedir. Anne karnındaki olaylara bağlı olması, ileoçekal valvin varlığı, barsak rezeksiyonundan sonraki geçen zaman önemlidir (2, 14-15).

İnce barsaktaki önemli orandaki kayba bağlı barsaktaki anatomik ve fizyolojik değişikliklere intestinal adaptasyon adı verilir. İntestinal adaptasyon; mukozal hiperplazi, villuslarda uzama, kript derinliğinde artma ve barsak dilatasyonunu içeren süreci içerir (14,17). Sonuçta intestinal alan ve absorbsiyon- sindirim kompensatuvar olarak artar. Adaptif değişiklikler rezeksiyondan hemen sonra 24-48 saat içerisinde başlar ve iki yıla kadar devam eder. Damar içerisinden kalori sağlanması yeterli büyüme ve gelişmeyi sağlar fakat adaptif gelişmeyi sağlamaz (2-3,14).

2.1.5. Komplikasyonlar- Karaciğer Yetmezliği

Emilim yüzeyinin kaybı ile besinlerin malabsorbsiyonu, elementlerin ve suyun kaybı ile durdurulamayan ishal, malnutrisyon; gastrik asit hipersekresyonu, fonksiyonel pankreas yetersizliği, hiperoksalüri, biliyer taş oluşumu, kemik hastalıkları (osteopeni, osteomalazi) ve TPB ilişkili sepsis ve karaciğer yetmezliği KBS'de en sık gözlenen karmaşalardır. Yenidoğan dönemindeki ilerleyici karaciğer yetmezliği yüksek morbidite taşır (1,3). Yenidoğanda KBS'e bağlı karaciğer yetmezliği gelişimi %3-19 arasında değişmektedir ve bunların %30- 60'da kolestaz gösterilmiştir (6). Ciddi yağlanma, kolestaz ve sonuçta siroz meydana gelir ve erişkinlere göre çocuklarda daha sık gözlenir (13). Masif barsak rezeksiyonu sonrasında gelişen karaciğer disfonksiyonu hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Bakteriyel aşırı çoğalma, sitokinler, gastrointestinal hormonların azalması, biliyer taşıma mekanizmasının immatüritesi gibi birçok çalışma, birçok faktör öne sürülmüştür (18).

KBS'nun klinik sonuçları

İshal

Steatore

Mide asiditesinde artış

Laktoz intoleransı

Karbonhidrat, yağ, mineral, safra asitleri, su, elektrolit ve vitamin emiliminde bozukluklar

VIP, GIP, CCK ve sekretin gibi gastrointestinal hormonlarının eksikliği

Kolelitiazis

Karaciğer fonksiyonlaronda bozukluk

Barsak lümeninde aşırı bakteriyel çoğalma

Hiperoksalüri ve böbreklerde oksalat taşları (nefrolitiazis)

Enfeksiyöz olmayan kolit

Total parenteral beslemeye ait komplikasyonlar (15)

2.1.5.1. Kolestaz

Safra içerisindeki ana organik madde safra tuzudur. Safra akımının meydana getirilmesinde en başta gelen osmotik güçtür. Safraya kandan biliyer elemanların taşınması; sinuzoidal kandan alınması, hepatosit aracılığıyla hücre içinde taşınması (metabolik değişim ile birlikte ya da olmaksızın) ve enerji bağımlı aktif taşınma ile kanaliküler atılım yolunu içerir. Erişkin bir insanda toplam safra tuzu havuzu 50-60 mmol/kg, bu da 3-4 g kadardır ve büyük bir kısmı safra kesesi içerisinde depolanır. İnsan safra tuzu havuzu günde 6-10 kez döner ve sonuçta günlük 20-40 g safra tuzu salınımı ile sonuçlanır. Yaklaşık 0,5 g safra tuzu fekal yolla atılır. Bu kayıp denovo hepatik safra tuzu sentezi ile kompanse edilir (16, 19-20).

Karaciğer yağlanması (steatozis); hepatomegali ve serum aminotransferaz artışı ile seyreder. Histolojik olarak hepatositlerde yağlı infiltrasyon izlenir (21).

Kolestaz; safra kanal seviyesinde tıkanıklıktan (duktal kolestazis) ya da hepatosit seviyesindeki fonksiyonel bir eksiklikten kaynaklanır (hepatosellüler kolestazis). İnflamasyon kaynaklı kolestazis çeşitli enfeksiyonlar ya da enfeksiyöz olmayan hasarlanmalar sonrasında inflamatuvar sitokin sisteminin aktivasyonu sonucunda oluşur. Bu sitokinler hepatosellüler safra atılımının güçlü inhibitörüdürler. İnflamasyon kaynaklı kolestazis etyolojisinde;

Kolestatik hepatitler;

Viral; akut hepatit A, B, E; kronik hepatit C, fibrokolestatik hepatit B ya da C

İlaç; Klorpromazin, flukloksazilin, amoksisilin- klavulonik asit, eritromisin ve diğer makrolidler ender olarak ketokanazol, ACE inhibitörleri, propafenon, ajmalin, sülfonilüreler, antitiroid ilaçları, non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar, D- penisilamin, altın tuzları, H_2 reseptör blokörleri, simvastatin, tiklopidin

Alkolik hepatit

Karaciğere invazyon yapmış sistemik enfeksiyonlar;

Bakteriyel (Weil hastalığı vb), viral (sitomegalovirüs, herpes simpleks virüs vb), protozoon (toksoplazmozis, malarya vb)

Karaciğer invazyonu olmaksızın ekstrahepatik bakteriyel enfeksiyonlar;

Sepsis kaynaklı kolestaz, toksik şok sendromu, sepsis olmaksızın ekstrahepatik bakteriyel enfeksiyonlar

TPB

İdiopatik paraneoplastik kolestazis;

Renal hücre karsinomu, yumuşak doku sarkomu, malign lenfoma

İdiopatik ameliyat sonrası kolestazis sonucunda gelişebilir (9,20)

Fizik incelemede; sarılık, pruritis, akolik gaita ve koyu renkli idrar şeklinde kendini gösterir. En erken biyokimyasal bulgusu konjuge bilirubinde artıştır. Sonrasında alkalen fosfataz ve aminotransferaz artışı takip eder. γ glutamil taranspeptidaz artışı erken bir marker olarak kullanılabilir. Özellikle erişkinlerde hipoalbuminemi de bunlara eşlik edebilir (9,21-23). Histolojik incelemede portal fibrozis (%100), perisellüler fibrozis (%95), safra kanal proliferasyonu (%90) gözlenir. Kupffer hücrelerinde pigmentasyon (%81) ve portal köprüleşme (%86) göze çarpan özelliklerdir (22). Elektron mikroskopik incelemede; şiş, safra kanalikküllerinin düzensiz dilatasyonu ya da safra kanaliküler membranının yapısal değişimi ve perikanaliküler ektoplazm genişlemesinin eşlik ettiği mikrovillus kaybı, mikrofilamentlerin değişimi gözlenir (24).

2.1.5.2. Kısa Barsak Sendromunda Total Parenteral Besleme ve Karaciğer Yetmezliği

TPB'nin uzun dönem kullanımında ilk sırada KBS gelir (25). TPB bağımlı karaciğer hastalığı; KBS'li çocuklarda uzun dönemde sık rastlanılan komplikasyonlardan biridir. TPB bağımlı karaciğer hastalığı bu olgularda karaciğer/ ince barsak transplantasyonu için primer endikasyondur (3,13,26). TPB ilişkili karaciğer komplikasyonları sıklığı birçok yayında farklı olmakla birlikte %7,4- 84 arasında değişir (1).

TPB bağlı karaciğer hastalığı etyolojisinin nedenleri:

Altta yatan hastalık

Sepsis

İnflamatuvar barsak hastalığı

İntestinal anatomi

Bakteriyel aşırı çoğalma

Kısa barsak sendromu

Enteral beslenmenin olmayışı

Parenteral beslemede eksiklik

Protein, esansiyel yağ asidleri, kolin, taurin, karnitin

Parenteral beslemede toksisite

Glukoz, yağ emülsiyonu, fitosteroller, manganez, aliminyum(27)

İnfantlarda kolestaz (%40-60) ağırlıklı iken yetişkinlerde steatozis (%40-55) genellikle eşlik eder (28-29). KBS'li ve TPB yapılanlarda karaciğer yetmezliğinin nedeni birçok faktöre bağlıdır ve nedeni tam olarak anlaşılamamıştır (7,30). Damar içi besleme solüsyonlarının hepatotoksik oldukları hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (6,31). Herhangi bir nedenle insanda uzun dönem TPB uygulanması sonucunda safra kesesinde distansiyon, çamur, taş ve sarılık gelişir. Biyokimyasal olarak karaciğer enzimleri yükselir ve histolojik olarak karaciğer incelemesinde kolestaz, dejeneratif ve proliferatif değişiklikler gözlenir (1,22,32-33). KBS'de TPB başlandıktan sonra enzim artışı izlenirse; bunun TPB ya da diğer risk faktörlerinin hangisinin etkisi olduğu tam olarak anlaşılamaz (1). Masif barsak rezeksiyona bağlı kolestazda en sık karşılaşılan laboratuvar değişiklikleri arasında serum alkalen fosfataz (ALP) (2- 10 kat), total bilirubin artışı (5- 22 kat), γ glutamil transferaz (GGT) ayrıca serum aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) artışı gözlenir (1,21,23,29,32,34). TPB'nin kesilmesi sonucunda genellikle düzelir, fakat bazen tam oral besleme yeniden başlamasına karşın bulgular devam eder (32). Histopatolojik olarak kanaliküler ve intralobüler kolestaz, periportal inflamasyon, safra kanalı proliferasyonu, psödoasiner oluşumu, portal- portal köprülenme, yağlanma, portal fibrozis ve siroz izlenebilir (1).

2.1.5.3. Kısa Barsak Sendromunda Enterik Staz ve Portal Venöz Endotoksemi

TPB; karaciğer yetmezliği oluşturmada tek neden değildir. TPB yapılan tüm olgularda kolestaz gelişmez ayrıca TPB'nin toplam miktarı ya da maruz kalma süresinin uzunluğu arasında kolestazın ciddiyeti ve prevalansı arasında herhangi bir korelasyon kurulamamıştır (6). TPB dışında enterik

staz, bu olası faktörlerden biridir ve staz ile oluşan bakteriyel translokasyon sonrasında kolestaz, sepsis gelişimi olabilir. Ayrıca geniş ince barsak rezeksiyonu sonrasında dilate olmuş ve motilitesi bozulmuş barsak ile birlikte intestinal yalancı tıkanıklık oluşur. Motilite yavaşladığı zaman mutlak bakteriyel aşırı çoğalma gerçekleşir. Staz nedeniyle intestinal immunite azalır, intestinal immunglobülin A seviyeleri düşer ve hepatotoksik sitokinlerin yapımını artar (1,6-7,9,22,29,35-37). Rezeksiyona ikincil safra asitlerinin enterohepatik dolaşımın ayrılması kalan barsağın zayıf motilitesi ile birleşir. Barsak içeriğinin stazına neden olan, ki üstte yer alan ince barsak parçasındaki anaeroblar ve fakültatif mikroorganizmalar bunun büyük bölümünü oluşturur; aşağıda kalan ince barsak ve kolonda sıkışır. Gram negatif organizmalardan kaynaklanan lipopolisakkarit endotoksini ve Gram negatif, Gram pozitif organizma kaynaklı peptidoglikan polisakkarit endotoksini mukozal hasarlanma, artmış mukozal geçirgenlik, lenfatik ve/ veya mezenterik venöz translokasyonla ile barsaktan karaciğere geçer. Karaciğerde Kupffer hücrelerinden IL-1, ve TNF-α salınımını gerçekleştirerek akut- kronik hepatik inflamasyona ve fibrozise yol açar (6,11,25-26). Ayrıca endotoksinler parankimal karaciğer hücrelerinde Na^+- K^+- adenozin trifosfataz (ATPaz) pompasını inhibe ederek kolestaza neden olabilir (1,24). Hepatosellüler kolestazis ve nekrozis, inflamasyon ve fibrozis reaktif oksijen elemanlarının seviyesini arttırır (26). Küçük miktardaki endotoksin mukozal bariyeri geçerek portal dolaşıma geçer ve Kupffer hücreleri tarafından hızlıca temizlenir. Dolaşımdaki lipopolisakkaridler, lipopolisakkarid bağlayıcı protein ile birleşir. Bu kompleksin Kupffer hücrelerinde yer alan CD14'e afinitesi oldukça yüksektir. CD14; Kupffer hücrelerini içeren makrofaj ve monositler tarafından eksprese edilir. Ayrıca bu kompleks CD14 reseptörlerine bağlanarak sitokinlerin (TNF-α, IL gibi), prostonoidlerin (Prostoglandin D_2 vb) ve diğer eriyebilir medyatörlerin salınımını başlatır. Medyatörlerin salınımı karaciğer hastalığının patogenezinde anahtar basamağı oluşturur; inflamatuvar olayların tetiğini çeker, parankimal hemostazisi değiştirir ve sonuçta karaciğer hasarlanmasına yol açar (9,11-12,17,38-39). KBS kendisi de karaciğer fonksiyonlarını bozar ve otoimmün benzeri hepatite yol açar.

Kesin immunolojik mekanizma açık değildir fakat intestinal rezeksiyon sonrası karaciğerde yer alan lenfositlerin kendi kendine aktivasyonu da (*self-reactive*) olası bir nedendir (30). Barsağın masif rezeksiyonundan sonra hepatik dolaşımın özellikle portal venöz akımın azalması ilerleyici karaciğer yetmezliğine yol açabilir. Ek olarak hepatik sinuzoidal kapillerlerde yerleşen ve hepatik dolaşımın azalması ile aktive olan hepatik stellat hücreleri, KBS'li hastalardaki hepatik fibrozise katkıda bulunduğu ve karaciğer disfonksiyonunun oluşma mekanizmasında anahtar rolü oynadığı gösterilmiştir (18).

2.1.5.4. Endotoksinler ve Karaciğer Hasarlanması

Lipopolisakkaritler gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan glikolipidlerdir ve aşırı inflamatuvar cevap oluşumuna yol açarlar. İnsanlarda, kan dolaşımına verilen nanogram miktardaki LPS, septik şokun tüm fizyolojik bulgularının ortaya çıkması için yeterlidir (40-41). Gram (-) bakterilerin normal kolon florasını oluşturulduğu göz önüne alınınca, LPS'in kan dolaşımına girişini ve temizlenmesini düzenleyici ne kadar etkin savunma mekanizmaları olduğunu tahmin etmek hiç de zor değildir. Karaciğer kan dolaşımından LPS'in temizlenme işleminde en önemli rolü oynar, ancak sadece LPS'in temizlenmesine değil aynı zamanda LPS'e enerjetik bir cevap gelişimine de katkıda bulunur. Gastrointestinal sistem bakterilerinin ve bakteri ürünlerinin sistemik dolaşıma geçmesini önleyen belki de en önemli ve en son bariyer karaciğerdir. Sağlıklı hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda, LPS'in damar içi enjeksiyonundan birkaç dakika sonra dolaşımdan temizlendiği, ve büyük kısmının karaciğerde tutulduğu gözlenmiştir. Karaciğerin LPS'i temizlemedeki önemli rolü özellikle karaciğer yetmezliği olan hastalarda daha belirgindir. Sirozlu hastalarda, endotoksemi genellikle gözlenir ve endotoksemi seviyesi karaciğer yetmezliğinin derecesiyle orantılıdır (41-42).

LPS'i temizleme yeteneğinin yanı sıra karaciğer, LPS uyarısına cevap olarak sitokinlerin ve reaktif oksijen ara ürünlerinin üretilmesi ile cevap verir (43-44). İzole karaciğer perfüzyonu ve karaciğer dilimleme ile yapılan ex vivo

ve in vitro çalışmalarda LPS'e cevap olarak TNF-α ve IL-1'in özellikle Kupffer hücreleri tarafından salgılandığı gösterilmiştir (41).

LPS'in karaciğer hasarlanmasında bir kofaktör olduğu pek çok kanıtla ortaya konmuştur. Karaciğer hasarlanmasının karbon tetraklorür toksisitesi, kolin eksikliği, alkol- indüklenmiş karaciğer hastalığı gibi pek çok hayvan modelinde karaciğer hasarlanmasının non-absorbable antibiyotikler, kolektomi ya da germ- free durumlarla önlenebildiği ortaya konmuştur (41,45). Bunların tam karşıtı olarak, bu modellerde ortama LPS eklenmesinin karaciğer hasarlanmasını artırdığı belirgin olarak ortaya konmuştur (41). Bütün bu çalışmalar endojen LPS'in toksin- indüklü karaciğer hasarlanmasında etkili olduğu rolünü desteklemektedir.

2.1.5.5. Karaciğer Hasarlanmasında CD14'ün Rolü

Dolaşımdaki LPS'ler LPS bağlayıcı protein ile taşınırlar. Sekretuvar sınıf 1 akut faz proteini, LPS bağlayıcı protein, karaciğerde sentezlenip plazmaya sekrete edilir. 60- kDa'luk glikoprotein olan LPS bağlayıcı proteinin LPS ile ekspresyonu artar. Bakterinin duvarına ya da LPS kaplı eritrositlere bağlanarak makrofaja yapışmalarını sağlar. LPS- LPS bağlayıcı protein kompleksinin monosit ve makrofajlar üzerinde yer alan CD14 reseptörüne afinitesi yüksektir. *CD14, 55- kDa 'luk bir myeloid membran glikoproteinidir ve başlıca monosit ve makrofajlardan eksprese olur*. Kompleksin CD-14'e yapışması ile makrofajlar aktive olarak sitokinlerin salgılanması başlar ve karaciğer hasarı oluşturur (38,46-48).

LPS bağlayıcı protein- CD14 yolağı fizyolojik şartlar altında düşük konsantrasyonda LPS varlığında kritik rolü oynar. Gastrointestinal sistemden gelen kanın drene olduğu karaciğer sinuzoidleri içerisinde yer alan Kupffer hücreleri, periferal kan monositlerine göre kronik olarak daha yüksek konsantrasyonda LPS'e maruz kalırlar. Bu nedenle Kupffer hücreleri LPS'e karşı farklı mekanizmalar geliştirmiştir (49-51). Dinlenim durumundaki Kupffer hücreleri CD14'ü bazal düzeyde eksprese ederken, LPS'i de içeren çoklu uyarılarla Kupffer hücrelerindeki CD14 ekspresyonunda yani fonksiyonel

reseptör sayısında artma gözlenir (52-54). LPS'in etkisini başlıca CD14 üzerinden yaptığını; CD14 spesifik monoklonal antikorlar kullanarak, insan CD14 reseptörlerini aşırı eksprese eden transgenik sıçanlar ve CD14 eksik şıçanlar kullanılarak gösterilmiştir (48,55-56). Karaciğerde CD14 ekspresyonunda alkolik ve kolestatik karaciğer hasarlanması gibi pek çok durumda artış gözlenir (56).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Çalışma Yerleri

Çalışmada, ağırlıkları 180-220 g arasında değişen 37 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan (Lemali Deney Hayvanları Üretim Çiftliği, Sincan, Ankara) kullanıldı. Sıçanlar, deneyden 1 hafta önce T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'na getirildiler. Deney gününe kadar denekler, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda oda sıcaklığı 21± 2ºC olan ve 12 saat aydınlık-karanlık (aydınlık period 07:00-19:00) ortamın sağlandığı koşullarda, uygun büyüklükteki kafeslerde, her kafeste tek hayvan olacak şekilde standart sıçan yemi ve şebeke suyu ile beslendiler. Çalışma süresince denekler, Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Temel Prensipleri'ne ve Helsinki Deklarasyonu Tavsiyeleri'ne uygun olarak takip edildiler. Tüm cerrahi uygulamalar, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda sterilite koşullarına uygun şekilde yapıldı. Karaciğer, kan örneklemeleri ve ELISA testinin çalışılması Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik incelemeler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, moleküler genetik çalışmalar Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Çalışmadaki deney hayvanlarının kullanımı için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 04 Temmuz 2005 Tarih ve 75- 1942 karar numaralı ve T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Eğitim, Planlama ve Koordinasyon Kurulu'ndan 21 Eylül 2005 Tarih ve 0158-894 karar numaralı izinler alındı (Ek 1,2).

3.2. Deney Protokolü, Hayvan Modeli

Sıçanlar rastgele olarak kısa barsak sendromu (n=12) ve sham (n=14) olmak üzere iki gruba ayrıldılar.

3.2.1. Anestezi

Cerrahi işlem öncesi tüm denekler, 12 saat süreyle aç bırakıldı. Kas içine verilen 30 mg/Kg ketamin hidroklorür (İnterhas Tıbbi ve Kimyevi Ürünler San. ve Tic. A.Ş.), ve 2 mg/Kg ksilazin (Bayer Türk Kimya San. Ltd. A.Ş.) ile deneklere anestezi uygulandı. Ameliyat öncesi kas içi 50 mg/Kg Seftriakson (Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş.) ile profilaksi yapıldı.

3.2.2. Cerrahi İşlem

Anestezi sonrası karın bölgesi tıraş edildi ve iyot- alkol (Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.) solüsyonu ile temizlendi. Çalışma sahası dışındaki alanlar steril koşullarda örtüldü (Şekil 1a).

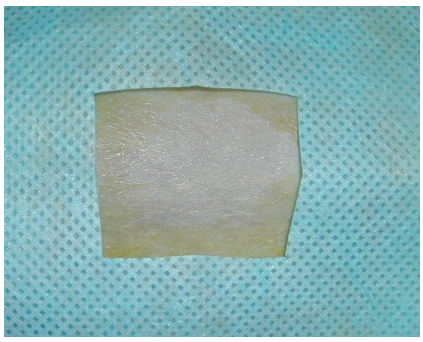
3.2.2.1. Kısa Barsak Sendromu Grubu

Üç santimetrelik karın orta hat kesisi ile girildi (Şekil 1b). Treitz bağının 5 cm distali ile ileoçekal valvin 10 cm proksimali arasındaki ince barsakların mezenterik damarlar, vasküler ark korunarak proksimal ve distalden bağlanarak arası kesildi (Şekil 1c-f). Barsaklar, 5 cm jejenum, 10 cm ileum bırakılacak şekilde hazırlanarak rezeke edildi (Şekil 1g). Böylece ince barsakların %75'i eksize edildi. Jejenum ve ileum, 6/0 poliglaktin (Orhan Boz Tıbbi Malzeme ve San. A.Ş.) ile tek tek uç-uca anastomoz edildi (Şekil 1h). Her denek için standart olması amaçlı toplam 8 dikiş konuldu. Periton, fasya, cilt altı 3/0 ipek (Orhan Boz Tıbbi Malzeme ve San. A.Ş.) ile devamlı, cilt de aynı malzeme ile devamlı olarak ayrı bir katman şeklinde kapatıldı. Karın kapatılmadan önce tüm deneklerin karın içine 5 mL steril, pirojen olmayan %0,9 serum fizyolojik, ameliyat sonrası hidrasyon amaçlı verildi. Şekil 1'de KBS grubunda uygulanan cerrahi işlemin basamakları gösterilmiştir.

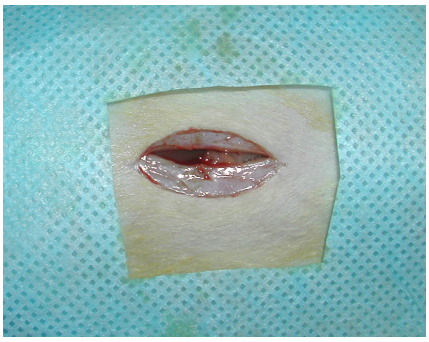
3.2.2.2. Sham Grubu

Üç santimetrelik karın orta hat kesisi ile girildi. İleoçekal valvin 15 cm. proksimalinden ileum transekte edildi ve rezeksiyon yapılmaksızın 6/0 poliglaktin (Orhan Boz Tıbbi Malzeme ve San. A.Ş.) ile uç-uca anastomoz

yapıldı. Her denek için standardizasyonu sağlamak amaçlı toplam 8 dikiş atıldı. Periton, fasya, cilt altı 3/0 ipek (Orhan Boz Tıbbi Malzeme ve San. A.Ş.) ile devamlı, cilt de aynı materyalle devamlı olarak ayrı bir katman olarak kapatıldı. Karın kapatılmadan önce tüm deneklerin karın içine 5 mL steril, pirojen olmayan %0,9 serum fizyolojik ameliyat sonrası hidrasyon amaçlı verildi.



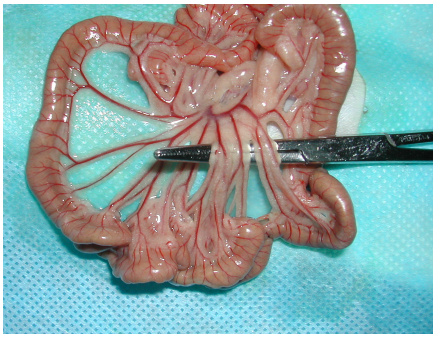
a



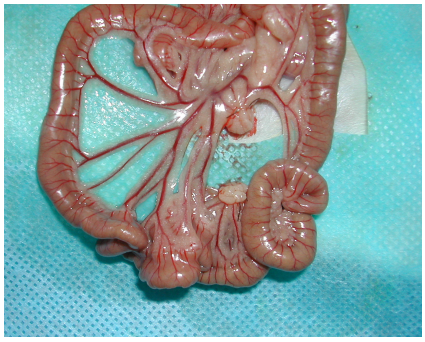
b



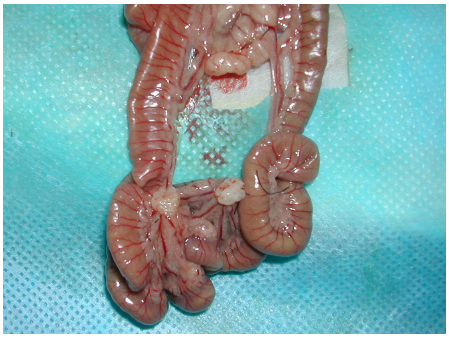
c



d



e



f



g



f

Şekil 1: a) Deneğin karın bölgesi traş edilip steril boyama sonrası örtülü hali, b) 3cm'lik orta hat insizyonu, c) İleoçekal valvden 10 cm proksimal kesim, d) İnce barsakların mezenterik damarları, e- f) Mezenterik damarların, proksimal ve distalden bağlanmış ve ayrılmış hali, g) Anastomoz öncesi ince barsaklar, h) Anastomoz tamamlandıktan sonraki görünüm

3.2.3. Ameliyat Sonrası Bakım

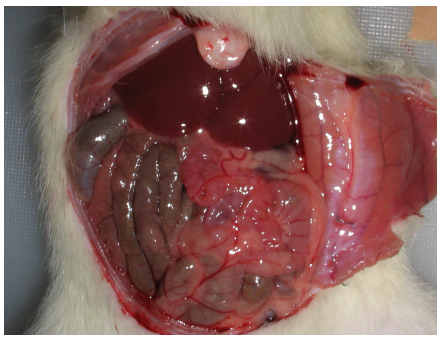
Her iki gruptaki denekler, ameliyat sonrası tek tek kafeslerde tutuldu. Tüm deneklere ameliyattan sonraki ilk 24 saat sadece şebeke suyu, ameliyat sonrası 1. gün 8 g, daha sonra 22 g standart sıçan yemi ve şebeke suyu verilerek eş besleme yapıldı. Ameliyat sonrası dönemde ilk hafta günlük olarak, daha sonra haftalık olarak tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Hastalanan ve ölen denekler çalışma dışında bırakıldı. Ölen deneklere otopsi yapılarak ölüm nedenleri araştırıldı.

3.2.4. Doku Örneklerinin Alınması

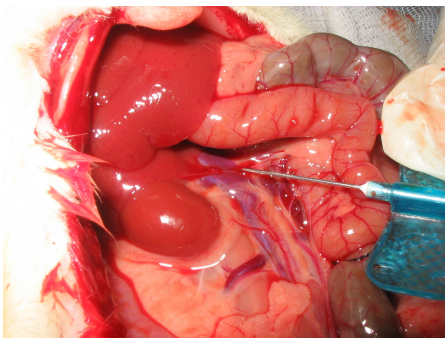
Yedi haftalık takip süresinin ardından denekler, kas içi Ketamin Hidroklorür 30 mg/Kg dozundan uygulandı. Anesteziyi takiben, açıklığı karın sol tarafa bakan C şeklinde geniş bir kesi ile karın açıldı (Şekil 2a).

Rezeksiyon için yeterli adezyolizis sağlandıktan sonra deneklerden; portal venöz kan örneklemesi yapıldı (Şekil 2b). Karaciğerden iki adet 1 cm^3'lük örnek alındı. İlk parça %10 formaldehit solüyonuna histokimyasal inceleme içini tespit edildi. Diğer parça ependorf tüp içine alınarak sıvı nitrojen içinde dondurulduu ve -80ºC'de reseptörlerin mRNA ekspresyonlarını

araştırmak üzere saklandı. 5-6 adet toplu iğne başı büyüklüğündeki örnekler %2'lik gluteraldehit solüsyonuna alınarak elektromikroskopik inceleme için tespit amaçlı konuldu. Kan örneklemelerinden steril tüplere alınarak 10 dakika süre ile dik açılı santrifüjde 1500 RFG'de 10 dakika çevrilerek oluşan plazma, steril şartlarda ependorf tüpe alınarak sıvı nitrojen içinde donduruldu ve -80℃'de biyokimyasal inceleme amaçlı saklandı. Parçaların temininden sonra deneklere intrakardiyak hava verilerek sakrifiye edildi. Deney protokolünün uygulanmasından sonra atıklar, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Yetiştirme Laboratuvarı'na nakledilerek ortadan kaldırılmaları sağlandı.



a



b

Şekil 2: a) Açıklığı karın sol tarafa bakan C şeklinde geniş bir kesi ile karın açıldı , b) Rezeksiyon için yeterli adezyolizis sağlandıktan sonra deneklerden; portal venöz kan örneklemesi yapılması

3.3. Biyokimyasal Değerlendirme

Çalışmaya başlamadan önce plazma örnekleri -80℃'den çıkarılarak oda ısısında çözdürüldü. Örnekler Cobas 6000- 501 otoanalizatöründe (Roche) çalışıldı.

3.3.1 Gama Glutamil Transferaz (GGT) Test Düzeni

Kalorimetrik enzim testi;

γ- glutamiltransferaz, L- γ- glutamil-3- karboksi- 4- nitroanilidin γ- glutamil grubunu glisilglisine transfer eder.

L- γ- glutamil-3- karboksi-4- nitroanilit+ glisilglisin $\xrightarrow{GGT}$ L- γ- glutamil glisilin+ 5- amino- 2- nitrobenzoat

Serbest kalan "5- amino-2 – nitrobenzoat" miktarı numune içindeki GGT aktivitesi ile orantılıdır ve absorbanstaki artış fotometrik olarak ölçülerek tayin edildi.

Reaktifler – çalışma solüsyonları

R1 TRIS: 492 mmol/L, pH 8,25; glisilin: 492 mmol/L; koruyucu madde; katkı maddesi

SR L- γ- glutamil-3- karboksi-4- nitroanilit: 22,5mmol/L; asetat: 10mmol/L ph4,5; stabilizatör; koruyucu madde

3.3.2 Alkalen Fosfataz (ALP) Test Düzeni

Standardize edilmiş bir yönteme göre kalorimetrik test p- nitrofenil fosfat, ortamda magnezyum ve çinko iyonları bulunduğunda, fosfataz aracılığı ile fosfat ayrılarak p- nitrofenole dönüştü.

p- nitrofenil fosfat+ H_2O $\xrightarrow{ALP}$ fosfat+ p- nitrofenol

Açığa çıkan p- nitrofenol katalitik ALP aktivitesi ile doğrudan orantılıdır. Absorbansdaki artış 409 nm'de ölçülerek tayin edildi.

Reaktifler- çalışma solüsyonları

Bileşenler	Konsantrasyonlar		
	R1	R2= SR test	
2- amino- 2- metil-1-propanol	1,724	0,92	mol/L
Magnezyum asetat	3,83	2,0	mmol/L
Çinko sülfat	0,766	0,41	mmol/L
N- (2- hidroksietil)-	3,83	2,0	mmol/L

Etilenamin triasetik asit			
p- nitrofenil fosfat	132,8	16,0	mmol/L
pH (30˚C)	10,44		

Her iki reaktif içinde reaksiyona girmeyen koruyucu madde ve stabilizatör bulunur.

3.3.3 Total Bilirubin Test Düzeni

Diazo metodu;

Total bilirubin güçlü asidik ortamda (pH1-2)diazonium iyonu ile birleşerek uygun çözünebilen bir madde haline getirildi.

Bilirubin + diazonium iyonu $\xrightarrow{\text{asit}}$ azobilirubin

Azobilirubinin renginin duyarlılığı orantılı olarak total bilirubin konsantrasyonunu gösterdi ve fotometrik olarak ölçümü yapıldı.

Reaktifler- çalışma solüsyonları

R1 Sülfamik asit (H_3NO_3S): 110 mmol/L; sodyum asetat buffer ($C_2H_3NaO_2$): 85mmol/L; surfactant çözeltisi

R2 Diazonyum iyonu 3mmol; HCl: 100mmol/L

3.3.4 Aspartat Aminotransferaz (AST) Test Düzeni

AST, L aspartat ve 2- oksaglutaratı oksaloasetat ve L- glutamata çevirir. Oksaloasetat NADH ile reaksiyona girerek malat dehidrogenaz yardımı ile NAD^+ a dönüşür.

L- Aspartat+ 2- oksoglutarat $\xrightarrow{\text{AST}}$ oksaloasetat+ L- glutamat

Oksaloasetat+ NADH+H $\xrightarrow{\text{MDH}}$ L- malat+ NAD^+

NADH'ın oksidasyonu ile katalitik AST aktivasyonu nisbi olarak ölçüldü.

Reaktifler- çalışma solüsyonları

R1 TRIS buffer: 264 mmol/L pH 8,1 (25˚C): L- aspartat: 792 mmol/L

MDH (mikroorganizma): ≥24µkat/L LDH (mikroorganizma): ≥ 48 µkat/L; albumin (bovin): %0,25 koruyucu

R2 NADH: ≥1,7 mmol/L; 2 oksaloglutarat: 94mmol/L; koruyucu

3.3.5 Alanin Aminotransferaz (ALT) Test Düzeni

ALT, L- alanin ve 2 oksaglutaratı pürivat ve L- glutamata çevirir. Pürivat NADH ile reaksiyona girerek laktata dehidrogenazla L- laktat ve NAD^+ a dönüştürür.

L- alanin+ 2 oksaglutarat $\xrightarrow{ALT}$ piruvat+ L- glutamat

Pirüvat+ NADH+ H^+ $\xrightarrow{LDH}$ L- Laktat+NAD^+

NADH oksidasyonu ile katalitik ALT aktivasyonu nisbi olarak ölçüldü.

Reaktifler- çalışma solüsyonları

R1 TRIS buffer:224mmol/L, pH 7,6 (25˚C) L alanin 1120mmol/L ; albumin (bovin): %0,25, LDH (mikroorganizma): ≥45µkat/L, stabilizatör; koruyucu

R2 2 oksagluterat: 94mmol/L ; NADH ≥1,17 mmol/L ; katkı maddesi, koruyucu

3.4. Histopatolojik ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar

3.4.1 Işık Mikroskopik İnceleme

İncelemeler, tek bir patalog tarafından incelenen parçanın hangi gruptaki hayvana ait olduğunu bilinmeden yapıldı. Karaciğer örnekleri %10 formaldehit ile tespit edildikten sonra Hemotoksilen- Eozin (H&E), PAS (Periodik Asid Schiff), Trichcrome Masson boyaları ile boyanarak inflamasyon, fibrozis, yağlı değişiklikler değerlendirildi.

İnflamasyon

0= İnflamasyon yok

1= Bir/ iki safra kanalı ya da epitelyal bölgede inflamasyon

2= Epitelyal hiperplazi ile 3-5 safra kanalında inflamasyon

3= Epitelyal hiperplazi ile 5 ve üzerinde safra kanalında inflamasyon

Fibrozis

0= Fibrozis yok

1= Portal kanallarla sınırlı proliferasyon

2= Artmış fibrozis ile genişlemiş portal kanal

3= Portal bölgeler arasında köprüleşmiş şiddetli fibrozis

Yağlı değişiklikler

0= değişiklik yok

1= %25 yağlı değişiklik

2= %25- 50 yağlı değişiklik

3= %50- 100 yağlı değişiklik

Kolestaz yüzde olarak değerlendirildi.

3.4.2. Elektron Mikroskopik İnceleme

İncelemeler, incelenen parçanın hangi gruptaki hayvana ait olduğunu bilmeyen tek bir patolog tarafından yapıldı. Doku örnekleri alınır alınmaz tespit edilmek üzere %2'lik glutaraldehit solüsyonuna konarak 24-48 saat bekletildi. Tespitten sonra dokular 0.1 M cacodilat tamponu (pH:7.4) ile her 15 dakikada bir değiştirilmek üzere, 3 saat süre ile yıkandı. %2'lik Ozmium tetroksid ile tespit edildikten sonra her biri 10'ar dakika olmak kaydı ile dokular 2 kez cacodilat tamponu ile toplam 20 dakika yıkandı. 30 ve 50

derecelik alkollerden geçirildikten sonra, 70 derece alkol içinde 1 gece buzdolabında bekletildi. Ertesi gün, uranil asetat ile boyama yapıldıktan sonra, dereceli alkoller ve propilen oksitten geçirilen doku örnekleri, bire bir ölçüde karıştırılarak hazırlanan araldit + propilen oksid karşımında 1 gece buzdolabında bekletildi ve bloklama yapıldı. Bloklama işleminden sonra 24 saat süre ile etüvde sertleştirmeye bırakılan bloklardan ertesi gün 1 mikron kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Yarı ince kesitlerden ışık mikroskopik olarak belirlenen alanlar işaretlendi, bloklardan trimleme yapıldı ve ultramikrotomda 300-700 A kalınlığında kesilen ince kesitler, önceden formlarla kaplanmış bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Ultrastrüktürel olarak kolestaz ve karaciğer hasarlanmasının belirtileri kabul edilen mikrovillus boyunda artış, lümende granüler biliyer materyal varlığı, kanaliküler lümen boyutu, perikanaliküler lümen boyutu, ve miroflaman hiperplazisi aşağıda belirtilen skrolama sistemine göre incelendi.

Mikrovillus boyu

0= Normal
1= Minimal artış
2= Orta derecede artış
3= Belirgin artış

Lümende granüler biliyer materyal varlığı

0= Yok
1= Var

Kanaliküler lümen boyutu

0= Normal
1= Minimal genişleme

2= Orta derecede genişleme
3= Belirgin genişleme

Perikanaliküler lümen boyutu

0= Normal
1= Minimal artş
2= Orta derecede artış
3= Belirgin artış

Mikrofilaman hiperplazisi

0= Normal
1= Minimal artış
2= Orta derecede artış
3= Belirgin olarak artış

3.5 Karaciğer Örneklemesinde CD 14 mRNA Ekspresyonları

3.5.1. RNA İzolasyonu

Tüm deneklerden alınan ve -80˚C'de saklanan örneklerden Kısa Barsak sendromu grubunda 11 sham grubunda 13 örnek ile çalışıldı.

Karaciğer örneklerinden total RNA izolasyonu, üretici firma talimatlarına göre, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak yapıldı.

RNA izolasyonu için 30 mg doku ile 300 µL RTL solüsyonu (QIAGEN, Almanya) karıştırılarak 30-45 saniye süre ile homojenizatörde işleme tabi tutuldu. Ardından 590 µL deiyonize su ve 10 µL Proteinaz K (Fermentas, Ontario, Kanada) eklenerek 5-10 saniye vortekste karıştırıldıktan sonra 10 dakika süre ile 55ºC'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 3 dakika süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi. Oluşan karışımdan 900 µL alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 450 µL %96-100'lük etanol (Tekel,

Ankara) eklendi ve lizat pipetasyon ile karıştırıldı. Etanol içeren lizatan 700 µL alınarak 2 mL'lik tüplerdeki RNeasy Mini kolonlarına aktarıldı ve 15 saniye süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi. Oluşan sıvı kısım atıldı. Lizat için en fazla yükleme hacmi 700 µL idi. Yedi yüz mikrolitreyi geçen hacimler için bu basamak tekrarlandı. Yıkama amaçlı RNeasy kolonlarına 350 µL RW1 tampon solüsyonu (QIAGEN, Almanya) eklendi ve 15 saniye süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi. Oluşan sıvı kısım atıldı. Genomik DNA kontaminasyonunu temizlemek amaçlı 15 µL DNase I (Fermentas, Ontario, Kanada) eklendi ve 15 dakika oda ısısında bekletildi. Sürenin sonunda 350 µL RW1 tampon solüsyonu (QIAGEN, Almanya) eklendi ve 15 saniye süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi. RNeasy kolonları yeni 2 mL'lik tüplere aktarıldı. RNeasy kolonları üzerine 500 µL RPE tampon solüsyonu (QIAGEN, Almanya) eklenerek 15 saniye süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi. Oluşan sıvı kısım atıldıktan sonra, tekrar RNeasy kolonları üzerine 500 µL RPE tampon solüsyonu (QIAGEN, Almanya) eklendi ve tampon solüsyonun kolondan geçmesi ve RNeasy silika-jel membranın kuruması için 2 dakika süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi. Ardından tüpler, 1 dakika süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi ve 1,5 mL'lik tüplere aktarılıldı. Ardından 30-50 µL RNase içermeyen su (QIAGEN, Almanya) eklendi ve 1 dakika süre ile 13000 devir/ dakika'da santrifüj edildi. Tüm RNA örnekleri, RNA'nın varlığı ve yoğunluğu, etidyum bromid ile boyandıktan sonra, %1'lik agar jel elektroforezinde iki bant oluşumu görülerek kontrol edildi.

3.5.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

Her bir örnekten 10 µL RNA alınarak, kuartz plaklar içinde 190 µL distile su ile dilüye edildi. 260-280 nm dalga boyundaki absorbsiyonları spektrofotometrik (Spectromax 384 Plus, Moleculer Devices, Amerika Birleşik Devletleri) olarak ölçüldü. Örneklerdeki RNA konsantrasyonu, A_{260}'daki ve A_{280}'daki değerler oranlanarak hesaplandı. Saf RNA için 2 civarındaki değerler kabul edildi. Örneklerdeki RNA miktarı şu formül ile hesaplandı:

$$\text{RNA konsantrasyonu} = 2x\ A_{260} \times 40\ \mu g/\ mL \times \text{Dilüsyon oranı}$$

Dilüsyon oranı tüm deneylerde 20 olarak alındı.

3.5.3. cDNA Sentezlenmesi ve Amplifikasyonu

Spektrometrik inceleme sonucunda hesaplanan RNA konsantrasyonu 1500 ng/mL'nin altında olan örneklerden alınan 10 µL RNA'ya, 1,5 µL Random Heksamer ve 1,5 µL deiyonize su eklenerek Karışım I elde edildi. Karışım I, 70 ˚C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda Karışım I, soğutulan tüplere alındı. 4 µL 5X Reaksiyon Buffer (250 mM Tris-HCL [pH 8.3], 250 mM KCl, 20 mM MgCl2, 50 mM DDT) (Fermentas, Ontario, Kanada), 1,5 µL dNTP (Fermentas, Ontario, Kanada) ve 1,5 µL M-MuLV-RT (Moloney Murine Lösemi Virüsü Revers Transkriptaz (Fermentas, Ontario, Kanada) eklenerek Karışım II elde edildi. Karışım II 25˚C'de 10 dakika, 37˚C'de 1 saat, 70˚C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

RNA konsantrasyonu 1500- 2000 ng/ml arasında olan örneklerden alınan 5 µl RNA'ya, 1 µL Random Heksamer ve 4 µL deiyonize su eklenerek Karışım I elde edildi. Karışım I, 70 ˚C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda Karışım I, soğutulan tüplere alındı. 3 µL 5X Reaksiyon Buffer (250mM Tris-HCL [pH 8.3], 250 mM KCl, 20 mM MgCl2, 50 mM DDT) (Fermentas, Ontario, Kanada), 1 µL dNTP (Fermentas, Ontario, Kanada) ve 1 µL M-MuLV-RT (Moloney Murine Lösemi Virüsü Revers Transkriptaz (Fermentas, Ontario, Kanada) eklenerek Karışım II elde edildi. Karışım II 25˚C'de 10 dakika, 37˚C'de 1 saat, 70˚C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

RNA konsantrasyonu 2000 ng/ml'nin üzerinde olan örneklerden alınan 3 µL RNA'ya, 0,5 µL Random Heksamer ve 3 µL deiyonize su eklenerek Karışım I elde edildi. Karışım I, 70˚C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda Karışım I, soğutulan tüplere alındı. 2 µL 5X Reaksiyon Buffer (250 mM Tris-HCL [pH 8.3], 250 mM KCl, 20 mM MgCl2, 50 mM DDT) (Fermentas, Ontario, Kanada), 1 µL dNTP (Fermentas, Ontario, Kanada) ve 0,5 µL M-MuLV-RT (Moloney Murine Lösemi Virüsü Revers Transkriptaz

(Fermentas, Ontario, Kanada) eklenerek Karışım II elde edildi. Karışım II 25˚C'de 10 dakika, 37˚C'de 1 saat, 70˚C'de 5 dakika süreyle inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA konsantrasyonuna göre hazırlanan karışımların içeriği Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: RNA konsantrasyonuna göre hazırlanan karışımların içeriği

RNA Konsantrasyonu	**Karışım I**	**Karışım II**
< 1500 ng/ml	10 µl RNA	4 µl 5X Reaksiyon Buffer
	1,5 µl Random Heksamer	1,5 µl dNTP Karışımı
	1,5 µl Deiyonize Su	1,5 µl M-MuLV-RT
1500-2000 ng/ml	5 µl RNA	3 µl 5X Reaksiyon Buffer
	1 µl Random Heksamer	1 µl dNTP Karışımı
	4 µl Deiyonize Su	1 µl M-MuLV-RT
> 2000 ng/ml	3 µl RNA	2 µl 5X Reaksiyon Buffer
	0,5 µl Random Heksamer	1 µl dNTP Karışımı
	3 µl Deiyonize Su	0,5 µl M-MuLV-RT

3.5.4. Semikantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen DNA'nın amplifikasyonu için her bir örnekten 3 µL cDNA alındı. cDNA'ya 0.25 µL Taq polimeraz enzimi, 3 µL 10X Taq Buffer, 2,4 µL $MgCl_2$, 0.5 µL dNTP, 0,5 µL Sense Primer, 0,5 µL Antisense Primer ve 19,85 µL deiyonize su eklendi. Başlangıç denatürasyonu için bir defa 70˚C'de 5 dakika inkübe edildi. RT-PZR için amplifikasyon programı, 34 döngü olacak

şekilde programlandı. Her döngü 95˚C'de 4 dakika (denatürasyon), 58˚C'de 45 saniye (Annealing) ve 72˚C'de 1 dakika (Uzama) olacak şekilde gerçekleştirildi. Elli sekiz derecede 1 dakika ve 72˚C'de 10 dakika inkübasyon ile son uzama basamağı gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda kullanılan maddeler, miktarları ve PZR programı Tablo 2'de verilmiştir. CD14 ekspresyonları için RT- PZR incelemeleri, spesifik oligonükleotid primerler kullanılarak yapıldı (Tablo 3).

Tablo 2: PZR amplifikasyonunda kullanılan maddeler, miktarları ve PZR programı

RT-PZR İçeriği	**Miktar**	**PZR Amplifikasyon Programı**
cDNA	3 µl	
Taq Polimeraz Enzimi	0.25 µl	Başlangıç Denatürasyonu 70 ˚C'de 5 dakika
10X Taq Buffer	3 µl	
$MgCl_2$	2,4 µl	Denatürasyon 95 ˚C'de 4 dakika
dNTP	0.5 µl	Annealing 58 ˚C'de 45 saniye
Sense Primer	0,5 µl	Uzama 72 ˚C'de 1 dakika
Antisense Primer	0,5 µl	Son Uzama 58˚C'de 1 dakika
Deiyonize su	19,85 µl	72 ˚C'de 10 dakika

Tablo 3: RT-PZR incelemelerinde kullanılan primerler

Reseptör Tipi	Sense Primer (5'- 3')	Anti-Sense Primer (5'- 3')
CD14 Reseptörü	TGG AGC ACG TAC CTA AAG GG	GAG CTG TGG CTA TGA CTA CGC

3.5.5. RT-PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi

RT-PZR amplifikasyonu ile elde edilen bantlar %1'lik polyakrilamid dikey jel elektroforezde yürütüldü. Elektroforez bufferı olarak TBE (Tris 225 mM, Borik asit 225 mM, Sodium ETDA 5 mM, pH 8.3, 10x) kullanıldı ve

elektroforez işlemi 90 V'da bir saat elektrik akımı verilerek yapıldı. Jel, ethidium bromid ile 10 dakika boyandı ve ultraviyole ışığında bant görüntülenmesi yapıldı. Elde edilen bantlar kontrol amaçlı kullanılan DNA merdiveni (Fermentas, Ontario, Kanada) ile image analiz cihazında (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak, Amerika Birleşik Devletleri) taranarak, yüzey alanlarının birbirine oranı belirlendi ve elde edilen rakamsal değerler kaydedildi.

3.6. Bulguların Analizi

Elde edilen verilerin ortalamaları ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. Ağırlık değişimleri ve ölçümle elde edilen biyokimyasal incelemeler ve RT- PZR çalışması 1- way ANOVA ve Student's t test ile, ışık mikroskopi ve elektron mikroskopik incelemede elde edilen veriler ki kare testi ile karşılaştırıldı (Microsoft Excel, Analyse-it 2.09). $p<0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hayvanlar ve Ameliyat Sonrası Durumu

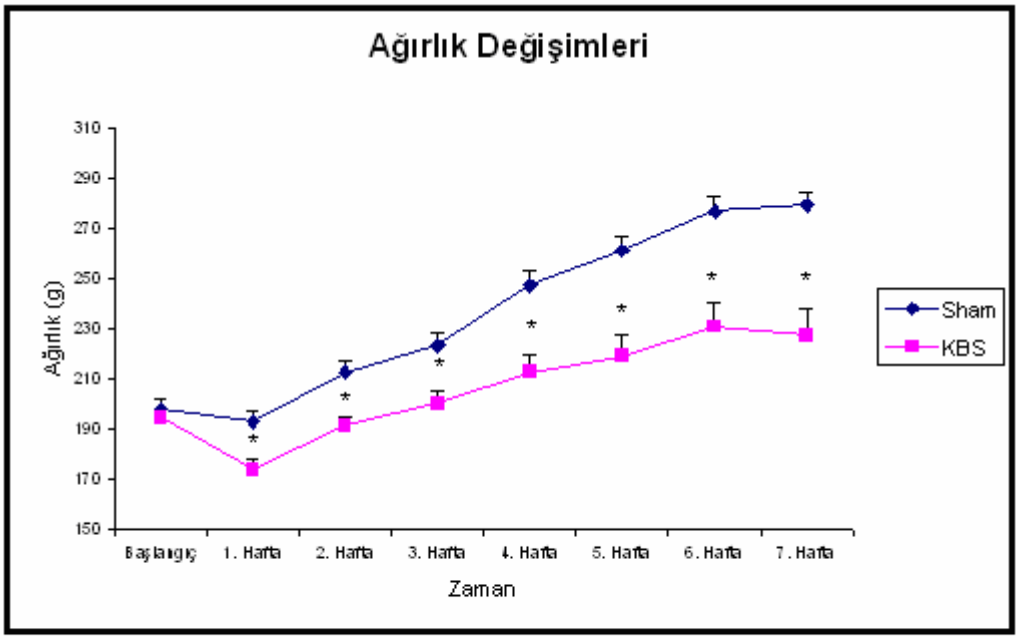
Toplam 37 denek kullanıldı, 21'inde KBS oluşturuldu. Deneyi sonuna kadar 13'ü tamamladı. KBS grubundaki ölen deneklerde (%38) yapılan otopsilerde, 8 denekten 4'ünde (%19) ölüm nedeni intestinal kaçak ve takip eden karın içi abse gelişimi, 2'sinde (%9,5) kanama ve 2'sinde (%9,5) intestinal iskemi gelişimi olarak saptandı. Sham grubundaki 16 denekten 15'i deneyi tamamladı. Sham grubundaki ameliyat sonrası erken dönemde ölen bir deneğin otopsisinde kanama saptandı ve ölüm nedeni olarak düşünüldü. KBS ve sham gruplarında birer denek, parça alımının gecikmesi nedeniyle çalışma dışına alındı.

Hem sham grubunda hem de kısa barsak oluşturulan gruptaki deneklerde barsak ansları arasında minimal yapışıklıklar gözlendi, tüm deneklerin karaciğer görünümlerinde makroskobik özellik izlenmedi. Kesi yeri enfeksiyonu gibi karmaşalara rastlanmadı.

Çalışmaya dahil edilen tüm deneklerde anastomoz bölgesi normal olarak izlendi.

4.1.1. Ameliyat Sonrası Ağırlık Değişimleri

Oluşturulan kısa barsak sendromu, TPB ihtiyacı olmadan kısa barsak sorunlarını simüle eden bir model olarak tasarlandı. Grafikte görülen ağırlık değişimleri incelendiğinde, KBS grubundaki deneklerin, sham grubuna göre birinci haftadan itibaren istatistiksel olarak anlamlı ağırlık kaybı yaşadıkları, zaman içinde ağırlık kazancı olsa bile hiçbir zaman sham grubundakileri yakalayamadıkları görüldü (*$p<0.05$) (Şekil 3).



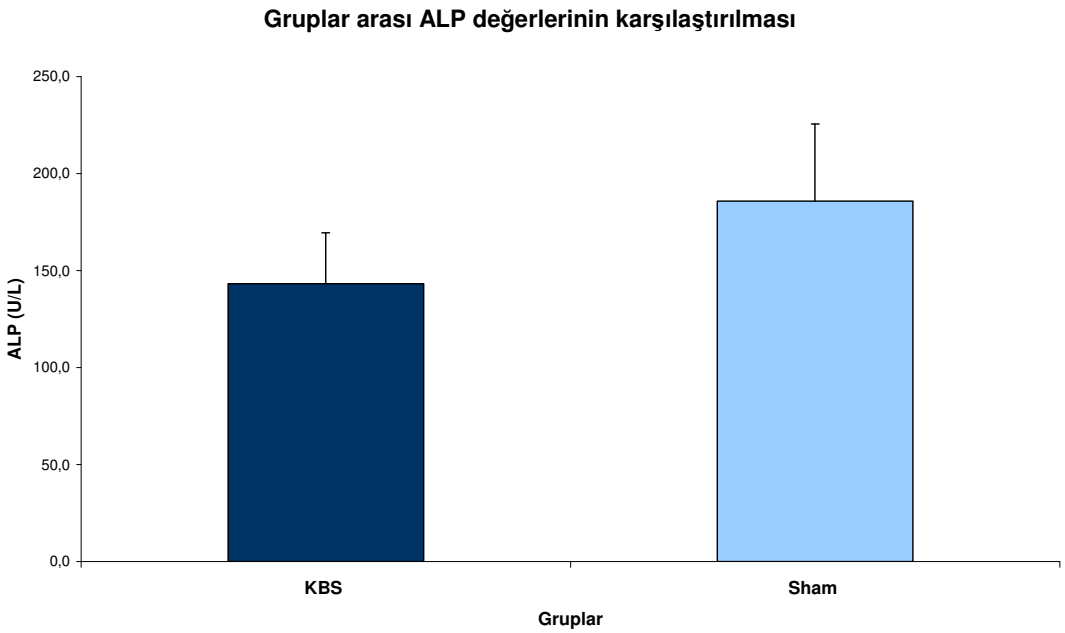
Şekil 3: Sham grubu ile KBS grubundaki deneklerin ağırlık değişim grafiği (* p<0.05)

4.2. Biyokimyasal Değişiklikler

Plazma örnekleri -80℃'den çıkarılarak oda ısısında çözdürüldükten sonra yapılan değerlendirmelerde KBS ve sham grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

4.2.1. Alkalen Fosfataz (ALP) Ölçümleri

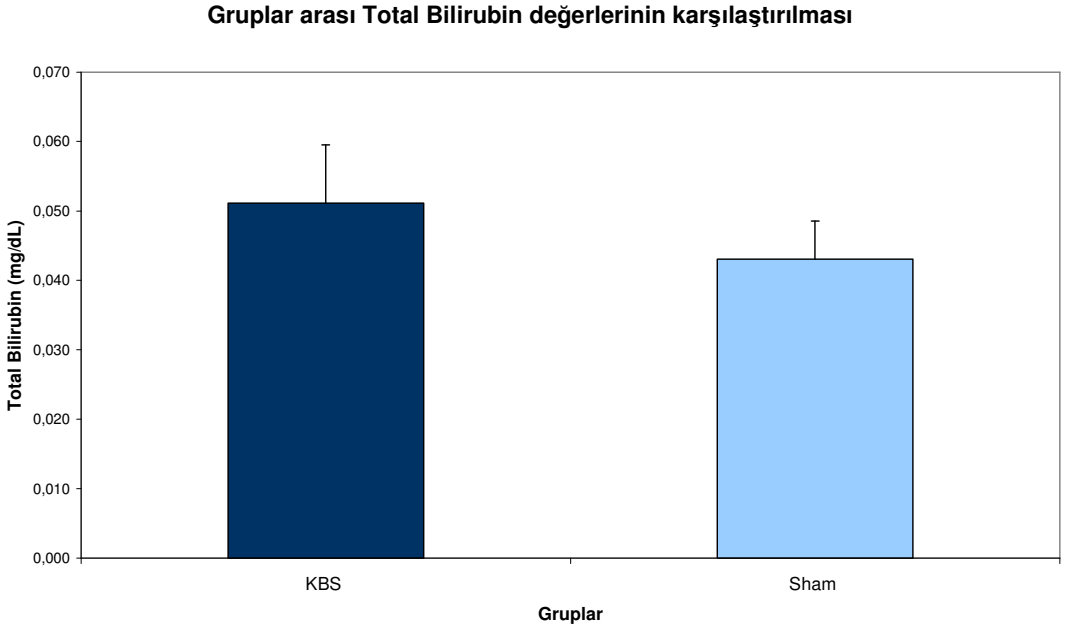
Kısa barsak sendromu ve sham grubundaki sıçanlardan alınan plazma örneklerinde ALP, KBS 143,1± 26 U/L, sham 185± 39,81 U/L olarak değerlendirildi. ALP değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p= 0,49).



Şekil 4: Kısa barsak grubundaki deneklerin ALP düzeylerinde, sham grubundaki sıçanlara oranla farklı bulunmadı (p>0.05)

4.2.2. Total Bilirubin Ölçümleri

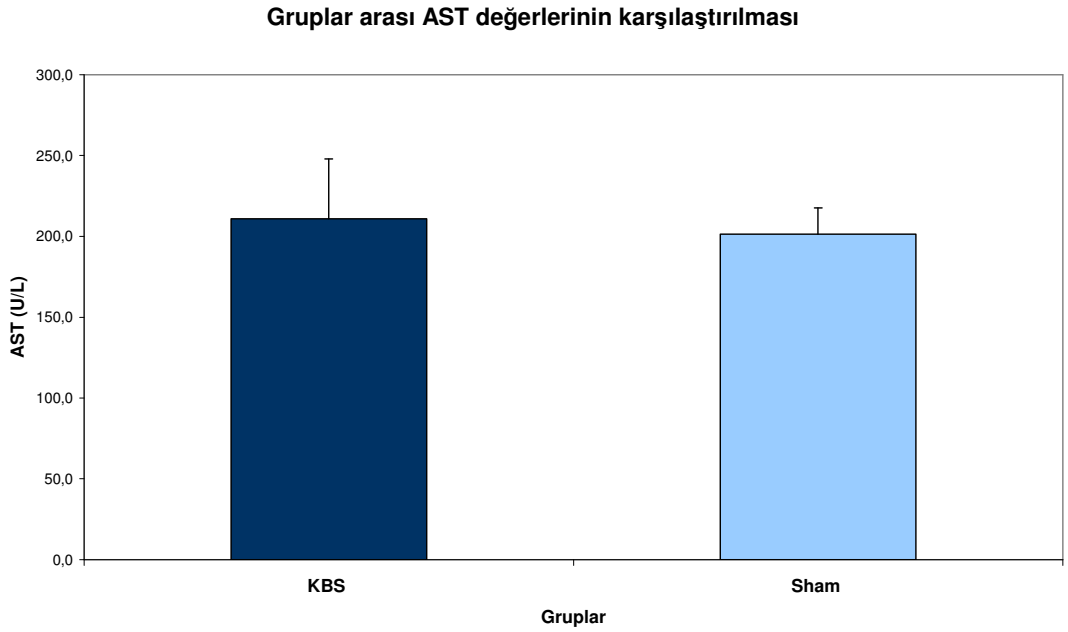
Deneklerden alınan plazmalara göre KBS 0,051± 0,008 mg/dL , sham 0,043± 0,005 mg/dL olarak saptandı. Total bilirubin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (p=0,41).



Şekil 5: Kısa barsak grubundaki deneklerin total bilirubin düzeylerinde, sham grubundaki sıçanlara oranla farklı bulunmadı (p>0.05)

4.2.3. Aspartat Aminotransferaz (AST) Ölçümleri

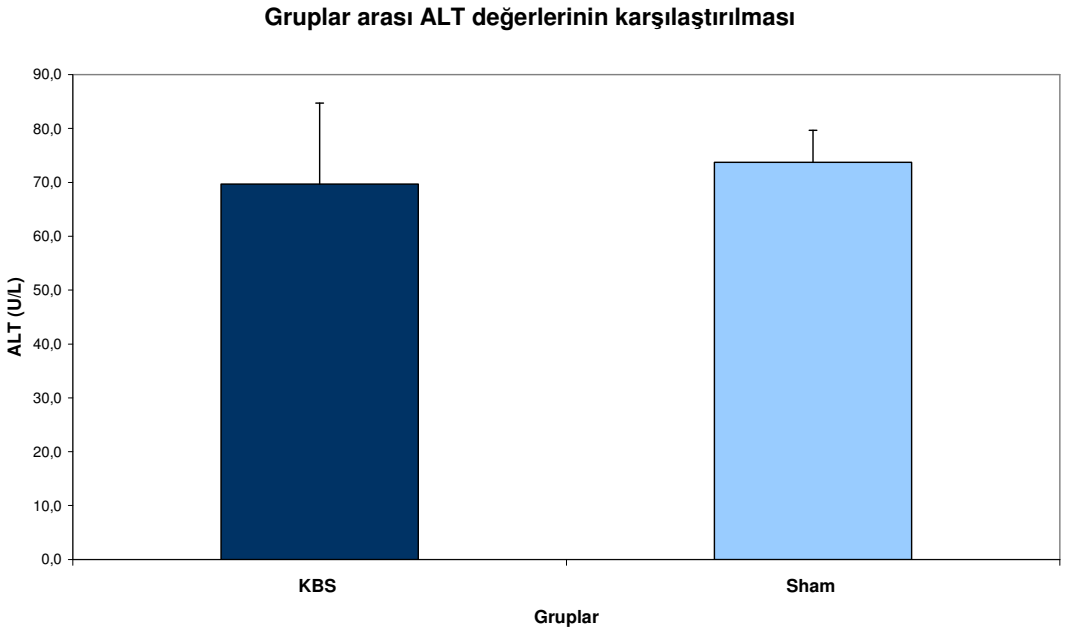
Kısa barsak sendromu olan sıçanlar ve sham grubundaki sıçanlardan alınan plazma örneklerinde çalışılan AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,80). KBS 210,9± 36,99 U/L,sham 201,2± 16,46 U/Lolarak değerlendirildi.



Şekil 6: Kısa barsak grubundaki deneklerin AST düzeylerinde, sham grubundaki sıçanlara oranla farklı bulunmadı (p>0.05)

4.2.4. Alanin Aminotransferaz (ALT) Ölçümleri

ALT ölçümleri değerlendirildiğinde KBS grubu 69,7±15U/L, sham grubu 73,7± 5,98U/L bulunarak aralarında anlamlı farklılık saptanmadı (p= 0,79).



Şekil 7: Kısa barsak grubundaki deneklerin ALT düzeylerinde, sham grubundaki sıçanlara oranla farklı bulunmadı (p>0.05)

4.2.5. GGT Ölçümleri

GGT verileri, otoanalizatörün hata komutu vermesi nedeni ile değerlendirmeye alınmadı. Başka bir merkezde çalışılmak üzere – 80℃' de plazma örnekleri saklandı.

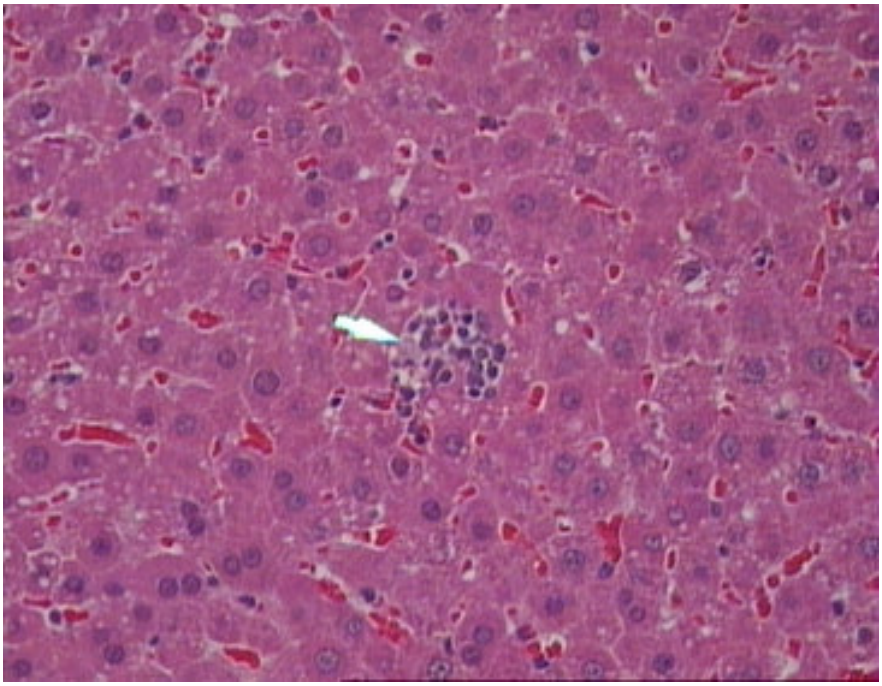
4.3. Işık Mikroskopisi Değerlendirmeleri

4.3.1. İnflamasyon

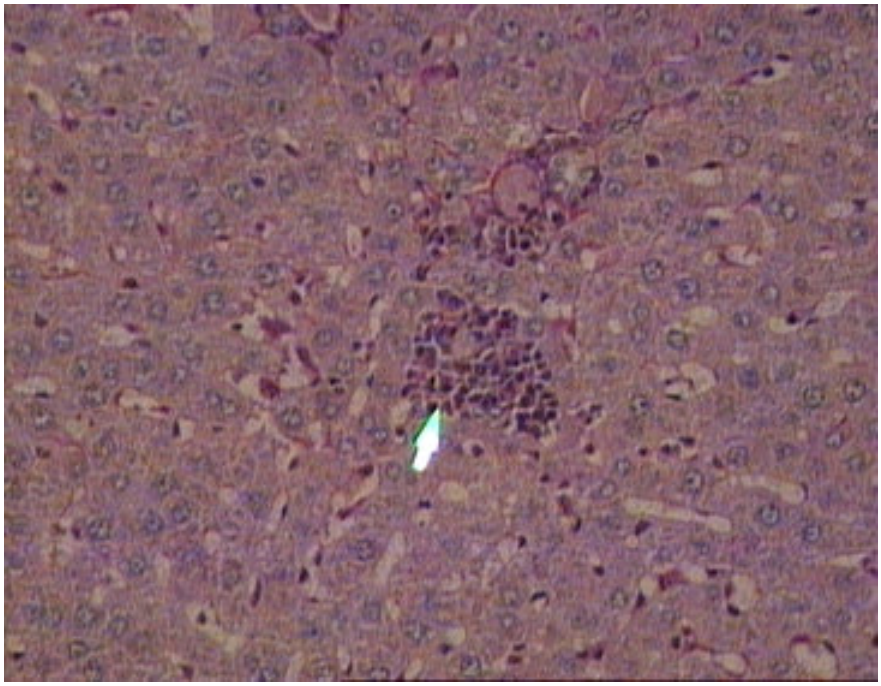
Kısa barsak sendromu grubundaki deneklerin 7'sinde (Şekil 9), sham grubundakilerin 4'ünde (Şekil 8) karaciğerde hafif ve orta derecede inflamasyon saptandı. Bunlardan KBS grubundakilerin 3'ünde, sham grubundakilerin 1'inde 3-5 safra kanalında inflamasyon izlendi. Hiçbir denekte beş ve üzerindeki safra kanalında (ağır inflamasyon kriteri) inflamasyon saptanmadı (Tablo 4). Sonuç olarak KBS grubunda sham grubuna oranla inflamasyonda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p= 0,43).

Tablo 4: Kısa barsak grubundaki deneklerde inflamasyon açısından sham grubundaki sıçanlara oranla fark bulunmadı (p>0.05). (0= İnflamasyon yok, 1= epitelyal bölgede inflmasyon, 2=3-5 safra kanalında inflamasyon)

	Grup		
İnflamasyon	KBS	Sham	Toplam
0	5 (6,7)	10 (8,3)	15
1	4 (3,1)	3 (3,9)	7
2	3 (2,2)	1 (2,8)	4
Toplam	12	14	27



Şekil 8: Sham grubundaki bir denekte okla işaretli bölgede lokalize hafif derecede inflamasyon gözleniyor H&E X200



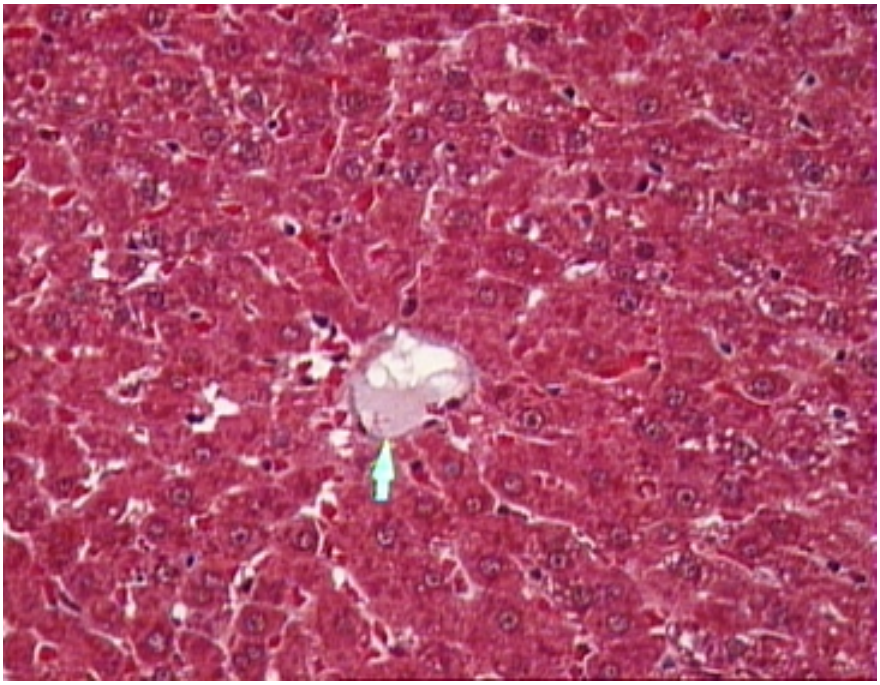
Şekil 9: Kısa Barsak Sendromu grubundaki bir denekte belirgin inflamasyon gözleniyor(ok), H&E X200

4.3.2. Fibrozis

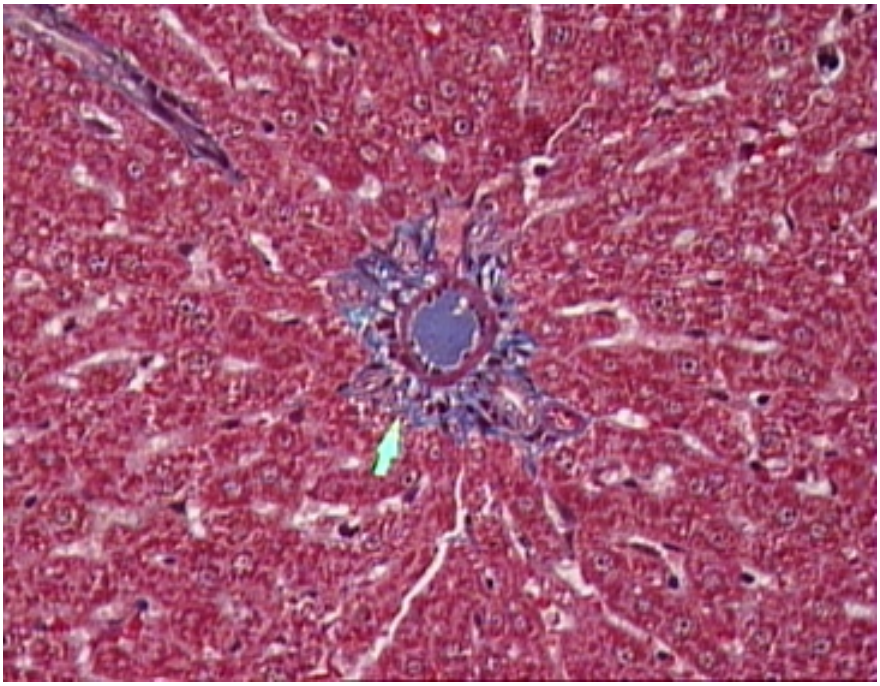
Kısa barsak sendromlu deneklerin 7'sinde (Şekil11), sham grubundakilerin 13'ünde (Şekil10) fibrozis izlenmezken, KBS grubundakilerin 5'inde, sham grubundakilerin 1'inde fibrozis saptandı. Hiçbir olguda portal bölgeler arasında köprüleşmiş şiddetli fibrozis izlenmedi (Tablo 5). KBS grubunda Sham grubuna oranla daha fazla fizbrozis gözlendi. Her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara çok yakın bir değerdeydi (p=0,082).

Tablo 5: Kısa barsak grubundaki deneklerde fibrozis sham grubundaki sıçanlara oranla daha fazlaydı. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak neredeyse anlamlı boyutuna yakın olarak saptandı (p= 0.08). (0= fibrozis yok, 1= portal kanallarla sınırlı proliferasyon, 2= artmış fibrozis ile genişlemiş portal kanal)

Fibrozis	Grup KBS	Sham	Toplam
0	7 (9,2)	13 (10,8)	20
1	3 (1,4)	0 (1,6)	3
2	2 (1,4)	1 (1,6)	3
Toplam	12	14	26



Şekil 10: Sham grubundaki bir denek; periportal alanda fibrozis gözlenmiyor (PAS X200)



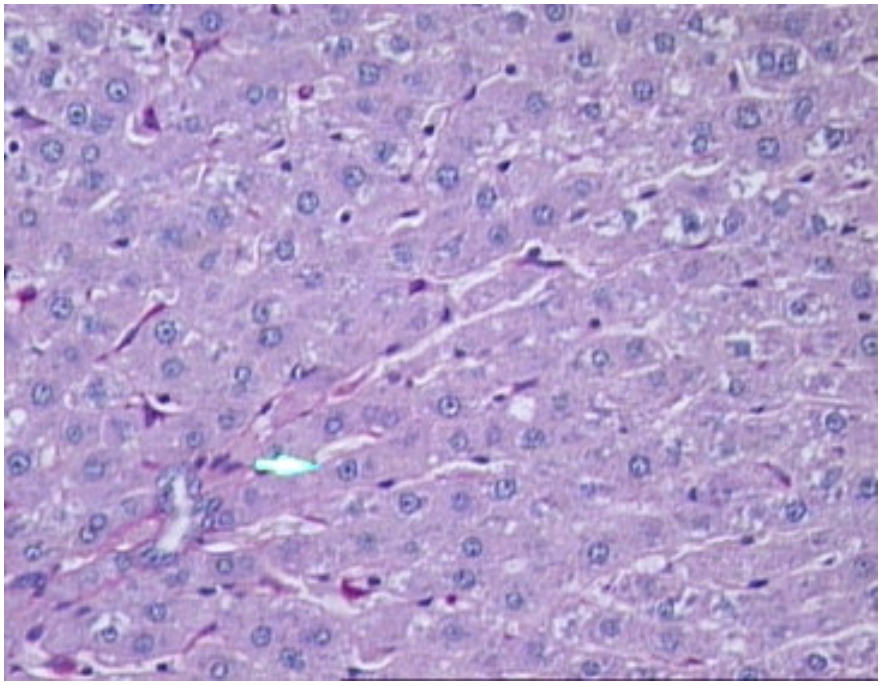
Şekil 11: Kısa barsak grubundaki bir denekte periportal alanda belirgin fibrozis (ok) gözleniyor (PAS X 200)

4.3.3. Yağlı Değişiklikler

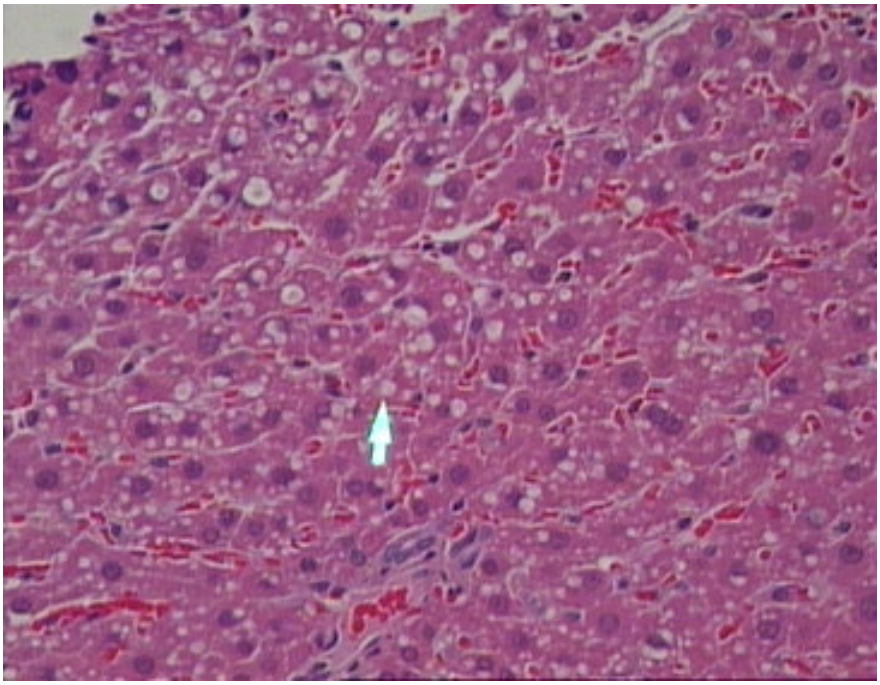
Kısa barsak sendromu grubundaki deneklerin 7'sinde, kontrol grubundakilerin 9'unda yağlı değişiklik saptanmazken, KBS'li ve sham grubundakilerin 5'inde yağlanma izlendi (Şekil12-13). Hiçbir denekte %50'nin üzerinde steatoz görülmedi (Tablo 6). KBS grubunda sham grubuna oranla yağlanmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p= 0,54) (Şekil 10).

Tablo 6: Kısa barsak grubundaki deneklerde yağlı değişiklikler açısından sham grubundaki sıçanlara oranla fark bulunmadı (p>0.05). (0= değişiklik yok, 1= %25 yağlı değişiklik, 2= %25-50 yağlı değişiklik)

	Grup		
Yağlanma	KBS	Sham	Toplam
0	7 (7,4)	9 (8,6)	16
1	4 (4,2)	5 (4,8)	9
2	1 (0,5)	0 (0,5)	1
Toplam	12	14	26



Şekil 12: Sham grubundak, bir denekte Trichrome Mason boyaması ile bile belirgin olmayan çok hafif derecede yağlı değişiklikler izleniyor (Trichrome Mason X200)



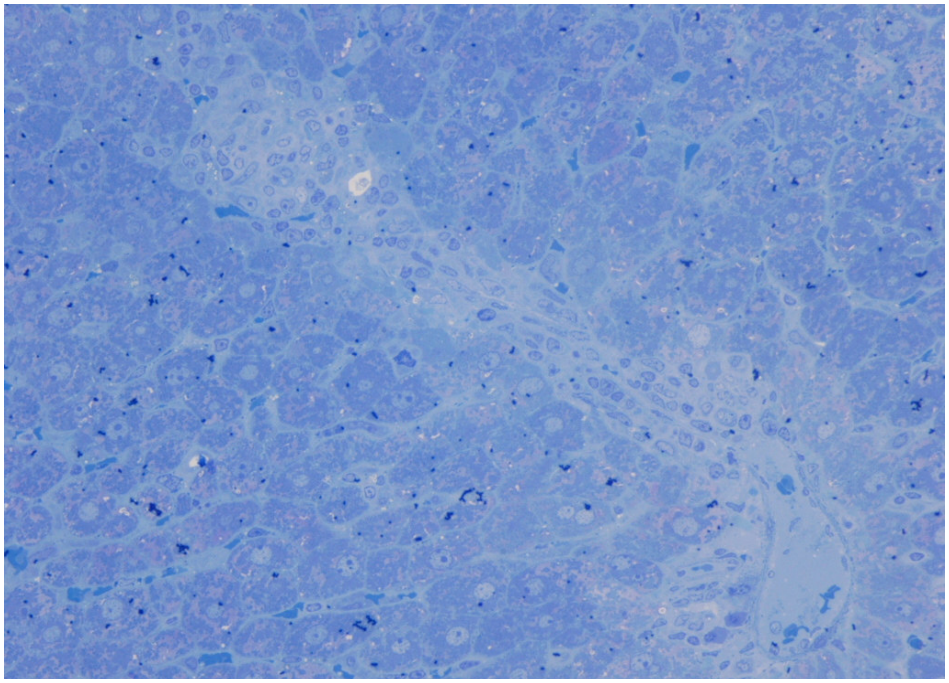
Şekil 13: Kısa barsak sendromu grubundaki bir denekte Hematoksilen Eozin boyamasında bile yaygın yağlı değişiklikler göze çarpıyor. (H&E X200)

4.3.4. Kolestaz

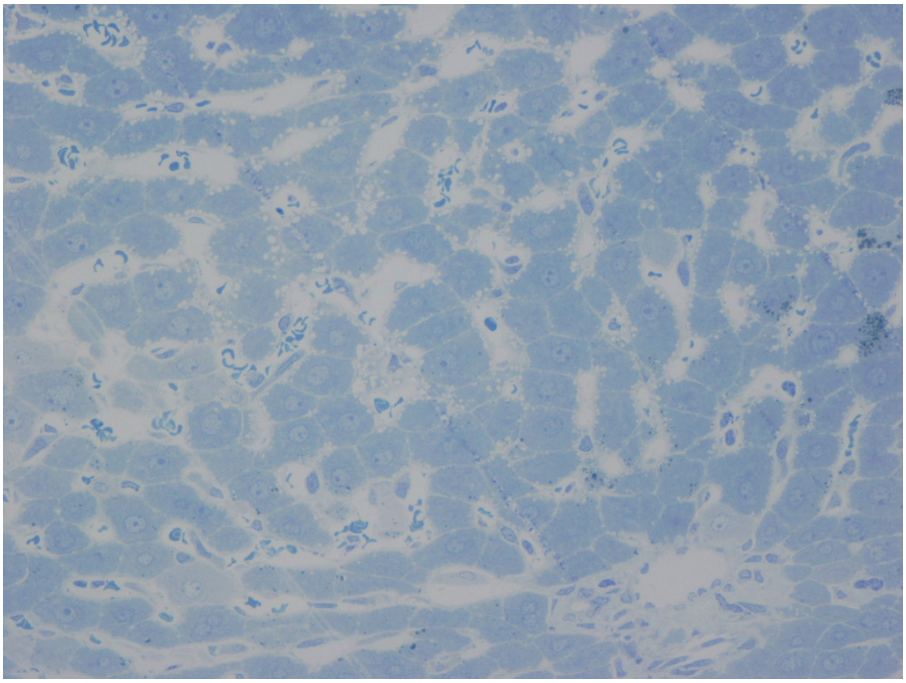
KBS grubundaki beş denekte %5-15 oranında kolestaz izlenirken, sham grubunda hiç kolestaza rastlanmadı (Tablo 7). İki grup arası fark, istatistiksel olarak anlamlıydı (*p<0.05) (Şekil14-15).

Tablo 7: Kısa barsak grubundaki deneklerin beşinde kolestaz izlenirken, sham grubunda kolestaz gözlenmedi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi (*p<0.05)

	Grup		
Kolestaz	KBS	Sham	Toplam
Var	5 (2,3)	0 (2,7)	5
Yok	7 (9,7)	14 (11,3)	21
Toplam	12	14	26



Şekil 14: Sham grubundaki bir denekte spesifik patoloji göstermeyen doku örneği (Toluidin mavisi, x100 büyütme)



Şekil 15: Kısa barsak sendromu grubundaki bir denekte parankimin %15'ini etkileyen kolestaz (Toluidin mavisi, x100 büyütme)

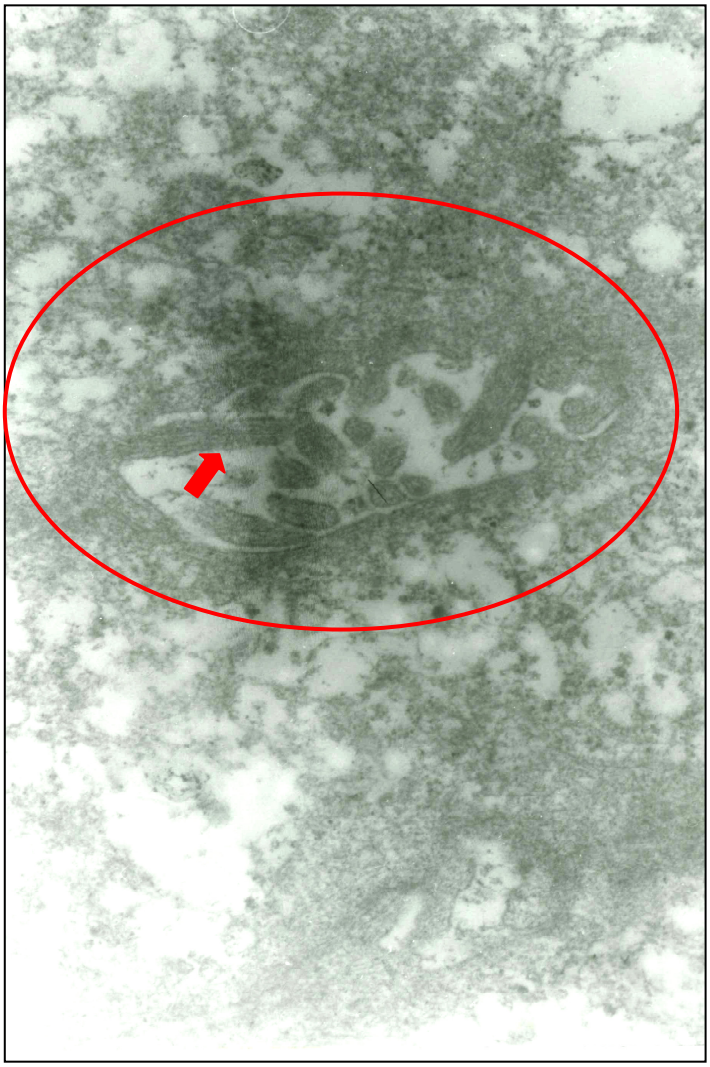
4.4. Elektron Mikroskopisi Değerlendirmeleri

4.4.1. Mikrovillus Kanaliküller Boyu

Kısa barsak sendromu oluşturulmuş grubun 3'ünde, sham grubunun 10'unda mikrovillus kanaliküller boyu normal olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak fark saptanırken (p= 0,025) KBS grubundaki iki denekte orta, yedi denekte hafif düzeyde izlendi (Tablo 8, şekil16).

Tablo 8: Kısa barsak grubu ile sham grubu arasında mikrovillus boyutunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (*p<0.05) (0= Normal, 1= Minimal artış, 2= Orta derecede artış)

	Grup		
Mikrovillus boyutu	KBS	Sham	Toplam
0	3 (6,2)	10 (6,8)	13
1	7 (4,8)	3 (5,2)	10
2	2 (1,0)	0 (1,0)	2
Toplam	12	13	25



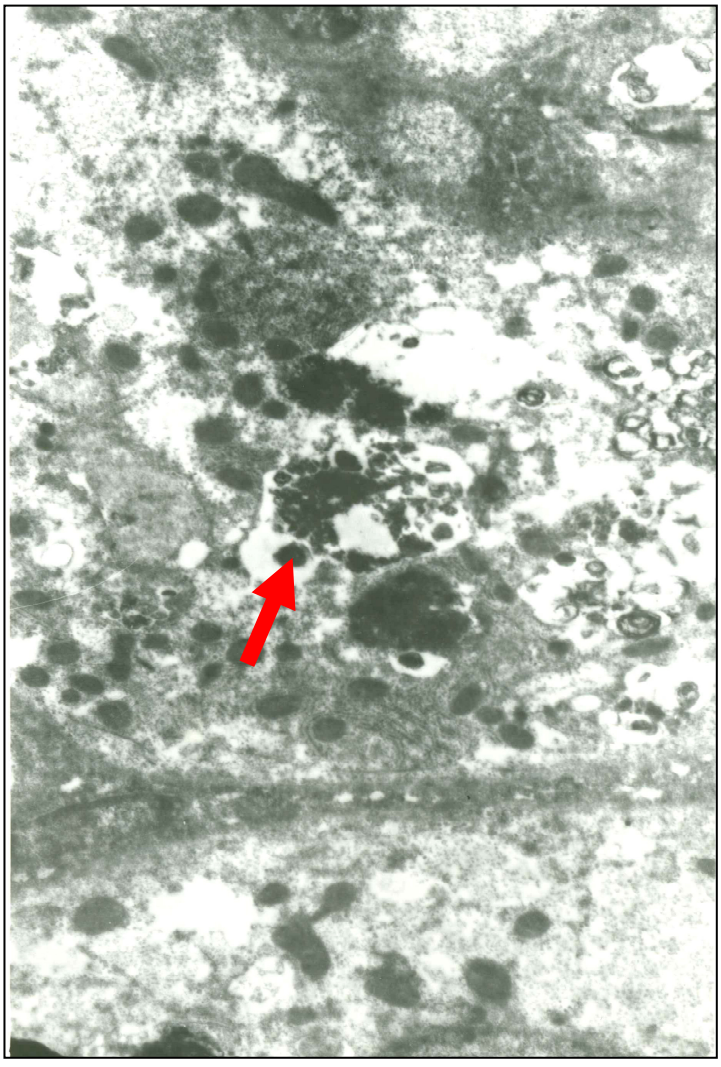
Şekil 16: Kısa barsak sendromlu bir denekten alınan örnekte**,** safra kanalikülü, hafif derecede dilatasyon, mikrovilluslarda sayıca artış ve birkaçındaki uzama (ok) mevcut. Lümende granüler biliyer materyal saptanmadı, Uranil asetat x 20000

4.4.2. Lümende Granüler Biliyer Materyal Varlığı

Kısa barsak grubunda 3 olguda lümende granüler biliyer materyal rastlanırken, sham grubunda hiç gözlenmedi. İki grup arasında anlamlı fark saptandı (*$p<0,05$) (Tablo 9, şekil17).

Tablo 9: Kısa barsak grubu ile sham grubu arasında lümende granüler biliyer materyal bulunması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (*p<0.05)

Luminal Granüler Biliyer Materyal	Grup		
	KBS	Sham	Toplam
Var	3 (1,4)	0 (1,6)	3
Yok	9 (10,6)	13 (11,4)	22
Toplam	12	13	25



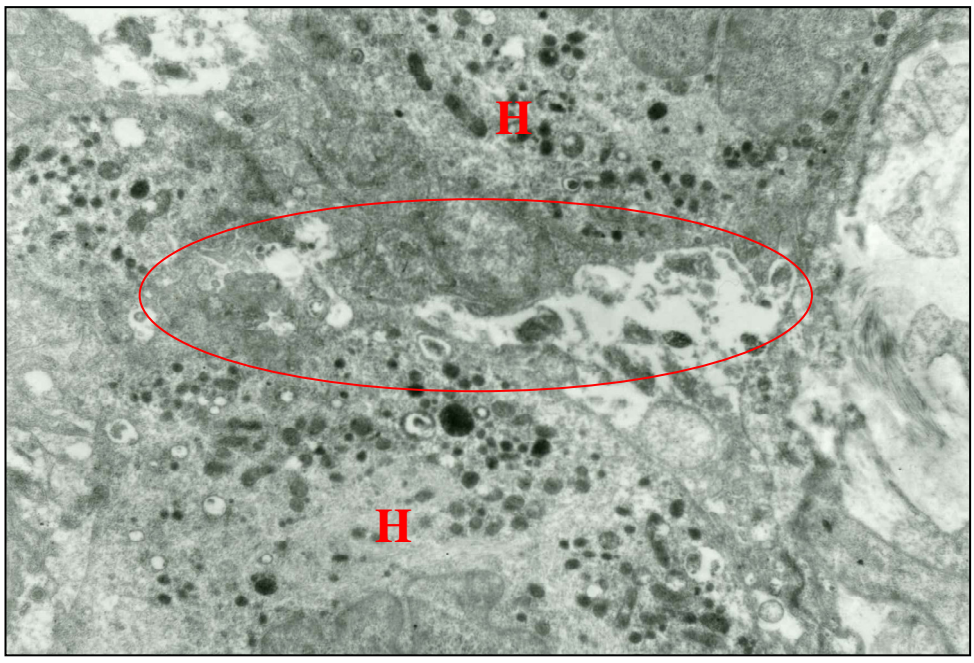
Şekil 17: Kısa barsak grubundaki bir denekten alınan parçanın elektron mikroskopik incelemesinde hepatosit sitoplazmasında intrasitoplazmik glikojen ve mitokondriler arasındaki kaba granüler, elektron yoğun birikim (ok), Uranil asetat x 4400

4.4.3. Kanaliküler Lümen Boyutu

Kısa barsak sendromlu 9 denekte kanaliküler lümen boyunda artış saptanırken, sham grubunda yalnız iki denekte değişiklik izlendi ve istatistiksel olarak anlamlıydı (*p<0,05) (Tablo10, şekil18).

Tablo 10: Kısa barsak grubu ile sham grubu arasında kanaliküler lümen boyutunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (*p<0.05) (0= Normal, 1= minimal genişleme, 2= Orta derecede genişleme)

	Grup		
Kanalikül Lümen Boyutu	KBS	Sham	Toplam
0	3 (6,7)	11 (7,3)	14
1	8 (4,8)	2 (5,2)	10
2	1 (0,5)	0 (0,5)	1
Toplam	12	13	25



Şekil 18: Kısa barsak sendromundaki bir denekten alınan karaciğer dokusunda hepatositler (H) arasındaki hafif derecede dilate olmuş kanalikül (çerçeve) izlenmekte, uranil asetat X3000

4.4.4. Perikanaliküler Alan Genişlemesi

Alınan parçaların ultrastrüktürel incelenmesinde sadece bir KBS'lu denekte perikanaliküler alan genişlemesi izlendi ve iki grup arasında fark saptanmadı (p=0,30) (Tablo11).

Tablo 11: Kısa barsak grubundaki deneklerle sham grubu arasında perikanaliküler alan genişlemesinde fark bulunmadı (p>0.05). (0= Normal, 1= Minimal artış)

Perikanalikül Alan Genişlemesi	Grup		
	KBS	Sham	Toplam
0	11 (11,5)	12 (11,5)	23
1	1 (0,5)	0 (0,5)	1
Toplam	12	12	24

4.4.5. Mikrofilaman Hiperplazisi

Kısa barsak sendromlu grubun 5'de, sham grubunun 2'de minimal mikrofilaman hiperplazisi belirlendi. Kısa barsak oluşturulan grup ile sham grubu arasında fark görülmedi (p=0,13) (Tablo12).

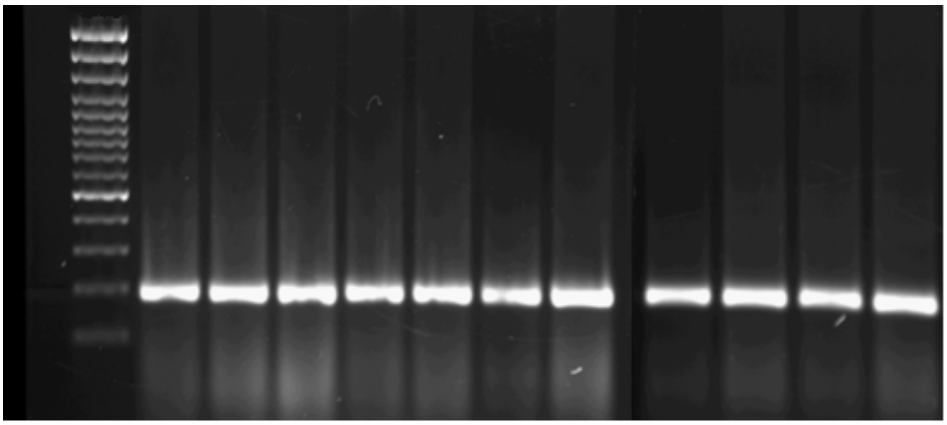
Tablo 12: Kısa barsak grubundaki deneklerle sham grubu arasında mikrofilaman hiperplazisi açısından fark bulunmadı (p>0.05). (0= Normal, 1= Minimal artış)

Mikroflaman Hiperplazisi	Grup		
	KBS	Sham	Toplam
0	6 (7,7)	10 (8,3)	16
1	5 (3,3)	2 (3,7)	7
Toplam	11	12	23

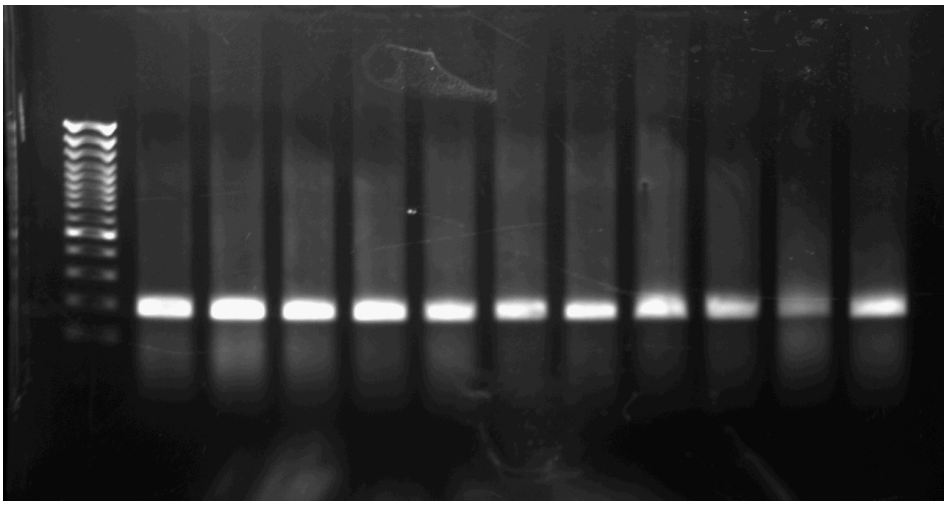
4.5. Karaciğer Örneklemesinde CD 14 Ekspresyonları

RNA izolasyonu sonrası spektrofotometrik olarak 260-280 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerde değerlendirildi. Sham grubundaki iki örnekte yetersiz RNA konsantrasyonu saptanarak inceleme dışına alındı. RT-PZR

amplifikasyonu ile elde edilen bantlar şekil19-20'de gösterilmektedir. Semikantitatif olarak β-aktin ile yapılan alan oranlamasıyla elde edilen veriler KBS grubunda 36,96 ±0,43, sham grubunda 35,55±0,30 olarak bulundu. KBS grupta CD14 ekspresyonunda sham grubuna göre anlamlı artış saptandı (p=0,013) (Tablo 13).

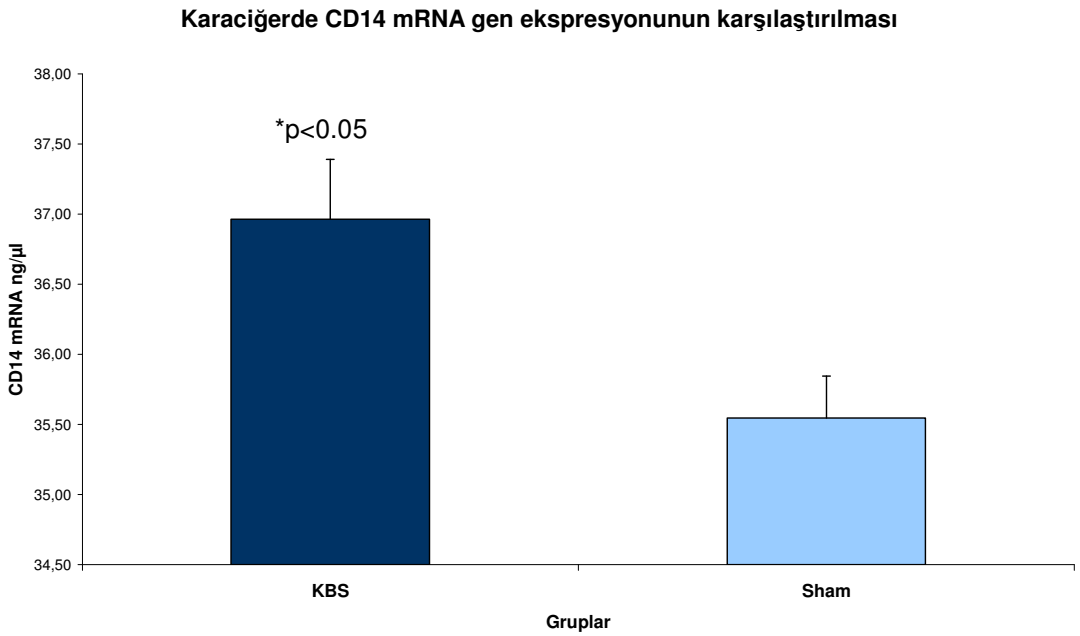


Şekil 19: KBS grubunda karaciğerde CD14 ekspresyonu



Şekil 20: Sham grubunda karaciğerde CD14 ekspresyonu

Tablo 13: Kısa barsak grubu ile sham grubu arasında CD14 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (*p<0.05)



5. TARTIŞMA

Kısa barsak sendromu (KBS), ince barsakların önemli bir bölümünü anatomik ya da fonksiyonel nedenlerle kaybeden hastalarda, kısa geçiş zamanı, yetersiz kalori, protein ve vitamin emilimiyle karakterize, steatore ve elektrolit bozukluklarıyla seyreden klinik tabloyu tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bu sendrom ince barsak rezeksiyonları sonucu geride yeterli uzunlukta ince barsak kalmaması ya da allerji, vasküler yetmezlik veya aşırı bakteriyel proliferasyon sonucu ince barsak mukozasının zedelenerek fonksiyon kaybına uğraması ile ortaya çıkmaktadır (4,15,57).

Ameliyat sonrası erken dönemde kısa barsak sendromlu hastaların besin gereksinimlerinin tümü, enteral beslenmeye başlandıktan sonra da uzunca bir süre kısmen TPB'le karşılanır. KBS'da karaciğer hasarlanmasından sıklıkla TPB sorumlu tutulup genellikle bu konu üzerine yoğunlaşılmıştır. İntestinal rezeksiyon yapılan bu olgularda kolestaz ve karaciğer yetmezliği gelişmesini yalnızca damar içi beslemeye bağlamak yeterli değildir. Birincisi bu hastaların tümü TPB ile takip edilmesine karşın hepsinde kolestaz gelişmez. İkincisi TPB süresinin uzunluğu ile kolestazın prevelansı ve ciddiyeti arasında direkt ilişki gösterilememiştir. Ayrıca kolestaz genellikle TPB erken dönemlerinde gelişebilirken, kendiliğinden düzelebilir ve damar içi besleme devam etmesine rağmen tekrarlamayabilir. Bu çalışma ile TPB'den bağımsız olarak karaciğer hasarlanmasının gelişebileceği ultrastrüktürel düzeyde gösterilmiştir. Elektron mikroskopik olarak karaciğerde kolestazın belirteçleri arasında yer alan mikrovillus boyunda artış, lümende granüler biliyer materyal varlığı, kanaliküler lümen boyutunda artış kısa barsak grubunda sham grubuna oranla istatistiksel olarak daha fazla oranda görülmüştür. Elektron mikroskopik yapısal değişimler erken safhada gözlenen ilk bulgulardır. Yapılan bu deneysel çalışmada 7. haftadan itibaren ultrastrüktürel farklılaşmanın başladığının gösterilmesi anlamlıdır.

Kolestaz ile birlikte seyreden intestinal yetmezlikte hepatik steatozdan biliyer siroza kadar değişebilen histopatolojik değişiklikler izlenebilir. Yetişkinlerde hepatik steatoz daha sıklıkladır ve inflamasyon, kolestaz ya da

hepatik sellüler nekroz gelişmeksizin görülebilir. Çocuklarda karaciğerde yağlanma daha ender gözlenir. Sentrilobüler kolestaz, portal inflamasyon yağlı değişikliğin eşlik ettiği ya da etmediği nekrozis ile karakterizedir. İlerlemiş karaciğer hastalığı portal fibrozis (%100), perisellüler fibrozis (%95), safra kanal proliferasyonunu (%86) içerir. Pigmente Kupffer hücreleri (%81) ve portal köprüleşme (%86) göze batan özelliklerdir (29). Ultrastrüktürel olarak bu çalışmada saptanan değişikliklerin histopatolojik olarak ışık mikroskopisindeki dışavurumu kısa barsak grubundaki deneklerde sham grubuna oranla kolestazın belirgin olarak görülmesi ($p<0.05$), fibrozisin ise neredeyse istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek oranda kısa barsak sendromu grubunda daha fazla olması şeklinde ($p=0.08$) ortaya çıkmıştır. Sham grubunda sadece bir denekte fibrozis gözlenirken kısa barsak grubundaki 5 denekte, 2'si belirgin derecede fibrozis gözlenmiştir, fibrozis varlığı ya da yokluğu şeklinde bir istatistiki değerlendirme yapıldığı takdirde iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak metodolojide belirlenen derecelendirme sistemiyle de istatistiksel olarak neredeyse anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Sunulan çalışmada biyokimyasal olarak yapılan incelemelerde herhangi bir fark saptanmamasının olası nedeni, parametrelerin karaciğer hasarlanmasının geç döneminde yükselmesi, hücre içi değişiklik evresinde bunun tam olarak saptanamaması olarak söylenebilir.

Motilitenin yavaşlaması ile oluşan bakteriyel aşırı çoğalmada Gram negatif organizmalardan kaynaklanan lipopolisakkarit endotoksini ve Gram negatif, Gram pozitif organizma kaynaklı peptidoglikan polisakkarit endotoksini mukozal hasarlanma, artmış mukozal geçirgenlik, lenfatik ve/ veya mezenterik venöz translokasyonla ile barsaktan karaciğere geçer. Karaciğerde yer alan makrofajlar ki bunlar Kupffer hücreleridir, endoksinler ile aktive olarak TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açar. Bu işlem lipopolisakkarid- lipopolisakkarid bağlayıcı protein kompleksinin CD14 reseptörüne bağlanarak makrofajlarları uyarması ile gerçekleşir (6,9,12,38). Mogilner ve arkadaşlarının bakteriyel translokasyonu da içeren araştırmasında sham grubundaki bakteriyel geçiş; mezenter lenf

nodu ve portal kanda %20, karaciğer ve perifer kanda gösterilememiştir. Kısa barsak oluşturulan grupta ise lenf nodunda %100, portal kanda %60, karaciğerde %100, periferik kanda %40 bakteriyel translokasyon saptamışlardır (35). Aprahamian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %75 barsak rezeksiyonu ile KBS oluşturulan grupta sham grubuna göre IL-6 daha yüksek serum seviyelerine ulaşmıştır. TPB bağımlı olmayan çalışmada IL-6 ve TNFα mRNA düzeyleri artmış olarak bildirilmiştir (58). Periferik kan monositlerinden farklı olarak Kupffer hücrelerinin göreceli olarak daha düşük bir CD14 ekspresyon tabanı mevcuttur (49-51). Ancak LPS'i de içeren çoklu uyarılarla Kupffer hücrelerindeki CD14 ekspresyonunda yani fonksiyonel reseptör sayısında artma gözlenir (67). Karaciğerde CD14 ekspresyonunda alkolik ve kolestatik karaciğer hasarlanması gibi pek çok durumda artış gözlenir (56). Yapılan bu deneysel çalışmada kısa barsak sendromu grubundaki deneklerde CD14 ekspresyonunun belirgin olarak artması proinflamatuvar sitokinlerin aktive olduğunu ve TPB'den bağımsız KBS'nun kendi başına karaciğer hasarlanmasını tetiklediğini gösterebilir.

KBS'da; TPB'den bağımsız karaciğer hasarlanmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacak kapsamlı çalışmaların yapılması ile kısa barsaklı çocukların organ nakline ihtiyaç duymasında ve kaybedilmesinde en fazla sorumluluğa sahip olan karaciğer yetmezliğinin önlenmesinde etkili yöntemler geliştirilebilir.

6. SONUÇLAR

1- KBS grubundaki deneklerin, sham grubuna göre 1. haftadan itibaren belirgin ağırlık kaybı yaşadıkları ve zaman içinde ağırlık kazancı olsa bile hiçbir zaman sham grubundaki denekleri yakalayamadıkları görüldü.

2- Kısa barsak sendromu olan sıçanlarda sham grubuna göre alınan plazma örneklerinde çalışılan karaciğer fonksiyonlarını belirleyen biyokimyasal parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p= 0,49).

3- **Ultrastrüktürel olarak kolestazın belirteçleri arasında yer alan mikrovillus kanaliküller boyu, luminal granüler biliyer materyal varlığı, kanaliküler lümen boyutları KBS grubunda Sham grubuna oranla anlamlı olarak artmış saptandı (*p< 0,05).**

4- **Karaciğer dokusunda histopatolojik olarak kolestaz değerlendirildiğinde, KBS grubunda %41 oranında kolestaz izlenirken, sham grubunda kolestaza rastlanmadı (*p<0.05). Diğer histopatolojik incelemeler arasında belirgin farklılık saptanmadı.**

5- **CD14 ekspresyonu KBS grubunda sham grubuna oranla belirgin olarak artmış bulundu (*p<0,05).**

ÖZET

KISA BARSAK SENDROMUNDA KARACİĞERDE ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER VE CD14 EKSPRESYONU

Amaç: Kısa barsak sendromunun (KBS), total parenteral beslemeden (TPB) bağımsız karaciğer hasarlanmasına etkilerini histopatolojik, elektron mikroskopik, biyokimyasal ve CD14 mRNA ekspresyonunu araştırarak ortaya koymak

Gereç ve Yöntem: Ağırlıkları 180-220 g arasında değişen 37 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan, sham (n=16) ve kısa barsak sendromu (n=21) gruplarına ayrıldı. Ketamin-ksilazin anestezisi altında sham grubunda ileoçekal valvin 15 cm. proksimalinden ileum transekte edildi ve rezeksiyon yapılmaksızın uç-uca anastomoz yapıldı. KBS grubunda ise, Treitz bağının 5 cm distali ile ileoçekal valvin 10 cm proksimali arasındaki ince barsaklar, mezenterik damarları ayrılarak, rezeke edildi ve jejenum ve ileum uç-uca tek tek anastomoz edildi. Yedi haftalık takip süresinin ardından doku ve plazma örnekleri alınarak histopatolojik, elektron mikroskopik, biyokimyasal ve RT-PZR ile CD14 mRNA ekspresyonlarına bakıldı.

Bulgular: Biyokimyasal olarak anlamlı fark saptanmadı. Işık mikroskopik incelemelerde inflamasyon, fibrozis, yağlanmada fark saptanmazken, kolestazın gözlenmesi anlamlıydı(*p<0,05). Ultrastrüktürel olarak mikrovillus kanaliküller boyu, lüminal granüler biliyer materyal varlığı kanaliküler lümen boyutu arasında fark saptandı(*p<0,05). Perikanaliküler alan genişlemesi ve mikrofilamanların hiperplazisinde fark saptanmadı. CD14 ekspresyonu KBS grubunda belirgin olarak artmış saptandı (*p<0,05).

Sonuç: KBS'da; TPB'den bağımsız ultrastrüktürel düzeyde kolestaz gelişmektedir. KBS grubunda CD14 mRNA ekspresyonunun artışı bu değişikliklerin portal venöz endotoksemiye bağlı oluşmuş olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Sözcükler: endotoksemi, karaciğer yetmezliği, kısa barsak sendromu, kolestaz, RT- PZR

SUMMARY

ULTRASTRUCTURAL CHANGES AND mRNA CD14 EXPRESSION IN SHORT BOWEL SYNDROME

Aim: To develop an animal model for the study of non-TPN related liver disease associated with SBS and collect prliminary data on histology, ultrastructural changes, liver function tests and CD14 expression regarding mechanisms of non-TPN cholestasis.

Materials and Methods: Male Wistar Albino rats, weighting 180 to 220 g, totally 37 in number are allocated into two groups as sham operated (n=16) and SBS animals (n=21) randomly. Under ketamin and xylasine anesthesia, in the sham group operations consisted of division and re-anastomosis of the bowel 15 cm proximal to the ileocecal junction. In SBS group, the bowel between 5 cm distal to the ligament of Treitz and 10 cm proximal to the ileocecal junction was resected by ligation and division of the mesentery. Intestinal continuity was restored using an end-to-end, single-layered anastomosis with interrupted sutures. After seven weeks follow-up, plasma and tissue samples were collected for histopathologic, electron microscopic, biochemical studies and RT- PCR.

Results: Biochemical values were not significantly changed. Histopathological changes; inflammation, fibrosis, fatty changes were not significantly changed. Cholestasis were significantly higher in SBS group (*$p<0.05$). Ultrastructural changes; microvillus canaliculer, luminal granuler bilier material, canaliculer lumen dimension, were significantly changed. There were no significant difference between two groups when compared for widening of pericanaliculer ectoplasm and microflaments hiperplasia in liver. CD14 mRNA expression were significantly higher in SBS group (*$p<0.05$).

Conclusion: : Non-TPN related cholestasis developed ultrastructurally in SBS. Up-regulation of CD14 mRNA expression in SBS group may support that these changes could be related with portal venous endotoxemia.

Key Words: cholestases, hepatic failure, endotoxemia, RT- PCR, short bowel syndrome

KAYNAKLAR

1- Btaiche IF, Khalidi N. Parenteral nutrition- associated liver complications in children. *Pharmacotherapy*. 2002; 22(2): 188-211.

2- O'Neill JA, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG, Caldamone AA. Short- bowel syndrome. *Principles of Pediatric Surgery*. Mosby, 2004: 519-525.

3- Goulet O, Ruemmele F, Lacaille F, Colomb V. Irreversible intestinal failure. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2004; 38: 250-269.

4- Forchielli ML, Richardson D, Folkman J, Gura K, Lo CW. Better living through chemistry, constant monitoring, and prompt interventions: 26 years on home parenteral nutrition without major complications. *Nutrition*. 2008; 24(1): 103-107.

5- Stanko RT, Nathan G, Mendelow H. Development of hepatic cholestasis and fibrosis in patients with massive loss of intestine supported by prolonged parenteral nutrition. *Gastroenterology*. 1987; 92:197-202.

6- Sondheimer JM, Asturias E, Cadnapaphornchai M. Infection and cholestasis in neonates with intestinal resection and long -term parenteral nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 1998; 27: 131-137.

7- Meehan JJ, Georgeson KE. Prevention of liver failure in parenteral nutrition- dependent children with short bowel syndome. *Journal of Pediatric Surgery*.1997; 32(3): 473-475.

8- Fong Y, Marano MA, Barber A, He W, Moldawer LL, Bushman ED, Coyle SM, Shires GT, Lowry SF. Total parenteral nurition and bowel rest modify the metabolic response to endotoxin in humans. *Annuals Surgery*. 1989; 210(4); 449- 457.

9- Trauner M, Fickert P, Stauber RE. Inflammation- induced cholestasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1999; 14: 946-959.

10- Owings E, Georgeson K. Management of cholestasis in infants with very low birth weight. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2000; 9 (2): 96-102.

11- Zeuzem S. Gut- liver axis. *International Journal of Colorectal Disease*. 2000;15: 59-82.

12- Jarvelainen HA, Fang C, Ingelman- Sundberg M, Lindros KO. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti- inflammatory cytokines. *Hepatology*. 1999; May: 1503-1510.

13- Falcone RA, Warner BW. Short- bowel syndrome.In: Ziegler MM, Azizkhan RG, Weber TR. *Operative Pediatric Surgery*. McGraw- Hill, 2003: 699-713.

14- Misiakos EP, Macheras A, Kapetanakis T, Liakakos T. Short bowel syndrome: current medical and surgical trends. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2007; 41: 5-18.

15- Başaklar AC. Kısa barsak sendromu. In: Başaklar AC. *Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 545- 578.

16- Guyton AC, Hall JE. Sindirim kanalının salgı fonksiyonları. *Textbook of Medical Physıology*. W.B. saunders Company, 1996: 827-830.

17- Andorsky DJ, Lund DP, Lillebei CW, Jaksic T, DiCanzio J, Richardson DS, Collier SB, Lo C, Duggan C. Nutritional and other postoperative management of neonates with short bowel syndrome correlates with clinical outcomes. *The Journal of Pediatrics.* 2001; 139: 27-33.

18- Taguchi S, Masumoto K, Yamanouchi T, Suita S. Decrease in hepatic circulation induces hepatic fibrosis in a neonatal piglet model with short bowel syndrome. *Journal of Pediatric Surgery*. 2005; 40: 1592-1597.

19- Jansen PLM, Ekkehard S. Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. *Liver International.* 2003;23: 315-322.

20- Arrese M, Trauner M. Moleculer aspects of bile formation and cholestasis. *Trends in Moleculer Medicine.* 2003; 9 (12): 558- 564.

21- Chan S, McCowen KC, Bistrian BR, Thibault A, Keane- Ellison M, Forse RA, Babineau T, Burke P. Incidence, prognosis, and etiology of end-

stage liver disease in patients receiving home total parenteral nutrition. *Surgery*. 1999; 126(1): 28-34.

22- Deirdre AK. Liver complications of pediatric parenteral nutrition-epidemiology. *Nutrition*. 1998; 14(1): 153-157.

23- Burstyne M, Jensen GL. Abnormal liver functions as a result of total parenteral nutrition in a patient with short bowel syndrome. *Nutrition*. 2000; 16(11/12): 1090-1092.

24- Chung KW, Han NI, Chol SW, Ahn BM, Yoon SK, Nam SW, Lee YS, Han JY, Sun HS. Increased microfilaments in hepatocytes and biliary ductular cells in cholestatic liver diseases. *Journal of Korean Medical Science*. 2002; 17: 795-800.

25- Kaufman SS. Prevention of parenteral nutrition- associated liver disease in children. *Pediatric Transplantation*. 2002; 6: 37-42.

26- Kaufman SS, Gondolesi GE, Fishbein TM. Parenteral nutrition associated liver disease. *Seminars in Neonatology*. 2003; 8:375-381.

27- Lloyd ADJ, gabe SM. Managing liver dysfunction in parenteral nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007; 66: 530-538.

28- Alpers DH. Liver complications and failure in patients on home parenteral nutrition. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2001; 17(2): 147-149.

29- Kemp R, Correia RB, Santakarantutty AK, Santos JS, Modena JLP, Mente ED, Silva OC. Liver disease associated with intestinal failure in small bowel syndrome. *Acta Cirurgica Brasileira*.2006; 21 (1): 67-71.

30- Toyama N, Kobayashi E, Walker NI, Kiyozaki H, Mori Y, Miyata M. Liver damage associated with short gut syndrome and parenteral nutrition. *Transplantation Proceedings*. 1994; 26(3): 1650-1651.

31- Moss RL, Amii LA. New approaches to understanding the ethiology and treatment of parenteral nutrition- associated cholestasis. *Seminars in Pediatric Surgery*. 1999; 8(3): 140-147.

32- Loff S, Kranzlin B, Moghadam M, Dzakovic a, Wessel L, Back W, Hosie S, Wirth H, Waag KL. Parenteral nutrition- induced hepatobiliary

dysfunction in infants and prepubertal rabbits. *Pediatric Surgery International*. 1999;15: 479-482.

33- Wessel JJ, Kocoshis SA. Nutritional management of infants with short bowel syndrome. *Seminars in Perinatology.* 2007; 31(2): 104-111.

34- Demircan M, Ergun O, Avanoglu S, Yılmaz F, Ozok G. Determination of serum bile acids routinely may prevent delay in diagnosis of total parenteral nutrition- induced cholestasis. *Journal of Pediatric Surgery*. 1999; 34 (4): 565-567.

35- Mogilner JG, Srugo I, Lurie M, Shaoul R, Coran AG, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of probiotics on intestinal regrowth and bacterial translocation after massive small bowel resection in a rat. *Journal of Pediatric Surgery*. 2007;42: 1365-1371.

36- Vanderhoof JA. New and emerging therapies for short bowel syndrome in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2004; 39: 769-771.

37- Soondrum K, HindsR. Management of intestinal failure. *Indian Journal of Pediatrics*. 2006; 73: 913-918.

38- Lukkari TA, Jarvelainen HA, Oinonen T, Kettunen E, Lindros K. Short-term ethanol exposure increases the expression of Kupffer cell CD14 receptor and lipopolysaccharide binding protein in rat liver. *Alcohol & Alcoholism*. 1999; 34 (3): 311-319.

39- Zinchuk VS, Okada T, Seguchi H. Lipopolysaccharide alters ecto-ATP- diphosphohydrolase and causes relocation of its reaction product in experimental intra hepatic cholestasis. *Cell and Tissue Research*. 2001; 304: 103-109.

40- Van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*. 1990; 12: 2520-2526.

41- Su L. Lipopolysaccharides in liver injury: moleculer mechanisms of Kupffer cell activation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2002; 283: 256-265.

42- Lin RS, Lee FY, Lee SD, Tsai YT, Lin HC, Lu RH, Hsu WC, Huang CC, Wang J, Lemasters JJ. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varicies and hyperdynamic circulation. *Journal of Hepatology*. 1995; 22: 165-172.

43- Bautista AP, Spitzer JJ. Acute endotoxin tolerance downregulates superoxide anion release by the perfused liver and isolated hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology*. 1995; 21: 855-862.

44- Arthur MJP, Kowalski- Saunders P, Wright R. Effect of endotoxin on release of reactive oxygen intermediates by rat hepatic macrophages. *Gastroenterology*. 1988; 95: 1588-1594.

45- Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*. 1995; 108: 218-224.

46- Zuo G, Gong J, Liu C, Li S, Wu X, Yang K, Li Y. Expression of lipopolysaccharide binding protein and its receptor CD14 in experimantal alcolic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2001; 7(6): 836-840.

47- Jarvelainen HA, Fang C, Ingelman- Sundberg M, Lindros KO. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti- inflammatory cytokines. *Hepatology.*1999; 29(5):1503-1510.

48- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990; 249: 1431-1433.

49- Antal- Szalmas P. Evaluation of CD14 in host defence. *European Journal of Clinical Investigation.* 2000; 30:167- 179.

50- Takai N, Kataoka M, Higuchi Y, Matsuura K, Yamamoto S. Primary structure of rat CD14, cytokine, an NO synhase mRNA expression in mononuclear phagocyte system cells in response to LPS. *Journal of Leukocyte Biology.*1997; 61: 736-744.

51- Ziegler- Heitbrock H, Ulevitch RJ. CD 14: cell surface receptor and differantion marker. *Immunology Today*. 1993; 14: 121-125.

52- Bellezzo JM, Britton RS, Bacon BR, Bacon BR, Fox ES. LPS-mediated NF-kappa beta activation in rat Kupffer cells can be induced independently of CD14. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1996; 270: 956-961.

53- Lichtman SN, Wang J, Lemasters JJ. LPS receptor CD14 participates in release of TNF-alpha in RAW 264.7 and peritoneal cells but not in kupffer cells. *American Journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*.1998; 275:39-46.

54- Matsuura K, Ishida T, Setoguchi M, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S. Upregulation of mouse CD14 expression in Kupffer cells by lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine.* 1994; 179: 1671-1676.

55- Ferero E, Jiao D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, Goyert SM. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*. 1993; 90: 2380-2384.

56- Su GL; Goyert SM, Fan MH, Aminlari A, Gong KQ, Klein RD, Myc A, Alarcon WH, Steinstraesser L, Remick DG, Wang SC. Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2002; 283: 640- 645.

57- W u J, Tang Q, feng Y, Huang J, Tao Y,Wang Y, Cai W, Shi C. Nutrition assessment in children with short bowel syndrome weaned off parenteral nutrition: a long- term follow- up study. *Journal of Pediatric Surgery*. 2007; 42: 1372-1376.

58- Aprahamian CJ, Chen M, Yang Y, Lorenz RG, Harmon CM. Two- hit rat model of short bowel syndrome and sepsis: independent of total parenteral nutrition, short bowel syndrome is proinflammatory and injurious to the liver. *Journal of Pediatric Surgery*. 2007; 42:992-997.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU		
	PROTOKOL ADI	Kısa barsak sendromunda portal venöz endotokseminin karaciğer hasarlanmasına etkileri	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç.Dr.Aydın Yağmurlu	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	
	DESTEKLEYİCİ FİRMA		
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 75-1942	Tarih: 04 Temmuz2005
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırıcılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde deneysel araştırmanın Fakültemizde yapılmasında etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoğlu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	

ASLI GİBİDİR

Sy:1

T.C.
Sağlık Bakanlığı
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
"Eğitim, Planlama ve Koordinasyon Kurulu Karar Defteri"

Toplantı No: 0158

21.09.2005

BAŞKAN
Prof.Dr.Ali Pekcan Demiröz
Başhekim

EPKK ASİL ÜYELERİ	EPKK YEDEK ÜYELERİ
Doç.Dr.Yalçın Aral* - EPKK Başkan Vekili, YEK Başkanı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kinik Şefi	Dr.Uğur Koşar***' I. Radyoloji Klinik Şefi
Op.Dr.Erdal Samim*** I. K.B.B. Hastalıkları Klinik Şefi	Doç.Dr.Gül Gürsoy***' III. İç Hastalıkları Klinik Şefi
Op.Dr.Sunay Duman*** I. Göz Hastalıkları Klinik Şefi	Doç.Dr.Uğur Koçer***' I. Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Klinik Şefi
Doç.Dr.Yıldız Dallar*** Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Klinik Şefi	Doç.Dr.Meliha Korkmaz***' Nükleer Tıp Klinik Şefi
Op.Dr.Ali Ulvi Öngören* II. Genel Cerrahi Klinik Şefi	Doç.Dr.Bülent Gökmen***' Kadın Hastalıkları ve Doğum Klinik Şefi

*Yerel Etik Kurul (YEK) ve Eğitim Plan ve Koordinasyon Kurulu (EPKK) Üyeleri **YEK Üyeleri ***EPK Üyeleri ***'EPK Yedek Üyeleri

KARARLAR (devam):

894. **Kısa Barsak Sendromunda Portal Venöz Endotokseminin Karaciğer Hasarlanmasına Etkileri.** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cocuk Cerrahisi Anabilim Dalı (Prof.Dr.Hüseyin Dindar, Doç.Dr.Aydın Yağmurlu, Dr.Gülnur Göllü, Prof.Dr.İ.Haluk Gökçora). Prospektif (experimental) hayvan (Wistar Albino rat) çalışması. Çalışmanın protokol, usul, yaklaşım ve yöntem yönünden "ETİK" değerlendirmesinde "UYGUN" "OLDUĞUNA" / [redacted] / "OYBİRLİĞİ" ile karar verilmiş, Hastanemiz hayvan laboratuvarı gerekliliklerinin ve araştırma için belirlenen uygulama, tetkik ve girişimlerin araştırma gurubunca karşılanması kaydı ile çalışmanın yapılmasına ve Hastanemiz hayvan laboratuvarının kullanılmasına "İZİN" "VERİLMİŞTİR / [redacted]".

Doç.Dr.Yalçın Aral*

Op.Dr.Erdal Samim***

Op.Dr.Sunay Duman***

Doç.Dr.Yıldız Dallar***

Op.Dr.Ali Ulvi Öngören*

Prof.Dr.Ali Pekcan Demiröz (96096)
Başhekim