

Prokalsitonin intestinal iskemide belirleyici bir faktör olabilir mi?

Ömer YILMAZ, Abdülkadir GENÇ, Fatma TANELİ, Semin AYHAN, Cansu ÜNDEN ÖZCAN, Can TANELİ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi, Biyokimya, Patoloji Anabilim Dalları, Manisa

Özet

Amaç: Prokalsitonin, kalsitonini oluşturan prekürsörlerdendir. Günümüzde erişkin ve çocuk olguların enfektif ve enflamatuvar durumlarında belirteç olarak kullanılmaktadır. İntestinal iske mi bebeklikten erişkinliğe birçok hastalığın etiolojisinde önemli rol oynamaktadır. Nekrotizan enterokolit (NEK), midgut volvulus gibi hastalıklar iske mi ile ilişkili durumlardır. İske mi ile mukozal bütünlüğün bozulması bakteriyel translokasyon ile sonuçlanmaktadır. Amaç, intestinal iske mi deneysel modelinde prokalsitoninin erken bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağıın araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 35 adet rat kullanılmıştır. Denekler rasgele 7'şerli 5 gruba ayrılmıştır. Grup 1'de 120 dk., grup 2'de 60 dk., grup 3'te 30 dk. mezenter iske mi uygulanmıştır. Grup 4'teki denekler sham kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Grup 1-2 ve 3'te batin kapatılarak 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Grup 4'te de işlem sonrası batin kapatılarak 4 saat beklenmiştir. Grup 5 kontrol grubu olarak ayrılmıştır. İşlem sonunda prokalsitonin ölçümü için kan, patolojik inceleme için de terminal ileumdan 3 cm'lik bir segment alınmıştır.

Bulgular: Deneklerin prokalsitonin serum düzeyi ortalamaları Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel açıdan belirgin bir fark vardır ($p=0,01$). Mann-Whitney U testinde bu fark iske mi oluşturulan gruplar ile kontrol grupları arasındadır ($p<0,05$). İske mi oluşturulan deney grupları arasında herhangi bir istatistiksel fark saptanmamıştır. Histolojik bulguların ağırlığı ile serum prokalsitonin düzeyleri arasında istatistiksel bir ilişki bulunmamaktadır.

Sonuç: Prokalsitonin serum düzeyi bağırsak iskemisinden sonra erken dönemde yükselmektedir. Deneysel bağırsak iskemisinde, iske mi derecesi ile prokalsitonin serum düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanmadığından barsak iskemisinde negatif tarama testi olarak kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Prokalsitonin, NEK, intestinal iske mi

Adres: Dr. Ömer Yılmaz, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı. 45010, Manisa
Yayına kabul tarihi: 20.10.2009

Summary

Could procalcitonin be a determining factor in the diagnosis of intestinal ischemia?

Aim: Procalcitonin is one of the precursors which forms calcitonin and today, it is being used as an indicator in the infections and inflammations of adult and children. Intestinal ischemia plays an important role in the etiology of numerous diseases from infancy to adulthood. Diseases associated with intestinal ischemia include necrotizing enterocolitis and midgut volvulus. Bacterial translocation resulted in the impairment of mucosal integrity secondary to the intestinal ischemia. The objective of this study is to assess whether serum procalcitonin could be used as an early indicator of intestinal ischemia.

Material and Methods: In our study, 35 rats were used. The subjects were randomly separated into 5 groups, each consisting of 7 rats. Mesenteric ischemia was applied for 120 minutes in Group 1, 60 minutes in group 2 and 30 minutes in Group 3. The subjects in Group 4 were designated as the sham control group. In Groups 1, 2 and 3 the abdomen was closed and reperfusion was applied for 4 hours. In Groups 4, the abdomen was closed upon the completion of the operation and 4 hours passed. Group 5 was classified as the control group. At the end, blood was taken for procalcitonin measurement and a segment of 3 cm was taken from the terminal ileum for pathological evaluation.

Results: There was a statistically significant difference between the procalcitonin serum levels of the five groups evaluated by Kruskal-Wallis variance analysis ($p=0,01$). However, in comparison of the groups by Mann-Whitney U test, this difference seemed to occur only between the control groups and the groups which intestinal ischemia was developed ($p<0,05$). No difference was observed in groups which intestinal ischemia was developed. There was no correlation between procalcitonin serum levels of groups and the severity of the histological findings.

Conclusion: It was observed that procalcitonin serum levels increased in the intestinal ischemia in the early period. As relationship between procalcitonin serum levels and degree of ischemia has not been identified in experimental intestinal ischemia, it could be considered that procalcitonin serum levels may be used as a negative screening test.

Key words: Procalcitonin, NEC, intestinal ischemia

Giriş

Prokalsitonin 116 aminoasitten meydana gelen bir peptid olup, kalsitonini oluşturan prekürsörlerden bi-

risi olarak bilinmektedir⁽⁹⁾. Normal koşullarda kalsitonin oluşturmak üzere tiroidin C hücrelerinden salgılanmaktadır. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarda prokalsitoninin enfektif durumlarda kan seviyesinin yükseldiği ve bunun ekstratiroidal kökenli olduğu gösterilmiştir⁽⁹⁾. Buradan yola çıkılarak sepsisli olguların erken tanı ve tedaviye yanıtlarının değerlendirilmesinde kullanılmaya başlanmış; daha sonra bunun çocuk olgularda da kullanılabileceği belirtilmiştir^(14,15). Günümüzde çocuk olguların yalnızca sepsis değil bazı enfektif durumlarında da bir enfeksiyon belirtici olarak kullanılabileceğine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır⁽¹²⁾.

İntestinal iske mi bebektikten erişkinliğe birçok hastalığın etiolojisinde önemli rol oynamaktadır. İskemi-yi takip eden reperfüzyonun dokuda büyük oranlarda serbest oksijen radikalleri salınımına neden olarak dokuda daha fazla hasar oluşturduğu düşünülmektedir⁽⁵⁾. Çocuk cerrahisi kliniği içinde de iske mi nekrotizan enterokolit (NEK), midgut volvulus gibi cerrahi hastalıkların patogenezi ile ilişkilidir⁽⁷⁾. NEK'te iske minin patogenezi ana etken mi olduğu, hastalık süreci içinde mi geliştiği ve iske minin nasıl oluştuğu bugün sorgulanmaktadır. Ama kesin olan nokta NEK'te iske mi ana histolojik bulgulardan birisidir⁽⁸⁾ ve patogenezi de enfeksiyon, beslenme tarzı ve iske mi önemli etkenler olarak belirtilmektedir⁽¹¹⁾. İske minin mukozal bütünlüğü tehdit etmesi ve bozması, bağırsakta yerleşen mikroorganizmaların kana geçmesi ile sonuçlanmaktadır (bakteriyel translokasyon)⁽⁸⁾.

Bu bizde prokalsitoninin bağırsağın iske misinde durumlarında belirleyici bir faktör olup olamayacağı düşüncesini soruşturmamıza neden olmuştur. Çalışmada amacımız intestinal iske mi deneysel modelinde serum prokalsitonin düzeyinin ölçümü ve bağırsak iske misinde prokalsitoninin erken bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 35 adet Wistar-albino tipi rat kullanılmıştır. Dene y sırasında Helsinki Sözleşmesi'ne uygun olarak davranılmış, çalışma için Yerel Hayvan Etik Kurul Komitesi Başkanlığı'ndan izin alınmıştır. Denekler uygun ısı ve ışık koşulları altında ve herhangi bir beslenme ve su kısıtlaması yapılmadan özel kafeslerde tutul-

muştur. Denekler rasgele 7'şerli 5 gruba ayrılmıştır. Tüm deneklerde 50 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid intramuskuler olarak verilerek anestezi sağlanmıştır. Daha sonra sırt üstü yatar pozisyonda batın bölgesinin tıraş edilmesi ve povidon iodin ile yapılan cilt temizliği sonrasında vertikal insizyonla girişimde bulunulmuştur.

Deneysel Süreç:

Grup 1-2 ve 3'teki deneklerin mezenter arteri bulunarak arterin proksimaline buldok klemp (Vascu-Statt® Single Use Bulldog Clamps, Minnesota, USA) yerleştirildi. Grup 1'de 120 dk., grup 2'de 60 dk., grup 3'te 30 dk. iske mi uygulandı. Grup 4'teki deneklere laparotomi sonrası terminal ileum eksplore edilerek sham kontrol grubu olarak ayrıldı. Serum prokalsitonin düzeyi yangısal uyarıdan yaklaşık 2-6 saat sonra yükseldiğinden Grup 1-2 ve 3'te batın kapatılarak 4 saat reperfüzyon uygulandı. Grup 4'te de işlem sonrası batın kapatılarak 4 saat beklendi. Grup 5'te anestezi dışında herhangi bir girişim yapılmadı ve kontrol grubu oluşturuldu.

Dört saatin sonunda tüm deneklerden prokalsitonin ölçümü için intrakardiyak kan örnekleri alındı. Daha sonra kapatılan insizyon yine açılarak terminal ileumdan 3 cm'lik bir segment patolojik inceleme için rezeke edildi.

Sakrifiye edilen ratlardan alınan yaklaşık 3 cm'lik terminal ileum segmentleri antimezenterik kenar boyunca açılıp akar suda temizlendikten sonra % 10'luk tamponlu formalinde bir gece boyunca fikse edildi. Segmentlerde makroskopik olarak patolojik bir bulgu gözlenmedi. Bu nedenle rastlantısal olarak alınan örnek dokular rutin takip ile hazırlanarak parafine

Tablo 1. Mukozal hasarın değerlendirilmesi.

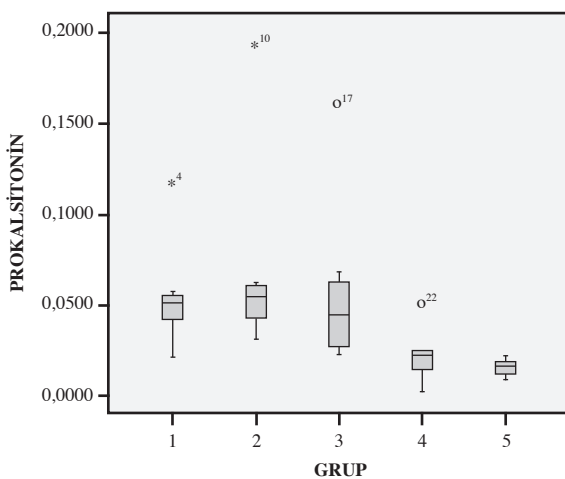
Derece	Tanım
1	Normal intestinal mukoza
2	İntestinal mukozada ödem ve mononükleer hücrelerde artış
3	İntestinal mukozada ödem ve polimorf nüveli lökositlerde hafif artış eşliğinde kapiller dilatasyon
4	Mukozadaki villus yapılarının uç kısımlarında örtücü epitelin dökülmesi, kapiller dilatasyon ve polimorf nüveli lökositlerde belirgin artış
5	Mukozadaki villus yapılarının üzerini örten epitelin tamamen dökülmesi, ülserasyon, villusların siluet halini alması ve lamina propria yapısının bozulması

gömlüdü. Dört-beş mikron kalınlığında yapılan kesitler Hematoksilen&Eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda kör bakı ile değerlendirildi. Mukozal hasar, yangısal hücre infiltrasyonu ve nekroz açısından skorlanarak değerlendirildi (Tablo 1).

Rat kanlarından alınan tam kan örnekleri santrifüj edilerek serumu ayırdı ve ayrılan serum örnekleri -20°C 'de saklanarak toplu olarak analiz edildi. Prokalsitonin düzeyleri Kryptor analizöründe immunoluminometrik yöntemle orijinal reaktifleriyle (PCT sensitive Kryptor, B.R.A.H.M.S. Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Germany) orijinal prospektüs önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Kitin ölçüm limitleri 0.02 ng/ml. dir. Kitin intra-assay varyasyon katsayısı (CV) 0.1 ng/ml konsantrasyonda % 15, 0.2 ng/ml konsantrasyonda % 10 ve 0.3 ng/ml konsantrasyonda ise % 5 olarak saptanmıştır. Kitin inter-assay CV değerleri ise 0.1 ng/ml konsantrasyonda % 15, 0.2 ng/ml konsantrasyonda % 10 ve 0.3 ng/ml konsantrasyonda ise %6 olarak saptanmıştır.

Bulgular

Araştırma gruplarından elde edilen prokalsitoninin serum düzeyleri ortalamaları şu şekildedir: Grup 1'de 0.05421 ± 0.02939 ng/ml, Grup 2'de 0.06877 ± 0.05510 ng/ml, Grup 3'te 0.05734 ± 0.04744 ng/ml, Grup 4'te 0.02105 ± 0.01418 ng/ml, Grup 5'te 0.01510 ± 0.0512 ng/ml. Grupların ortalama ve standart sapma verileri Şekil 1'de box-plot grafik ile gösterilmiştir. Prokalsitonin serum düzeyi ortalamaları Kruskal-Wallis



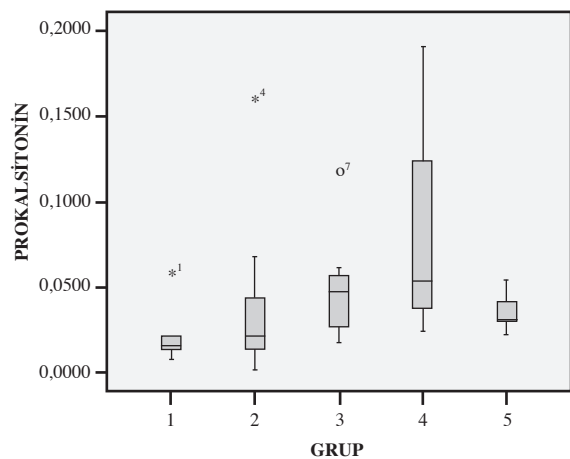
Şekil 1. Prokalsitonin serum düzeylerinin gruplara göre dağılımı ($p=0,01$).

varyans analizi ile değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel açıdan belirgin bir fark vardır ($p=0,01$). Mann-Whitney U testi ile grupların tek tek karşılaştırılmasında bu farkın iskemi oluşturulan gruplar ile kontrol grupları arasında olduğu dikkati çekmektedir ($p<0,05$). Bununla birlikte iskemi oluşturulan deney grupları arasında herhangi bir istatistiksel fark saptanmamıştır. Aynı şekilde sham kontrol ile kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Deneysel grupların serum prokalsitonin düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırma sonuçları.

p değeri	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Grup 1	0,48	1	0,01	0,01
Grup 2		0,40	0,01	0,01
Grup 3			0,03	0,01
Grup 4				0,33
Grup 5				

Gruplar daha sonra ne kadar süre ile iskemide bırakıldığına bakılmaksızın mukozal hasar, yangısal hücre infiltrasyonu ve nekroz açısından histolojik olarak skorlanarak 5 grup altında yeniden sınıflandırılmıştır. İskemi süresinden bağımsız olarak Tablo 1'de özetlendiği şekilde yalnızca histolojik evrelemeye göre sınıflandırılan deneklerin serum prokalsitonin düzeyleri arasında Kruskal-Wallis varyans analizine göre herhangi bir fark bulunamamıştır. Diğer bir değişle histolojik bulguların ağırlığı ile serum prokalsitonin düzeyleri arasında ilişki bulunmamaktadır. Grupların prokalsitonin serum düzeyi ortalamaları Şekil 2'de box-plot grafiği ile gösterilmiştir.



Şekil 2. Prokalsitonin serum düzeylerinin mukozal hasar, yangısal hücre infiltrasyonu ve nekroz açısından yapılan sınıflandırmaya göre gruplar arası dağılımı.

Tartışma

Günümüzde kesin olan bir bulgu var ki o da prokalsitonin yenidoğan ve çocuklarda sepsis ve enfeksiyonun erken dönem belirteçidir⁽¹⁵⁾. Prokalsitonin indüksiyonu son derece hızlıdır. Enfektif uyarı verilmesinden 2-6 saat sonra kan değerleri yükselmektedir^(5,9). Yaklaşık olarak 12. saatte de kan düzeyi pik yapmaktadır⁽⁵⁾. Klinik uygulamada bir enfeksiyon belirteci olarak yaygın kullanılan C Reaktif Protein (CRP) ile karşılaştırıldığında bu süreler son derece kısadır. CRP kanda yaklaşık ilk olarak 12. saatte saptanabilmekte ve 20-72 saatte en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Enfeksiyonun tedavi edilmesinden sonra kan seviyelerinin düşmesi de yükselmesine paralel prokalsitoninde daha hızlı olmaktadır⁽¹⁵⁾. Bu özellikler prokalsitoninin yoğun bakımlarda sepsisli olgularda erken dönem belirteç olarak ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmasını sağlamaktadır.

NEK gelişiminin nasıl gerçekleştiği yönündeki en önemli ve günümüzde en çok kabul gören hipotez; stres, hipoksiye bağlı intestinal iske mi, enfeksiyon ve prematürite gibi etkenlerin bir veya birden fazlasının bir araya gelerek mukozal bariyerde bozulmaya yol açmasıdır⁽²⁾. Mukozal bariyerde bozulma bakteri ve endotoksinlerin translokasyonuna ve daha sonra da sitokinlerin salınımına neden olur. Bundan sonraki aşama sitokinlerin sepsis ve intestinal hasara yol açması ile sonlanır. Endotoksinlerin bozuk mukozal bariyerden geçerek siklooksijenaz 2 salınımını artırdığı ve enflamatuvar yolağı harekete geçirdiği bugün bilinmektedir⁽⁶⁾. İske mi ve sonrasında gelişen bakteriyel translokasyon ve sitokinlerin salınması prokalsitonin serum düzeylerinin iske mi sürecinde tanı ve izlem konusunda yarar sağlayabileceği düşüncesini uyandırmaktadır.

Bağırsağın enfektif ve enflamatuvar durumlarında gerek erişkin hastalarda gerekse de deneysel çalışmalarda prokalsitonin etkinliği giderek artan oranlarda gösterilmektedir. Bu konudaki ilk bildirilerden olan Çevikel ve ark.'nın⁽⁴⁾ çalışmalarında, strangulasyonlu ve strangulasyonsuz intestinal obstrüksiyon oluşturulan ratların serum prokalsitonin seviyeleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda örneğin şiddetli akut pankreatitli olguların intestinal permeabilite değişiklikleri ile serum prokalsitonin düzeyi arasında

güçlü bir ilişki bulunmuştur ve prokalsitoninin akut pankreatitte bağırsak bariyer disfonksiyonunun erken bir belirteci olduğu gösterilmiştir⁽¹⁾. Ayten ve ark.⁽³⁾ ise, Çevikel ve ark.'nın⁽⁴⁾ yaptığı çalışmaya çok benzer bir çalışmayı çekum yerine ileumda yapmış ve ince bağırsak obstrüksiyonunda prokalsitoninin belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Hatta strangülasyon süresi uzadıkça serum prokalsitonin düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı yükseldiğini göstermişlerdir. Bir diğer ilginç çalışma da açık abdominal aorta cerrahisi yapılan olgularda prokalsitoninin iskemik kolit varlığını dışlamada yüksek değere sahip olduğunun öne sürülmesidir⁽¹⁰⁾. İske mik kolit varlığını göstermede prokalsitonin % 100 hassas bulunmuştur.

Çalışmamızda da bağırsak iskemisi sonrası prokalsitonin serum düzeyi yükselmektedir. Ayten ve ark.⁽³⁾ strangülasyon süresine göre prokalsitonin serum düzeyleri arasındaki farkı anlamlı bulurken, çalışmamızdaki iske mi modelinde dokunun maruz kaldığı iske mi sürelerine göre ölçülen prokalsitonin serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Denekler histolojik bulgulara göre yeniden gruplandırıldığında da yeni oluşturulan 5 grubun serum prokalsitonin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Çalışmamız göstermektedir ki: 1) tek başına anestezi ve laparotomi prokalsitonin serum düzeyini etkilememektedir, 2) intestinal iske mi prokalsitonin düzeyinde kontrol gruplarına göre anlamlı bir yükselme sağlamaktadır, 3) iske mi süresi, serum prokalsitonin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadır, 4) deneklerin bağırsak hasarına göre histolojik olarak yeniden gruplandırılması sonrasında iske mi derecesi ile prokalsitonin serum seviyesi arasında bir fark bulunmamaktadır. Sonuç olarak, prokalsitonin bağırsak iskemisinden sonra erken dönemde yükselmektedir. Bununla birlikte iske mi derecesi ile prokalsitonin serum düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanamadığından - aort cerrahisi geçiren hastalarda kolon iskemisi için negatif tarama testi olarak kullanılması gibi - bağırsağın iskemik durumlarında negatif tarama testi olarak kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür. Bu sonuçlarla çalışmamız prokalsitonin ile intestinal iske mi arasında bir ilişkinin varlığını göstermiştir. Bu ilişkinin geniş klinik serilerle gösterilmesi gereklidir.

Kaynaklar

1. Ammori BJ, Becker KL, Kite P, et al: Calcitonin precursors: early markers of gut barrier dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 27:239, 2003
2. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, et al: The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* 27:124, 2007
3. Ayten R, Dogru O, Camci C, et al: Predictive value of procalcitonin for the diagnosis of bowel strangulation. *World J Surg* 29:187, 2005
4. Çevikel MH, Özgün H, Boylu Ş, et al: İntestinal obstrüksiyon modelinde bakteriyel translokasyon ve serum prokalsitonin düzeyleri. *Çağdaş Cerrahi Dergisi* 17:8, 2003
5. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al: Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1605, 1994
6. Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, et al: Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 14:49, 2005
7. Kimura Y, Pierro A, Eaton S. Glutathione synthesis in intestinal ischaemia-reperfusion injury: effects of moderate hypothermia. *J Pediatr Surg* 44:353-7, 2009
8. Lee JS, Polin RA: Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 8:449, 2003
9. Meisner M: Procalcitonin: A new, innovative infection parameter. *Biochemical and Alinical Aspect*. 3. baskı, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag 2000
10. Nagata J, Kobayashi M, Nishikimi N, et al: Serum procalcitonin (PCT) as a negative screening test for colonic ischemia after open abdominal aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 35:694, 2008
11. Nowicki PT. Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how. *Semin Pediatr Surg* 14:152-8, 2005
12. Schneider HG, Lam QT: Procalcitonin for the clinical laboratory: a review. *Pathology* 39:383, 2007
13. Stefanutti G, Pierro A, Vinardi S, Spitz L, Eaton S. Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock* 24:159-64, 2005
14. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, et al: Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 34:1996, 2006
15. van Rossum AM, Wulkan RW, Oudesluys-Murphy AM: Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect Dis* 4:620, 2004.

Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından mali olarak desteklenmiştir.