

Peritonit oluşturulan sıçanlarda high mobility group box-1 ve tümör nekroz faktör-alfa inhibisyonunun barsak morfolojisi ve motilite üzerine etkisi

Burçin TUŞTAŞ AY, Dinçer AVLAN, Ayşe POLAT, Lülüfer TAMER, Kansu BÜYÜKAFŞAR, Selim AKSÖYEK

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi, Patoloji, Biyokimya, Farmakoloji Anabilim Dalları, Mersin

Özet

Amaç: Bu deneysel çalışmada, peritonitte gelişen ileusun fizyopatolojisinde inflamasyonun erken medyatörü Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) ve geç medyatörü High Mobility Group Box-1 (HMGB-1)'in rolü ve bu medyatörlerin inhibisyonunun barsak morfolojisi ve motilitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem: Çalışmada her birinde 8 Wistar Albino cinsi erişkin sıçan içeren 4 grup oluşturuldu. Kontrol grubuna laparotomi, peritonit grubuna laparotomi sonrası, çekum ligasyonu ve perforasyonu uygulandı. Etanercept grubuna peritonit oluşturulduktan 1 ve 4 saat sonra intraperitoneal (i.p.) 8 mg/kg/doz etanercept uygulandı. Etil pirüvat grubuna ise peritonitten 12 ve 24 saat sonra i.p. 40 mg/kg/doz etil pirüvat uygulandı. Hayvanlardan 36 saat sonra alınan ileum örneklerinde biyokimyasal incelemelerle doku malondialdehit (MDA) ve myeloperoksidaz (MPO) düzeyleri, kan örneklerinde TNF- α düzeyleri ölçüldü. Histopatolojik incelemelerde ışık mikroskobu ile ileum duvarındaki hasar Chiu skorlaması ve semikantitatif skorlama ile değerlendirildi. Organ banyosu ile ileumun elektriksel uyarı, potasyum klorür (KCl) ve karbakole (CCh) verdiği kasılma yanıtları incelendi.

Bulgular: Peritonitte artan serum TNF- α düzeylerinin etanercept grubunda, doku MDA ve MPO seviyelerinin hem etanercept hem de etil pirüvat gruplarında önemli ölçüde azaldığı saptandı. Histopatolojik değerlendirmede peritonitin barsak duvarında ciddi hasara ve inflamatuvar değişikliklere yol açtığı, etanercept ve etilpirüvat uygulamasının peritonitin neden olduğu bu hasarı anlamlı şekilde azalttığı saptandı. Organ banyosunda ileal dokulara elektriksel uyarı verildiğinde etanercept grubunda kasılma yanıtlarının güçlendiği görüldü. Yüksek doz KCl'e verilen kasılma yanıtlarının etil pirüvat grubunda, kümülatif CCh uygulamasına verilen kasılma yanıtlarının ise etanercept grubunda düzeldiği izlendi.

Sonuç: Peritonitte ortaya çıkan ileusun nedeni olan barsak doku hasarı ve bozulan motilite değişikliklerinde inflamasyonun iki ana medyatörü olan TNF- α ve HMGB-1 önemli bir role sahiptir. Bulgular her iki sitokinin değişik yollar ve mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmaları açıklamaya yönelik yapılacak çalışmalar bu sitokinlerin inhibisyonunun gelecekte tedavide kullanılabilmesine imkan sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Peritonit, ileus, TNF- α , HMGB-1, etanercept, etil pirüvat

Summary

The effect of inhibition of high mobility group box-1 and tumor necrosis factor alpha on intestinal morphology and motility in rats with peritonitis

Aim: In this experimental study; the role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) which early mediator and high mobility group box-1 (HMGB-1) which late mediator of the inflammation in the pathophysiology of the ileus and the effects of inhibition of this mediators were investigated on intestinal morphology and motility during peritonitis.

Materials and Methods: The rats were assigned four groups including eighth rat. While laparotomy was performed the control group only, cecal ligation and puncture was performed in the peritonitis after laparotomy. Etanercept (8 mg/kg.) was applied via intraperitoneal (IP) injection in the etanercept group on the time of one and four hours after peritonitis. Etylpyruvate was applied IP in fourth group on the time of 12 and 24 hours after peritonitis. Thirtysix hours later, tissue malondialdehyde and myeloperoxidase levels were measured in the ileal samples and TNF- α levels were measured in the blood. In the histopathological evaluation; Chiu scor and semikantitative scor were used for ileal injury by light microscope. The ileal contractions were evaluated with electrical field stimulation, potassium chlorur and carbacahol (CCh) in the organ bath.

Results: TNF- α levels that increased in the peritonitis group were significantly reduced in the etanercept group. Tissue MDA and MPO levels were reduced both etanercept and etylpyruvate groups. It has been determined that peritonitis caused seriously inflammation and the tissue injury on the intestine and etanercept and etylpyruvate applying significantly reduced this changes. When the electrical stimulation was given on the ileal samples, contractions were increased in the etanercept group. The contractions of the ileal samples were improved in the etylpyruvate group with KCl, and in the etanercept group with cumulative CCh.

Conclusions: TNF- α and HMGB-1 have an important role on the intestinal injury and reduced motility with peritonitis. These data shown that both cytokine have effect by different mechanisms and path ways in this process. More studies to explain the mechanisms allow the inhibition of these cytokines could use the treatment in the future.

Key word: Peritonitis, ileus, TNF- α , HMGB-1, etanercept, etyl pyruvate

Giriş

Günümüzde tıbbi bakım ve tedavilerdeki gelişmelere rağmen peritoneal sepsis, yüksek mortalite ve morbidite oranı ile klinisyen ve araştırmacılar için sorun olmaya devam etmektedir. Peritonit, viseral ve/veya paryetal peritonu içine alan bir inflamasyondur. İnflamasyona sebep olan barsak içeriği, bakteriler, bakteri yıkım ürünleri, polimorfonükleer hücreler ve makrofajlar hızla kan dolaşımına karışarak sistemik inflamatuvar yanıtı ve sepsise neden olurlar.

Peritonda meydana gelen inflamasyona, organizmanın verdiği yanıt, inflamasyonun ortaya çıktığı bölgenin yanı sıra organizmanın tüm sistemlerine ait doku ve hücrelerini etkiler. Bu süreçte gastrointestinal sistem fonksiyonları da özellikle etkilenmektedir. İnflamasyona cevap olarak gastrointestinal sistem düz kaslarında meydana gelen değişikliklerin klinik yansımaları olan ileus tablosu, barsak lümeninde staz oluşturarak bakteri içeriğinin artmasına, bu artış da bakteriyel translokasyona ve sepsis-ileus-sepsis kısır döngüsüne neden olmaktadır. Her ne kadar sepsiste görülen motilite bozukluğunun mekanizması tam olarak anlaşılammış olsa da, gastrointestinal düz kasların kasılma fonksiyonunda bozulma ile ilişkili olabilir (26).

Sistemik inflamasyonun patofizyolojisinde sitokin kaskadı hayati öneme sahiptir. TNF, interleükin (IL)-1 β , HMGB-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterize sepsiste, sitokinler doku hasarını sınırlamak için lokal koagülasyonu aktive edici yararlı inflamatuvar yanıtı tetikler. Ancak proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi, immün yanıtın normal düzenlenmesi ile üstesinden gelinebilecek orijinal uyarıdan tehlikeli hale gelerek patolojik inflamatuvar bozukluk oluşturabilir (29). Sepsiste, etkilenen sistemlerden biri olan barsaklarda immün yanıtı aracılık eden sistem, barsak ilişkili lenfoid dokudur (gut-associated lymphoid tissue, GALT). GALT'da yer alan makrofajların aktivasyonu inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin salınması ile inflamatuvar kaskad başlar. Bu inflamatuvar ortam, dolaşımdaki lökositlerin birikimi ve lökosit kaynaklı maddelerin salınımı ile sonuçlanır (19). İntestinal muskularis propriada, proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesiyle inflamatuvar lökositler muskuler tabakaya ekstrasvaze olur. Salı-

nan medyatörlerin çoğu intestinal düz kasların kontraktilesini direk inhibe ederek ileusa neden olur (19,10).

İnflamatuvar sitokinlerden biri olan TNF- α 'nın asıl kaynağı aktive olmuş mononükleer fagositlerdir ve erken sitokin yanıtına aracılık eder. İnflamasyonun başlamasına neden olan herhangi bir uyarıdan sonraki dakikalar içinde TNF- α salınımı başlar, 1 saatte pik yapar ve 3-4 saat sonra salınım durur (29). TNF- α düzeylerindeki kısa süreli yükselme, ardışık sekonder reaksiyonlara yol açar ve bunların etkileri, TNF- α serumdan kaybolduktan uzun süre sonra da devam eder. Nükleer transkripsiyon faktörü olarak bilinen HMGB-1'in inflamasyonun geç medyatörü olduğu bildirilmiştir (31) ve inflamasyona yanıt olarak monosit ve makrofajlardan aktif, nekrotik hücrelerden de pasif salınımı söz konusudur. HMGB-1'in salınımı, ekzojen bakteriyel endotoksin veya endojen proinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1 β) stimülasyonu ile doz ve zaman bağımlı olarak gerçekleşir. Endotoksin verilmesinden 8 saat sonra ilk olarak serumda tespit edilir ve 16-32 saate kadar artarak plato düzeyine ulaşır. Peritonit inflamatuvar bir süreç olup peritonite eşlik eden parolitik ileusta da başta TNF- α olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin lokal ve sistemik olarak etkili olabileceği ileri sürülmekle birlikte HMGB-1'in nasıl bir rol oynadığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (4,11,5).

Bu çalışmada çekum ligasyonu ve perforasyonu yöntemi ile oluşturulan peritonit modelinde ortaya çıkan barsak motilite değişikliklerinin fizyopatolojisinde TNF- α ve HMGB-1'in rolü ve bu sitokinlerin inhibisyonunun barsak motilitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma fakülte etik kurulu onayı (B.30.2.ME-Ü.0.01.00.00/3156) alındıktan sonra deneysel tıp araştırma merkezi deney hayvanları laboratuvarı ve Farmakoloji ana bilim dalı Laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmada deneysel araştırma laboratuvarından temin edilen 32 adet Wistar Albino tipi, ortalama 132g ağırlığında, erişkin sıçan kullanıldı. Sıçanların beslenmesi aynı gıdaları içeren diyetler ve su ile sağla-

nıp 24°C olan odalarda saklandı.

Deney Modeli ve gruplar

Çalışmada peritonit oluşturmak için, daha önce Baker ve arkadaşları tarafından tanımlanan, çekum ligasyonu ve perforasyonu modeli kullanıldı. Bu model 24 saat içinde sepsise neden olan, hiperdinamik ve normotansif peritonit modelidir. Cerrahi girişim öncesi hayvanlara anestezi ajan olarak 100mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar) (Eczacıbaşı İlaç Sanayi, İstanbul, TÜRKİYE) intramuskuler (i.m.) uygulandı. Sıçanlar anestezi altında supin pozisyonda yatırılıp tespit edildi ve abdominal bölge kılıfları traş edildi. Cerrahi saha povidon-iyot (Batticon) ile temizlendi, steril örtü ile kapatıldı ve 2 cm orta hat insizyon ile laparotomi yapıldı. Çekum, bulunup serbestleştirilerek 4/0 ipek sütürlü dolaşımı bozulmamacak ve barsak geçişini engellemeyecek şekilde bağlandı. Çekumun antimezenterik yüzünde 22 G iğne ile 1 cm aralıklarla 2 farklı delik açıldı. Delinen yerlerden bir miktar barsak içeriği nazikçe dışarı alındıktan sonra, çekum tekrar peritoneal kaviteye yerleştirildi ve insizyon iki kat üzerinden kapatıldı. Hayvanlar daha sonra 36 saatlik bekleme için tekrar kafeslerine alındı. Operasyondan sonra su ve beslenme serbest bırakıldı.

Sıçanlar gelişigüzel dört gruba ayrıldı.

- Kontrol (sham) grubu (n=8):** Anestezi verilen ve laparotomi yapılan sıçanların çekumuna herhangi bir ligasyon ve perforasyon yapılmadan manipulasyon uygulandı.
- Deney (peritonit) grubu (n=8):** Anestezi verilen ve laparotomi yapılan sıçanların çekumuna ligasyon ve perforasyon uygulandı.
- Etanercept grubu (n=8):** Peritonit oluşturulan sıçanlara peritonitten 1 ve 4 saat sonra i.p 8 mg/kg/doz etanercept (Enbrel-Wyeth İlaçları A.Ş. USA) uygulandı.
- Etil pirüvat grubu (n=8):** Peritonit oluşturulan sıçanlara peritonitten 12 ve 24 saat sonra i.p. 40 mg/kg/doz etil pirüvat (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) uygulandı.

Hayvanlara 36 saat sonra eski insizyon yerinden re-laparotomi yapıldı. Histopatolojik, biyokimyasal inceleme ve farmakolojik çalışma için doku örnekleri

elde etmek amacıyla çekumun 5 cm proksimalinden 10 cm.'lik ileum segmenti çıkarıldı. Daha sonra yapılan sternotomi ile kalbden biyokimyasal inceleme için 5 ml kan örneği alındı. Bu uygulama ile aynı zamanda hayvanın öldürülmesi sağlandı.

Serum TNF- α ölçümü için kan örnekleri 5000 rpm devirde 8 dakika ve +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant çalışma için alındı. Doku MDA ve MPO ölçümü için alınan ileum örnekleri çalışma yapılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Serum TNF- α Ölçümü

Serumda TNF- α düzeyleri "Biosource Rat TNF- α kit; lot. no: KRC3011" ile solid faz sandöviç Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. Tabak içindeki kuyucuklar, TNF- α için spesifik antikorlar ile kaplandı. Standartlar, kontroller ve örnekler kuyucuklara eklendikten sonra üzerlerine biotinlenmiş ikinci bir antikor eklendi. Birinci inkübasyon sırasında TNF- α antijenleri, immobilize antikorlara ve biyotinlenmiş antikorlara bağlandı. Ortamdaki fazla antikorların yıkama ile uzaklaştırılmalarından sonra streptavidin-peroksidaz enzimi eklendi. İkinci inkübasyon ve yıkama sonrasında bağlanmayan enzimler ortamdaki uzaklaştırıldı. Üzerlerine, enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solusyonu eklendi. Oluşan rengin absorbanstı, örnekte bulunan TNF- α konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Sonuçlar standartlardan oluşturulan konsantrasyon-absorbans eğrisinden pg/ml olarak hesaplandı.

Doku Malondialdehid (MDA) Ölçümü

Doku lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılan MDA düzeyleri, Yagi ve ark.'nin geliştirdikleri yöntemeye göre saptandı. Aerobik şartlarda doku homojenatının pH:3.4'de tiyobarbitürik asit ile 95°C'de inkübasyonu sonucunda, lipid peroksidasyonu varsa sekonder bir ürün olarak MDA oluşur ve MDA tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu renk şiddetinin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonu saptanır. Çalışmada da, alınan ve -20°C'de saklanmış olan ileum örnekleri çözüldü, tüm dokular tartıldı ve 50 mg dokuya 500 μ L 0.15 M KCl eklenerek ho-

mojenize edildi. Örneklerin hazırlanma aşamasında, solüsyonlar 95°C'de 30 dk. inkübe edildi. Daha sonra musluk suyunda soğutuldu ve 1 ml distile su eklendi, 14:1 oranında hazırlanan n-bütanol:piridin solüsyonundan 5 ml eklenerek vortekste karıştırıldı. 4000 rpm devirde 15 dk. santrifüj edildi. Yaklaşık 200 µ supernatant alınarak örnek, kromatografik ayırım için cihaza verildi. Sonuçlar, aynı yöntemle çalışılarak değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standart eğri yardımı ile nmol/ml olarak hesaplandı.

Doku Myeloperoksidaz (MPO) Ölçümü

Nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınan MPO enzimi, dokulardaki nötrofil aktivasyonunun dolaylı göstergesi olarak kullanılmaktadır. Doku örneklerindeki MPO düzeyleri, Golowich ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemle göre saptandı. Çalışma için -20°C'de saklanmış olan ileum örnekleri çözüldü ve tartıldı. Dokular, 300 mg doku içine 5 ml olarak hesaplanan 0.02 M EDTA (pH 7.4) konularak 60 saniye homojenize edildi. Homojenat 20000 rpm devirde, +4°C'de 15 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 0,05 M KPO₄ (pH:6) tamponu içinde % 0,5 Hekza Adezil Trimetil Amonyum Bromid (HETAAB) hazırlandı. Elde edilen pellet, 1,5 ml HETAAB ile tekrar homojenize edildi. Homojenat 20000 rpm devirde, +4°C'de 15 dk. tekrar santrifüj edildi ve süpernatant çalışma için alındı.

Doku MPO ölçümü, hidrojen peroksidin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianosidini redüklemesi ve redükte o-dianosidin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanılarak yapıldı. Sonuçlar spesifik aktivite, ünite/gr doku olarak hesaplandı.

Histopatolojik Değerlendirme

İleumdan alınan örnekler % 10' luk nötral formaldehid içeren kaplar içine konuldu. Bir gece tespit işleminin ardından dokular sırasıyla alkol, ksilol ve solüsyonlarında bekletilerek rutin işleme tabi tutuldu. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 µ kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilen eosin (H-E) histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelendi. Fotoğraflama işlemi Nikon dijital kamera, DS-L1 ile yapıldı. Barsak dokusunda hasarı değerlendirmek

için Chiu ve ark. tarafından tarif edilen histolojik mukozal hasar skalası kullanıldı. Buna göre;

Grade 0: Normal mukozal villus

Grade 1: Kapiller konjesyon ile birlikte subepitelyal boşluk oluşumu

Grade 2: Subepitelyal boşlukta genişleme ile birlikte epitelde orta derecede kalkma

Grade 3: Epitelde ileri derecede kalkmalar, yer yer epitelde soyulma ve lamina propriada konjesyon, villöz uçlarda ülserasyon

Grade 4: Epitelin tamamen soyulması ile birlikte lamina propria ve dilate kapillerlerin açığa çıkması

Grade 5: Lamina proprianın ortadan kalkması, hemoraji ve ülserasyon

Chiu skorlaması temelde sadece epitel hasarını değerlendirdiğinden ek bir skorlama sistemine gerek duyuldu. Yeni skorlamaya göre de, sırasıyla villusları döşeyen epitel hasarı, lamina propria ve serozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu, lamina propriada ödem ve konjesyon değerlendirildi. Belirtilen tüm parametreler için; 0 normal, 1 hafif derecede, 2 orta derecede ve 3 şiddetli olarak semikantitatif derecelendirme sistemi kullanıldı. Her örnek için yapılan puanlamalar, toplam skor olarak hesaplandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Her iki skorlama sistemi için de, her grupta ortaya çıkan değişikliklerin puanı, değişiklik olan hayvan sayısı ile çarpıldı ve gruptaki hayvan sayısına bölünerek o grubun ortalama hasar skoru bulundu.

Organ Banyosu

2 cm uzunluğundaki tam kat ileum örnekleri, içinde Krebs solüsyonu (mM/L olarak NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24, glukoz 11, MgSO₄ 1.2, Na₂EDTA 0.01) bulunan, % 95 O₂ ve % 5 CO₂ ile gazlandırılan organ banyosuna sirküler kas yönünde asıldı. Tüm deneylerde banyo sıcaklığı 37°C'de, pH'ı 7.4'de sabit tutuldu. 10 ml'lik organ banyosunda bütün preparatlara 1 gr ön gerim uygulandı ve bir saatlik dengelenme süresi boyunca 20 dakikada bir Krebs solüsyonuyla yıkandı. Dokuların tonusundaki değişiklikler "force displacement transducer" (COMMAT, Ankara, Türkiye) aracılığı ile izometrik olarak ölçüldü ve Biopac Kayıt Sistemi (Biopac Systems Inc., CA, USA) ile veriler bilgisayar ortamında elde edildi.

Çalışma gruplarından alınan ileum dokuları 50 mM KCl ile muamele edildi ve kasılma cevapları gram kasılma olarak ifade edildi. Dokuların dinlendirilmesinden sonra 40 volt, 0.5 msn, ardışık 0.5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz elektriksel uyarı, ardışık 10 mM, 20 mM, 40 mM ve 80 mM KCl, kümülatif (10-9-10-4M) karbamilkolin klorür (Karbakol) A-CCCh ayrı ayrı uygulandı. Uygulamalar arasında Krebs solusyonu ile yıkanan ve dinlendirilen dokuların kasılma cevapları değerlendirildi. Sonuçlar, tüm gruplarda gram kasılma/yaş doku ağırlığı olarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerin dağılımlarının normal olup olmadıklarını değerlendirmek için Tek Örneklem Kolmogorov Smirnov testi kullanıldı ve tüm örneklerin normal dağılım gösterdikleri sonucuna ulaşıldı. TNF- α , MDA, MPO ve organ banyosu çalışmalarına ait değerlerin gruplar arasında anlamlı bir farklılık gösterip göstermedikleri Tek Yönlü Varyans Analizi (one-way ANOVA) ile test edildi, farklılık olan alt grupların belirlenmesinde ise Tukey testinden yararlandı. Histopatolojik değerlendirmede elde edilen skorlar bakımından gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. İstatistik analizlerde $p < 0.050$ ise test sonucu anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Biyokimyasal analiz sonuçları

Serum TNF- α düzeyleri değerlendirildiğinde peritonit grubunda TNF- α 'nın kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ve etanercept grubunda bu değerlerin kontrol grubuna yakın değerde olduğu saptandı. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.

($p=0.001$) (Tablo 1).

Doku MDA ve MPO seviyelerine bakıldığında, peritonit grubunda kontrol grubuna göre hem MDA hem de MPO'da artış tespit edildi. MPO seviyelerindeki artış istatistiksel olarak da anlamlı idi. Etanercept ve etil pirüvat verilen her iki grupta da hem MDA, hem MPO düzeyleri önemli ölçüde düşük bulundu. Özellikle etil pirüvat grubundaki MPO değerleri peritonit grubuna göre istatistiksel olarak da anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 1).

Histopatolojik sonuçlar

İleum dokularından alınan kesitlerin H-E boyaması ışık mikroskopik incelemelerinde; kontrol grubunda düzenli villüs yapısı izlenirken peritonit grubunda epitelde ileri derecede kalkmalar, yer yer soyulma, lamina propria konjesyon ve serozada nötrofil infiltrasyonu izlendi (Resim 1).

Etanercept ve etil pirüvat gruplarında lamina propria nötrofil infiltrasyonu, subepitelyal genişleme ile birlikte epitelde orta derecede kalkma izlendi (Resim 2, Resim 3). Bu iki grupta gözlenen histopatolojik değişiklikler her iki skorlama sistemine de paralel olarak peritonit grubuna oranla önemli ölçüde daha azdı.

Chiu skorları bakımından gruplar değerlendirildiğinde, kontrol ile peritonit grupları ($p=0.011$) arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık varken diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Barsak duvar hasarı skorları bakımından gruplar arasında farklılık saptandı ($p=0.001$), kontrol ile peritonit grupları ($p=0.001$) ve peritonit ile etil pirüvat grupları ($p=0.039$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık varken diğer gruplar arasında önemli bir farklılık izlenmedi (Şekil 1).

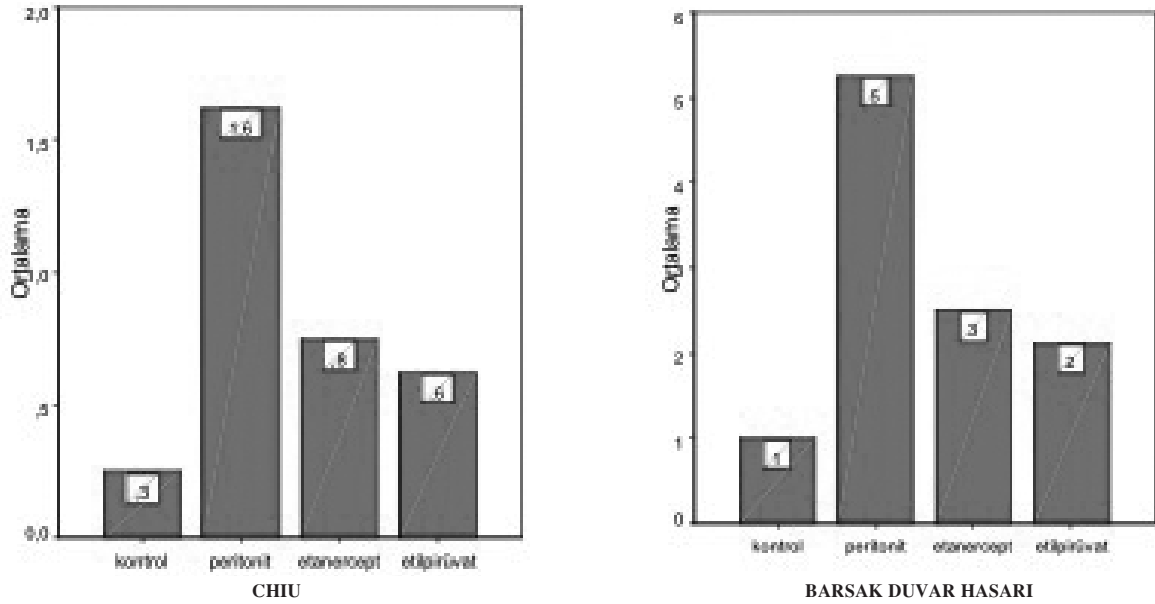
Tablo 1. Serum TNF- α , doku MDA ve MPO düzeyleri.

Değişken	Kontrol	Peritonit	Etanercept	Etil Pirüvat	P
TNF- α (pg/ml)	19.94 \pm 4.81	55.31 \pm 9.35 ^a	22.22 \pm 3.67 ^b	35.05 \pm 3.93	0.001
MDA (nmol/ml)	29.66 \pm 1.10	40.62 \pm 6.32	31.69 \pm 1.50	29.10 \pm 0.82	0.072
MPO (ünite/gr)	0.14 \pm 0.01	0.30 \pm 0.04 ^c	0.23 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02	0.005

^a $p=0.001$ TNF- α düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiştir.

^b $p=0.003$ Peritonit ile yükselen TNF- α etanercept ile önemli oranda düşmüştür.

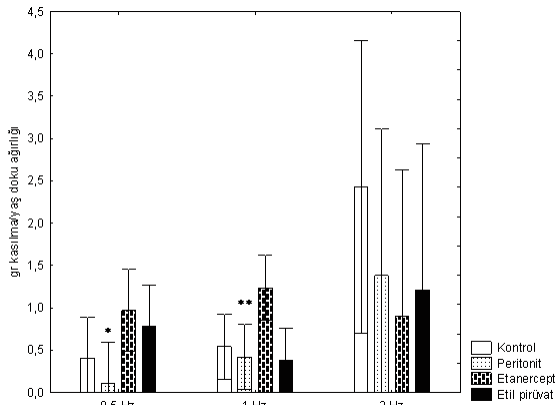
^c $p=0.004$ Peritonit MPO düzeylerini yükseltmiştir.



Şekil 1. İleumda Chiu ve barsak duvar hasarı skorlama ortalamalarının gruplara göre dağılımı. Peritonit hem ileum mukozasında hem de tüm barsak duvarında inflamatuvar hasara neden olmuştur. Etanercept ve etil pirüvat uygulaması ile bu hasarlanma anlamlı ölçüde azalmıştır.

Organ banyosu sonuçları

Elektriksel uyarı verildiğinde kontrol grubundaki normal ileum dokusunda frekans arttıkça dokunun verdiği kasılma yanıtının arttığı, peritonitin bu yanıtı değiştirmedeği ancak tüm frekanslarda peritonit grubunda kasılma yanıtının azaldığı görülmüştür. Etanercept verilen grupta kasılma yanıtının 0.5 ve 1 Hz frekansta güçlendiği görülmüştür. Etil pirüvatın elektriksel uyarı ile kasılma üzerine anlamlı bir etkisi saptanmamıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Elektriksel uyarı kasılma yanıtları. Etanerceptin bozulan kasılma yanıtlarını arttırdığı izlenmektedir. (Tukey, * $p=0.005$, ** $p=0.024$ etanercept grubu ile karşılaştırıldığında)

KCl ile kasılma yanıtları değerlendirildiğinde; 40 ve 80 mM gibi yüksek konsantrasyonlarda peritonit grubunda kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ve etil pirüvat grubunda bu azalmanın anlamlı şekilde düzeldiği saptanmıştır (Şekil 3).

Kümülatif CCh uygulamasında peritonitte bozulan kasılma yanıtı, etanercept verilen grupta tersine dönmüş, ancak etil pirüvat verilen grupta etkilenmemiştir (Şekil 4).

Maksimum kasılma yanıtının % 50'sini oluşturabilmesi için gerekli CCh dozunun (EC50) peritonit grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak da anlamlı derecede yüksek olduğu, etanercept uygulaması ile EC50 değerinin önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir (Tablo 2).

Tartışma

Peritonit, batin içi organlarda şiddetli lokal hasarla birlikte sistemik etkileri de olan, peritonun inflamasyonu ile karakterize klinik tablodur (12,13). Batında distansiyon, ileus, şok, multiorgan yetmezliği gibi geniş klinik spektruma sahip bu süreçte, en çok etki-

lenen batın içi organ barsaklar olup düz kas kasılma fonksiyonlarının da bozulduğu gösterilmiştir (19). Peritonitte görülen bu geniş klinik tablodan lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtın sorumlu olduğu bilinmektedir (19,12,13,16,18).

Peritonitin lokal ve sistemik etkilerini araştırmak için bizimde çalışmada kullandığımız, Baker tarafından tanımlanmış çekum ligasyonu ve perforasyonu, insanlardaki peritonit ve sepsisin klinik semptomatolojisini en yakın taklit eden, 24 saat içinde sepsise neden olan, hiperdinamik ve normotansif peritonit modelidir (2,6,33). Kaya ve ark.'nın çalışmasında çekum ligasyonu ve perforasyonu ile oluşturulan deneysel peritonitte ileal kontraksiyonların bozulduğu gösterilmiştir (12). Bizim çalışmamızda da, bu modelin literatürde bildirilenlerle benzer olarak deneysel peritonit ve sepsis oluşturma ve intestinal motilite çalışması için uygun bir model olduğu görülmüştür.

Peritonitte ortaya çıkan lokal ve sistemik organ hasarından TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve siklooksijenaz ürünleri gibi değişik proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi sorumludur (12,13). TNF- α 'nın inflamasyonun erken yanıtlarından sorumlu olduğu, inflamatuvar uyarıdan sonra dakikalar içinde salınmaya başladığı, 1. saate pik yapıp 3-4 saat sonra salınımının durduğu bilinmektedir (29). Lodato ve ark. ratlarda lipopolisakkaritle indüklenen endotoksemi modelinde ileal kas kontraktilesini değerlendirmişler ve endotoksinin TNF ve IL-1 yapımını uyardığını, bu sitokinlerin ileal NOS aktivitesini arttırarak kontraktiletiyi azalttığını ve TNF- α inhibisyonunun IL-1'e göre kontraktiletiyi korumada daha efektif olduğunu bildirmişlerdir (15). Çalışmamızda peritonit grubunda serum TNF- α düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. TNF- α 'daki bu artışa peritonitin neden olduğu sistemik inflamatuvar yanıt ve lokal olarak barsak dokusundaki inflamatuvar reaksiyonun yol açtığı düşünülmektedir. Doku MPO seviyesindeki artışta barsak duvarında nötrofil birikiminin ve ciddi inflamasyonun göstergesidir. Aynı zamanda doku MDA seviyelerinde tespit edilen artış barsak duvarındaki lokal inflamatuvar reaksiyonun hücre hasarına neden olduğunun göstergesidir ve bu sonuçlar histopatolojik olarak da desteklenmiştir.

Etanercept, suda çözünür TNF- α reseptör füzyon

proteini olup TNF- α 'yı bağlar ve kendi reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek etki gösterir (1,11). Çalışmada önceden yapılmış deneysel çalışmalarda toksik olmayan ancak etkisinin gösterildiği 8 mg/kg dozda uygulanmıştır (8,20). Etanercept grubunda TNF- α düzeylerinin kontrol grubu ile korelasyon gösterdiği, ileal dokulardaki MDA ve MPO düzeylerinin düşük olduğu, histopatolojik incelemede peritonit grubunda ileum duvarında gözlenen ödemin ve konjesyonun, nötrofilik infiltrasyonun ve epitel hasarının azaldığı, ileumun elektriksel uyarı ile ve CCh uygulaması ile kasılma yanıtlarının düzeldiği saptandı.

İnflamasyonun geç medyatörlerinden olan HMGB-1'in, endotoksemiye 8. saatte, çekum ligasyonu ve perforasyonu sonrasında 18. saatten itibaren serumda saptandığı ve 24-72. saate kadar yüksek seyrettiği bildirilmiştir. Hücre içi transkripsiyon faktörü olarak tanımlanan bu molekül, makrofajlardan TNF- α ve IL-1, salınımını aktive eder ve nötrofillerin düz kas hücrelerine kemotaksisi arttırıcı etki gösterir (32,30,34). HMGB-1'in endotel, düz kas hücresi, monosit, makrofaj, nöronlar ve birçok malign hücrede bulunan reseptörler aracılığı ile barsak duvarında da düz kas hücreleri aracılığı ile inflamatuvar olayları tetiklediği düşünülmektedir (7). Yapılan çalışmalarda, HMGB-1'in makrofajlardan TNF- α salınımını uyardığı gösterilmiştir (34,14), Fiuza ve ark. ise endotel hücre kültüründe HMGB-1'in lökosit adezyon moleküllerinin upregulasyonunu, nötrofil ve monositlerden kemokinlerin sekresyonunu, proinflamatuvar sitokinlerin yapımını, fibrinolitik düzenleyicilerinin salınımını indüklediğini ve reseptör ekspresyonunu arttırarak proinflamatuvar etkilerini gösterdiğini bildirmişler (7). Etil pirüvat HMGB-1'in salınımını inhibe eden, endojen bir metabolit olan pirüvik asitin basit alifatik esteridir, HMGB-1 dışında NO, TNF- α , siklooksijenaz-2 (COX-2), IL-6 gibi proinflamatuvar medyatörlerin salınımını azaltarak antiinflamatuvar etkisini göstermektedir (21). Ulloa ve ark., endotoksemi ve sepsiste etil pirüvatın hücre içi nükleer faktör-KB (NF-KB) ve p38 mitogen activated protein kinaze (MAPK) sinyal yollarını inhibe ettiğini öne sürmüşler ve bu etki ile TNF- α ve HMGB-1 salınımını önlediğini in vitro ve in vivo olarak göstermişlerdir (30). Bir çok çalışmada etil pirüvatın, mezenter iske mi reperfüzyonu ve endotoksemi ile oluşan barsak

mukoza hasarını, mikrovasküler hipoperfüzyonu ve inflamasyonu düzeltici etkisi olduğu raporlanmıştır (28,24,22). Harada ve ark., farelerde barsak manipülasyonu ile oluşturulan ileus tablosunun, laparatomiden önce ve sonra uygulanan etil pirüvat tedavisi ile postoperatif inflamatuvar değişiklikleri azaltılarak düzeltildiğini *in vivo* ve *in vitro* barsak motilitesinin düzeltildiğini göstermişlerdir (10).

Çalışmamızda, HMGB-1'in literatürde bildirilen salınım şeklini ve etil pirüvatın etkisinin gösterildiği en düşük dozu temel alarak ratlara, çekum ligasyon ve perforasyondan sonraki 12. ve 24. saatte 40 mg/kg/doz etil pirüvat uygulandı. Peritonitin neden olduğu serum TNF- α düzeylerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile azalmış olduğu saptandı. Bu azalma etil pirüvatın direk TNF- α ve indirek olarak başta HMGB-1 olmak üzere diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe etmesine bağlı olabilir. Doku MDA ve MPO düzeylerinde anlamlı düşme olduğunu ve bunun literatür verileri ile uyumlu olduğunu gözlemledik. Etil pirüvat, hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin efektif toplayıcısı olan bir bileşiktir. Buna göre antiinflamatuvar özelliklerine ek olarak etil pirüvatın lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar şaşırtıcı değildir (21,25,27). Etil pirüvatın, intestinal doku ve serumda peritonitle artan MDA ve MPO düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (36). Bu çalışmada da etil pirüvat grubunda doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna yakın değerlerde bulunmasını etil pirüvatın bu etkisi ile açıklayabiliriz. Aynı zamanda MPO düzeylerinin de kontrol grubuna yakın seviyelere düşmesi etil pirüvatın başta HMGB-1 olmak üzere diğer proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu ile ortaya çıkan antiinflamatuvar etkilere bağlı olabilir.

Etil pirüvat uygulanan ratlarda ileumda hem mukoza hasarının hemde barsak duvarı hasarının oldukça az olduğu görüldü. Etanercept uygulanan gruba göre daha belirgin düzleme saptanan etil pirüvat grubunda sonuçların istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu ve bulgularımızın literatür verileri ile uyumlu olduğunu gözlemledik. İntestinal mukozal bariyer geçirgenliğinde artışa neden olduğu, nötrofil kemotaksisini artırdığı bilinen HMGB-1'in inhibisyonunun etil pirüvat uygulanan grupta gözlenen histopatolojik bulguların düzelmesinden sorumlu olduğunu düşünmekteyiz. Nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan doku

MPO düzeylerinin etil pirüvat uygulanan grupta azalmış olması bu görüşümüzü desteklemektedir.

Gastrointestinal sistemde kasılma fonksiyonu kolinerjik, nitretrjik, peptiderjik, taşikininerjik yolların oluşturduğu bir harmonidir. Bu harmoni içinde Ach kasılma üzerine uyarıcı etkili iken, NO, VIP inhibitör etki gösterir (17,23). CCh de, muskarinik reseptör agonisti olup incebarsakta klasik uyarıcı etkili nörotransmitterdir (17). Gastrointestinal düz kaslara, düşük frekansta elektriksel uyarı verilmesi, otonom sinirleri uyararak kolinerjik yolak üzerinden kasılmayı sağlar. Organ banyosu deneylerinde kullanılan KCl ise düz kas hücrelerinde voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarını açarak hücre içine Ca⁺² akımını arttırdığı ve kasılmayı uyardığı bilinmektedir (12,13).

Çalışmamızda, gastrointestinal sistem düz kaslarının kasılma mekanizmalarını ve peritonitten etkilenen yolları değerlendirmek amacıyla dokulara elektriksel uyarı, KCl ve CCh verilerek organ banyosu deneyleri yapıldı. Elektriksel uyarı verildiğinde frekans arttıkça dokunun verdiği kasılma yanıtının arttığı ve peritonitte istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte kasılma yanıtlarının azaldığı saptandı. Buna göre peritonitin nöronal cevaplar üzerinden gelişen kasılma üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı ve barsakları innerve eden sinirsel mekanizmalar üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı sonucuna varılabilir. İlginç olarak etanercept verilen grupta kasılma yanıtlarının kontrol grubuna göre güçlendiği görülürken, etil pirüvatın önemli bir etkisi izlenmedi. Kümülatif CCh uygulaması ile yine etanerceptin kasılmayı kontrol grubuna göre güçlendirdiği gözlemlendi. Bu etkinin nedeni olarak etanerceptin CCh reseptörlerinin duyarlılığını ve kolinerjik yolak üzerinden kasılmaya duyarlılığı arttırdığını öne sürebiliriz. Ancak bunu belirleyebilmek için peritonit oluşturmaksızın etanerceptin uygulandığı bir deney modeline ihtiyaç vardır. KCl uygulamalarında ise, peritonitin yüksek doz KCl'e verilen kasılma yanıtlarını anlamlı olarak azalttığı, etil pirüvatın ise bozulan kasılma yanıtlarının düzelttiği görülmüştür. Peritonitte voltaj bağımlı Ca⁺² kanallarının aktivitesinin etkilendiği, düz kas fonksiyonlarının bozulduğu bilinmektedir (12). Bizim çalışmamızda da peritonitte KCl ile oluşan kasılma yanıtlarındaki azalma muhtemelen aynı mekanizma ile oluşmaktadır. Etanerceptin reseptör aracılı kasılmaları güçlendirdiğini, Ca⁺² kanalları üzerinden ge-

lişen kasılmaları etkilemediğini, etil pirüvatın ise Ca^{+2} kanalları üzerinden kasılmaları düzenlediği sonucuna varabiliriz. Elektriksel uyarı, CCh ve KCl uygulamalarına verilen kasılma yanıtları değerlendirildiğinde değişik konsantrasyon ve frekanslara göre her değer istatistiksel olarak anlamlı olmasa da etanercept ve etil pirüvatın ileum kasılma yanıtlarını düzelttiğini söyleyebiliriz. HMGB-1'in inflamasyon sürecinde Ca^{+2} kanallarını etkilediğini, TNF- α 'nın ise parasempatik uyarıyı azalttığını ileri sürebiliriz.

Sonuç olarak peritonitte ortaya çıkan ileusun nedeni olan barsak doku hasarı ve bozulan motilite değişikliklerinde inflamasyonun iki ana mediatörü olan TNF- α ve HMGB-1 önemli bir role sahiptir. Bulgular her iki sitokininin değişik yollar ve mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmaları açıklamaya yönelik yapılacak çalışmalar bu sitokinlerin inhibisyonunun gelecekte tedavide kullanılabilmesine imkan sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Avunduk MC, Avunduk AM, Oztekin E, Baltacı AK, Ozyazgan Y, Mogolkoc R: Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. *Exp Eye Res* 79:357, 2004
2. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE: Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 94:331, 1983
3. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN: Intestinal mucosal lesion in low-flow state. *Arch Surg* 101:478, 1970
4. Czura CJ, Yang H, Tracey KJ: High mobility group box-1 as a therapeutic target downstream of tumor necrosis factor. *J Infect Dis* 15:187 Suppl 2:S391, 2003
5. Fink MP: Ethyl pyruvate: A novel treatment for sepsis and shock. *Minerva anesthesiol* 70:365, 2004
6. Fink MP, Heard SO: Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49:186, 1990
7. Fiuza C, Bvustin M, Talwar S, et al: Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101:2652, 2003
8. Geier A, Zollner G, Dietrich C, et al: Cytokine-independent repression of rodent Ntcp in obstructive cholestasis. *Hepatology* 41:470, 2005
9. Golowich SP, Kaplan SD: *Methods in enzymology*, Aca. Press Inc, vol II, New York, 1955:769
10. Harada T, Moore BA, Yang R: Ethyl pyruvate ameliorates ileus induced by bowel manipulation in mice. *Surgery* 138:530, 2005
11. Hermann GE, Tovar CA, Rogers RC: LPS-induced suppression of gastric motility relieved by TNFR:Fc construct in dorsal vagal complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G634, 2002
12. Kaya TT, Koşluoğlu G, Soydan AS, Arpacık M, Karadas, B: Effects of nimesulide and pentoxifylline on decreased contractile responses in rat ileum with peritonitis. *Eur J Pharmacol* 442:147, 2002
13. Kaya TT, Koşluoğlu G, Karadas B: Effect of peritonitis on gallbladder smooth muscle contractility in guinea pigs. *J Surg Res* 120:219, 2004
14. Li J, Kokkola R, Taibzadeh S, et al: Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med* 9:37, 2003
15. Lodato RF, Khan AR, Zembowicz MJ, et al: Roles of IL-1 and TNF in the decreased ileal muscle contractility induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 276(6 Pt 1):G1356, 1999
16. Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA: The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation. *Shock* 4:193, 1995
17. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, et al: Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* 22:10627, 2002
18. Nieuwenhuijzen GAP, Deitch EA, Goris JA: Infection, the gut and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *Eur J Surg* 162:259, 1996
19. Overhaus M, Togel S, Pezzone MA, Bauer AJ: Mechanism of polymicrobial sepsis-induced ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G685, 2004
20. Roderfeld M, Geier A, Dietrich C, et al: Cytokine blockade inhibits hepatic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and up-regulates matrix metalloproteinase-9 in toxic liver injury. *Liver International* 26:579, 2006
21. Sappington PL, Cruz RJ Jr, Harada T, et al: The ethyl pyruvate analogues, diethyl oxalopropionate, 2-acetamidoadrylate, and methyl-2-acetamidoadrylate, exhibit anti-inflammatory properties in vivo and/or in vitro. *Biochem Pharmacol* 25:1579, 2005
22. Sappington PL, Han X, Yang R, Delude RL, Fink MP: Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated caco-2 enterocytic monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 304:464-476, 2003
23. Serio R, Mule F, Postorino A: Non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory responses to nerve stimulation in rat colonic circular muscle. *Exp Physiol* 77:119, 1992
24. Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP: Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med* 29:1513, 2001
25. Song M, Kellum JA, Kaldas H, Fink MP: Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:307, 2004
26. Spates ST, Cullen JJ, Ephgrave KS, Hinkhouse MM: Effect of endotoxin on canine colonic motility and transit. *J Gastrointest Surg* 2:391, 1998
27. Tawadrous ZS, Delude RL, Fink MP: Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock* 17:473, 2002
28. Uchiyama T, Delude RL, Fink MP: Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med* 29:2050, 2003
29. Ulloa L, Tracey KJ: The cytokine profile: a code for

sepsis. *Trends Mol Med* 11:56, 2005

30. Ulloa L, Ochani M, Yang H, et al: Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 17:12351, 2002

31. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ: HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 15:1768, 2001

32. Wang H, Yang H, Tracey KJ: Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 255:320, 2004

33. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock- a review of laboratory models and a proposals. *J Surg Res* 29:189, 1980

34. Yang H, Ochani M, Li J, et al: Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 6:296, 2004

35. Yagi K: Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. Edited by D.Armstrong. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Plenum Press, New York, 1994: 1-15

36. Zhongguo W, Zhong B: Effect of ethyl pyruvate on peroxidation injury of intestinal mucosa in rats with severe abdominal infection. *Ji Jiu Yi Xue* 18:154, 2006