

# Barsak iskemisi tanısında TNF- $\alpha$ sitokininin yeri

Gökhan KÖYLÜOĞLU, Cem BONEVAL, Tansu SALMAN, Alaaddin ÇELİK

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul

## Özet

Barsak iskemisini infarktüs gelişmeden önce tanımlayabilmek amacıyla birçok özel laboratuvar tetkiki kullanılıyor olmasına rağmen, halen barsak iskemisi tanısı, öykü ve fizik incelemenin yeterli olmaması nedeni ile bir problem olarak karşımızda durmaktadır. Bu deneysel çalışmanın amacı TNF- $\alpha$ 'nın mezenter iskemisi tanısında kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla 63 WHT/ht grubu fare kullanılmıştır. Süperior mezenterik arteri bağlanan A grubu, bir barsak segmentinde mezenterik damar ligasyonu yapılan B grubu ve Sham ameliyatı yapılan C grubu olmak üzere toplam üç grup oluşturulmuş ve 1., 2. ve 3. saatlerde kan alınarak serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ölçülmüştür. En belirgin artış 200 pg/ml ile A grubunda olurken, B grubunda 65 pg/ml olarak ölçülmüştür. Sham ameliyatı yapılan C grubunda ise hiçbir artış saptanmamıştır.

Elde edilen sonuçlara göre serum TNF- $\alpha$  seviyesinin barsak iskemisi süresi uzadıkça ve iskemik segment büyüdükçe arttığı saptanmıştır. Bu durum, klinik çalışmalarla desteklenmesi halinde TNF- $\alpha$ 'nın barsak iskemisi tanısı ve takibinde kullanılabileceğine işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** TNF- $\alpha$ , barsak iskemisi

## Summary

### **The role of TNF- $\alpha$ in the diagnosis of the intestinal ischemia**

The diagnosis of mesenteric ischemia remains to be a challenging problem where physical examination, radiological evaluation and laboratory investigations are frequently nonspecific. It is well known that intestinal ischemia induces early bacterial translocation and an increase of serum TNF- $\alpha$  levels can be expected with intestinal vascular compromise. The purpose of this study was to investigate whether TNF- $\alpha$  can serve as a diagnostic marker of mesenteric ischemia. Sixty-three WHT/ht mice were studied in three groups: The superior mesenteric artery was ligated in 21 mice in group A; segmental intestinal ischemia was produced by partial devascularization of the gut in 21 mice in group B and a Sham laparotomy was performed in additional twenty-one mice (group C). TNF- $\alpha$  serum levels were measured in each group at the end of the first, second and third hours after the operation. A significant increase of serum TNF- $\alpha$  level to 200 pg/ml was observed at the second and third hours in group A. An insignificant increase was recorded in group B (peak levels of 65 pg/ml after two hours), while in group C no increase was measured. It is concluded that the measurement of serum TNF- $\alpha$  levels can serve as an indirect diagnostic criteria of intestinal vascular impairment. The clinical applicability of this experimental study however has to be demonstrated with further clinical work.

**Key words:** TNF- $\alpha$ , intestinal ischemia

## Giriş

Günümüzde kullanılan tanı araçları ile birçok akut gastrointestinal sistem hastalığının tanısı kolaylıkla konulabilmektedir. Öykü ve fizik inceleme bulgularının yeterli olmaması nedeni ile barsak iskemisi tanısı hala bir problem olarak karşımızda durmaktadır. Birçok özel laboratuvar yöntemi ile infarktüs oluşmadan önce mezenterik iskemi saptanmaya çalışılmaktadır.

Bu testler arasında kreatinin kinaz, laktat dehidrogenaz, alkali fosfataz gibi serum biyokimyasal işaretleyiciler, peritoneal sıvı incelemeleri, tonometri, sintigrafik çalışmalar laparoskopi ve endoskopi sayılabilir<sup>(2,7,8)</sup>.

İlk kez 1966 yılında tanımlanan TNF- $\alpha$  sistemik inflamatuvar cevabın proksimal ve kritik bir medyatördür<sup>(3,5)</sup>. TNF- $\alpha$ ; bakteriyel endotoksin, ekzotoksin ve diğer mikrobiyal ajanlara karşı makrofajlardan salınan ve insanda sepsisin klinik bulguları olan ateş, titreme ve hipotansiyon gibi belirtilerin ortaya çıkmasına sebep olan polipeptid yapıda bir si-

tokindir <sup>(14)</sup>. Deneysel çalışmalarda TNF- $\alpha$  verilen hayvanların barsaklarında nekrotizan enterokolit (NEC) benzeri patolojik değişikliklerin saptanmış olması TNF- $\alpha$ 'nın barsak iskemisinin tanısında ve prognoz tayininde yeri olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir <sup>(15)</sup>.

Barsak kan akımının azalmasının, mukoza bariyerini bozarak hem venöz hem de lenfatik yolla bakterilerin sistemik dolaşıma katılmalarına sebep olduğu artık bilinen bir gerçektir <sup>(1,2,6,13)</sup>. Bakteri translokasyonu adı da verilen bu geçişin kontrol altına alınmaması sepsis ile sonuçlanır. Dolayısı ile sepsis ve sistemik inflamatuvar cevabın oluşması barsaktaki iskeminin beklenen bir sonucudur.

Bu çalışmada literatürdeki NEC ve iskemi reperfüzyon modelleri örnek alınarak barsak iskemisi oluşturulan farelerde serum TNF- $\alpha$  düzeyi ve tanı değeri araştırılmıştır <sup>(9,11)</sup>.

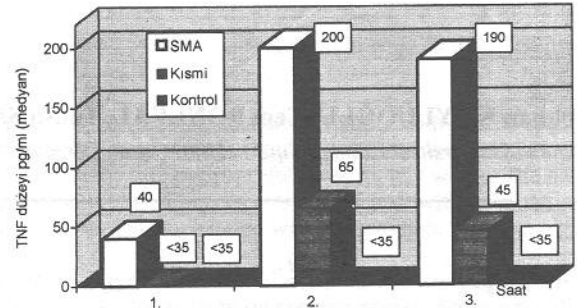
## Gereç ve Yöntem

*Araştırma için 30-40 gr ağırlığında cinsiyet ayrımı yapılmayan 5-6 aylık beyaz laboratuvar fareleri (WHT/ht grubu) kullanıldı. Deney için fareler A, B ve C olmak üzere üç gruba ayrıldılar. Eter anestezisi ile uyutulan farelerden A grubundakilere mediyan laparotomi yapılarak superior mezenterik arterleri (SMA) bağlandı. B grubundakilere laparotomiye tabi olarak yaklaşık 2 cm'lik barsak segmentinde iskemi oluşturacak kadar mezenterik damarlar bağlandı. C grubundakilere ise Sham ameliyatı uygulandı.*

*Her üç gruptaki fareler de kendi içlerinde 1., 2. ve 3. saatlerde sakrifiye edilmek üzere 7'şerli gruplara ayrıldılar. Sakrifiye edilen farelerin kalplerinden kan örnekleri alınarak serum TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından incelendi. Elde edilen serumlarda TNF- $\alpha$  düzeyleri, örnekler -70° C'de çalışan bir derin dondurucuda saklanarak İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'na temin edilen "Mouse TNF- $\alpha$  Elisa Kit" yardımı ile çalışıldı.*

## Bulgular

SMA'leri bağlanan A grubunda, kontrol amacı ile relaparotomi yapıldığında, 1. saatte daha az belirgin olmak üzere 2. ve 3. saatte barsaklarda makroskopik



Şekil 1. Deney gruplarında elde edilen TNF- $\alpha$  medyan değerleri. SMA: superior mezenterik arter ligasyonu grubu.

olarak hemoraji, ödem ve yer yer mor renkli gangren görülmüştür. Kısmi iskemi yapılan B grubunda aynı bulgular mezenterik damarların bağlandığı kısa bir segmentte görülmüştür. Sham ameliyatı yapılan C grubunda ise relaparotomi yapıldığında barsaklarda hafif bir renk solukluğu dışında herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. A ve B grubundaki makroskopik bulguların histopatolojik olarak iskemi ve nekrozla uyumlu olduğu gösterilmiştir.

A grubundaki serumların TNF- $\alpha$  değerleri ölçüldüğünde, 1. saatte medyan TNF- $\alpha$  düzeyi 40 pg/ml iken 2. saatte azami yükselerek 200 pg/ml olmuş ve 3. saatte ise çok az bir düşme göstererek 190 pg/ml olarak ölçülmüştür (Şekil 1). B grubundaki kısmi iskemi yapılan farelerde 1. saatte alınan medyan serum TNF- $\alpha$  düzeyi <35 pg/ml iken 2. saatte 65 pg/ml'ye yükselmiş ve 3. saatte 45 pg/ml'ye düşmüştür. Elisa tetkiki sırasında 35 pg/ml'nin altına isabet eden değerler hazırlanan standart eğrinin dışında kaldığından yanlış sonuçlar vermemesi için <35 pg/ml olarak gösterilmiştir. Sham ameliyatı yapılan C grubundaki farelerin medyan TNF- $\alpha$  düzeyleri her üç zaman aralığı için de <35 pg/ml olarak saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar tek yönlü Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında A grubunda elde edilen sonuçlar kontrol grubundakilere göre her üç zaman aralığında da anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). A ve B grubu karşılaştırıldığında gene her üç zaman aralığında istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek bir yükseklik saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). B grubundaki sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1. saatte anlamlı fark bulunamazken 2. ve 3. saatlerde TNF- $\alpha$  değerlerinin anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmektedir ( $p < 0.05$ ).

## Tartışma

Barsak mukozası sahip olduğu çeşitli immün savunma mekanizmaları sayesinde iç ortamı dış ortamın zararlı etkilerinden korur (4). Barsak mukozasının bir sebeple bozulması bu immün savunma mekanizmalarının çalışmalarını engelleyerek florada bulunan veya anormal olarak fazlaca çoğalan mikroorganizmaların barsak duvarını aşarak sistemik dolaşıma geçmelerine ve sistemik inflamatuvar cevabı başlatmalarına sebep olur (1,2,6,13). Ayrıca barsak duvarında iskemiyeye bağlı olarak gelişen inflamatuvar reaksiyonlar da sistemik inflamatuvar cevabı arttırmaktadır. Bu da başta TNF- $\alpha$  olmak üzere birçok sitokin devreye girerek klinikte sepsis diye tanımladığımız tablonun ortaya çıkması ile sonuçlanır.

Michigan Üniversitesinde, sıçanlarda yapılan bir çalışmada, iskemik barsak hasarı sonrasında 30 dakika içerisinde portal venöz dolaşımda endotoksin saptanmaya başlanmış ve 120. dakikada en üst seviyeye çıkmış olduğu görülmüştür (10). Deneysel çalışmamızda SMA'leri bağlanan fare grubunda TNF- $\alpha$  seviyesi bağlanmayı takiben 1. saat içerisinde yükselmeye başlamış, 2. saatte azami seviyesine ulaşarak 3. saatte de hemen hemen aynı seviyesini korumuştur. A grubunda her üç zaman aralığındaki TNF- $\alpha$  değerleri kontrol grubundaki aynı değerlerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gösterdiği saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

Bu durum Michigan Üniversitesinde yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir. Portal dolaşıma geçen endotoksin miktarı artış gösterdikçe TNF- $\alpha$  miktarında da artış olmaktadır. Birinci saatteki TNF- $\alpha$  miktarının az olmasının nedenlerinden biri de endotoksine karşı verilen TNF- $\alpha$  cevabının mRNA sentezi ve onun kopyalanma (transkripsiyon) ile protein yapımına çevrilmesi (translasyon) aşamalarından geçmesi için süre gereksinimi olmasıdır (12). Birinci saat ile 2. saat arasındaki anlamlı farka rağmen 2. saat ile 3. saat arasında hemen hemen hiç fark görülmemiştir. Farelerin 3-4 saat içerisinde ölüyor olmaları 2. saatten sonra diğer medyatörlerin devreye girmesi ve sistemik inflamatuvar cevabı arttırmalarına bağlanabilir.

Kısmi iske mi yapılan grupta 1. saatte çok az bir TNF- $\alpha$  aktivitesi görülürken 2. ve 3. saatlerde hafif

bir yükselme gözlenmektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış olmasına rağmen TNF- $\alpha$  aktivitesinin göreceli olarak düşük olması, iskemik hasara uğrayan segmentin kısalığı, dolayısı ile portal dolaşıma geçen endotoksin ve inflamatuvar hücrelerin orantılı olarak az olmasına bağlanmıştır. Bu durum TNF- $\alpha$  aktivitesi ile iskemik hasara uğrayan segmentin büyüklüğü arasında bir korelasyon olduğunu düşündürmektedir.

Deneysel barsak iskemisi modeli üzerinde yaptığımız çalışmada serumdaki TNF- $\alpha$  seviyesinin artmış olduğunu görmemiz sebep sonuç ilişkisini açıklamak açısından aydınlatıcı olmuşsa da gerek klinik ve gerekse birçok deneysel çalışmada çeşitli hastalıklarda yüksek TNF- $\alpha$  seviyesine rastlanılmıştır. Deneysel barsak iskemisi modelinde alınan sonuçlar klinik çalışmalarla da doğrulanırsa TNF- $\alpha$ 'nın barsak iskemisi için spesifik fakat patognomonik olmayan bir belirteç olduğu söylenebilecektir.

## Kaynaklar

1. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF: Proposed mechanism of microbial translocation. *Ann Surg* 212:496, 1990
2. Baker JW, Deitch EA, Li M: Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 28:896, 1988
3. Carswell EA, Old LJ: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:666, 1975
4. Cebra JJ, Crandall CA, Gearhart PJ: Cellular events concerned with the initiation, expression and control of the mucosal immune response, in Ogra L, Dayton DH (eds): *Immunology of Breast Milk*. Newyork, 1979, p.1
5. Coley WB: The treatment of malignant tumors by repeated inoculation of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 105:487, 1983
6. Deitch EA, Maejima K, Berg R: Effects of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of gastrointestinal tract microflora in burned rats. *J Trauma* 25:385, 1985
7. DeToma G, Marazona D, Salvatore P: Enzymatic and metabolic changes in the peripheral serum after superior mesenteric artery ligation in dogs. *Ital J Surg Sci* 13:269, 1983
8. Doran G: Appearance of creatinine kinase BB isoenzyme in the serum of patient suffering from infarction of the colon. *Clin Chim Acta* 92:415, 1979
9. Granger DN, Hollworth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 548 (Suppl):47, 1986
10. Michael G, Caty MD, Karen S, Guice MD: Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 212:694, 1990

11. Oldham KT, Guice KS, Gore D: Treatment of intestinal ischemia with oxygenated intraluminal perfluorocarbons. Am J Surg 153:291, 1987
12. Remick DG, Strieter RM, Lynch JP: In vivo dynamics of murine tumor necrosis factor alpha gene expression: Kinetics of dexamethasone-induced suppression. Lab Invest 60:766, 1989
13. Salman T, Buyruk N, Gürler N, Çelik A: The effect of

- surgical trauma on the bacterial translocation from the gut. J Pediatr Surg 4:1, 1992
14. Starnes HF, Warren RS, Jeevanandam M: Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. J Clin Invest 82:1321, 1988
15. Tracey KJ, Beutler B: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 234:470, 1986

## KONGRE DUYURULARI

### 14. Ulusal Üroloji Kongresi

20-23 Ekim 1996, Marmaris

Dilan Tur Congress International Ltd. Emlak Kredi Blokları A-2 Blok D.22,  
80620 Levent-İstanbul Fax: 212 280 14 77

\*\*\*

### Türk Cumhuriyetleri III. Pediatri Kongresi

23-27 Eylül 1996, Almatı-Kazakistan

Gazi Üniversitesi Rektörlüğü, Beşevler-Ankara Fax: 312 221 32 00

\*\*\*

### 9th International Symposium on Pediatric Surgical Research

18-19 October 1996, Rome-Italy

Coordinamento Amministrativo Manifestazioni Scientifiche, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù,  
Piazza S. Onofrio 4- 00165 Rome, Italy Fax: +39 6 68592443

\*\*\*

### 2nd World Congress on Pediatric Intensive Care

23-26 June 1996, Rotterdam-The Netherlands

Holland Organizing Centre, Parstraat 29 2514 JD The Hague, The Netherlands

\*\*\*

### First World Congress of Surgical Endoscopy

19-24 October 1996, Beijing-China

13021 East Florence Avenue, Santa Fe Springs, CA 90670-4505-USA Fax: 310 946 0073

\*\*\*

### XIII Congress of Asian Assoc of Pediatric Surgeons

3-6 November 1996, Taipei, Taiwan

Taipei Medical College Hospital 252, Wu-Hsing Street, Taipei, 110, Taiwan

\*\*\*

### 8th Annual Meeting of European Society of Pediatric Urology

2-5 April 1997, Rome, Italy

42 Devonshire Road, Cambridge CB1 2BL, UK

\*\*\*

### 2nd European Congress of Paediatric Surgery

8-10 May 1997, Madrid, Spain