

1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

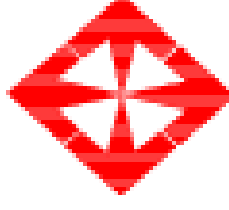
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

YANIK SONRASI GELİŞEN BAKTERİYEL TRANSLOKASYON
ÜZERİNE AMİFOSTİN'İN (WR-2721) ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Necip ALTUNDAŞ

Ankara, 2015



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

YANIK SONRASI GELİŞEN BAKTERİYEL TRANSLOKASYON
ÜZERİNE AMİFOSTİN'İN (WR-2721) ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Necip ALTUNDAŞ

Tez danışmanı: Doç. Dr. Erdal KARAGÜLLE

Ankara, 2015

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini özveriyle aktaran, yol gösterici sayın hocalarım;

Prof. Dr. Mehmet HABERAL,
Prof. Dr. Esat HERSEK,
Prof. Dr. Gökhan MORAY,
Prof. Dr. Sedat YILDIRIM,
Doç. Dr. Yahya EKİCİ,
Doç. Dr. Feza KARAKAYALI,
Doç. Dr. Necdet ÖZÇAY,
Doç. Dr. Erdal KARAGÜLLE,
Yrd.Doç. Dr. Emin TÜRK,
Yrd.Doç. Dr. Cem AYDOĞAN,
Dr. Tugan TEZCANER,
Dr. Aydıncañ AKDUR,
Dr. Mahir KIRNAP,
Dr. Ebru Hatice AYVAZOĞLU SOY,
Dr. Tefvik AVCI'ya ayrıca;

Adana ve Konya Başkent Hastanesinde görev yapan tüm hocalarıma saygı ve Őükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Uzun eğitimim boyunca destek ve sevgilerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Necip ALTUNDAŞ

ÖZET

Yanık Sonrası Gelişen Bakteriyel Translokasyon Üzerine Amifostin'in (WR-2721) Etkisi

Bakteriyel translokasyon ve buna bağlı gelişen sepsis, yanık gibi major travmalar sonrası ortaya çıkan önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bakteriyel translokasyonu azaltmaya yönelik çok çeşitli terapötik ilaçlar ve modeller ileri sürülmüştür. Bu çalışmada daha önce klinik onkolojide kullanılan, iyonize radyasyon ve kemoterapötik ajanlara karşı normal dokularda hücre koruyucu etki sağlayan, WR-2721(Amifostin)'in bakteriyel translokasyon üzerine etkisinin analizi amaçlandı.

Çalışmada ağırlıkları 180-350 gr arasında değişen 27 adet (Wistar Albino) erkek rat kullanıldı. Çalışmaya herbiri 9 rattan oluşan üç grup alındı. Grup I: Kontrol grubu, Grup II: 3.derece yanık oluşturulan grup, Grup III: 3. derece yanık oluşturulup Amifostin verilen grup. Anesteziyi takiben kontrol grubu hariç diğer ratların sırtı tıraşlandı ve toplam vücut yüzeyinin %30' luk alanı hesaplanarak 3.derece temas yanığı oluşturuldu. Resusitasyon için %0,9' luk serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı. Yanıktan 48 saat sonra steril şartlar altında laparotomi yapılarak sırasıyla karaciğer orta lob, dalak, mezenterik lenf nodları ve çekumdan alınan doku örnekleri uygun kültürlerle ekildi. Üreyen mikroorganizmaların tipi ve koloni sayısı tek tek kaydedildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile yapıldı. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubunda çekum dışında diğer bölgelerde mikroorganizma üremesi saptanmadı. Grup II ve III' de en fazla mezenterik lenf nodu ve çekumda olmak üzere, karaciğer ve dalaktan alınan örneklerde mikroorganizma üremesi mevcuttu. Grup II' de mezenterik lenf nodlarında üreyen mikroorganizma sayısı ve tipi Grup III' e göre daha yüksek oranda bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Gruplarda en sık üreyen mikroorganizma *Escherichia coli* olarak saptandı.

DeneySEL olarak yanık oluşturulan ratlarda WR-2721(Amifostin)'in bakteriyel translokasyonu azaltma üzerine belirgin etkisinin olmadığı söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel translokasyon, yanık, WR-2721(Amifostin)

ABSTRACT

The Effect Of WR-2721 (Amifostine) On Bacterial Translocation After Burn Injury

Bacterial translocation and sepsis are major causes of mortality and morbidity after a severe trauma like burn. Various therapeutic medicines and models have been put forward to decrease bacterial translocation. We sought to examine the effect of WR-2721 (Amifostine) on bacterial translocation, which is proven to be protective of normal tissue cells against the effects of ionized radiation and chemotherapeutic agents.

Twenty-seven Wistar albino rats, weighing between 180-350 grams were used. They were separated into 3 groups, each containing 9 rats. Group I: Control group, Group II: had 30% third-degree burns, Group III: had Amifostine-applied rats after third degree burn. After anesthesia, the dorsum of the rats was shaved, 30% of the total body surface was calculated, and a third-degree burn was performed with contact injury. For resuscitation, intraperitoneal 0.9% saline solution was applied. Forty-eight hours after the burn injury, a laparotomy was done in sterile conditions, and tissue samples were taken (from the middle lobe of the liver, the spleen, the mesenteric lymph nodes and the cecum respectively) and cultured. The type and number of colonies of microorganisms were all recorded. Statistical analyses were done by a 1-way analysis of variance (One-Way ANOVA). Values for $P < .05$ were accepted as statistically significant.

In the control group, colonization showed only in the cecum. In Group II and III, colonization was shown in the mediastinal lymph node, in the spleen, in the cecum and in the liver. Most microorganisms were shown in the mesenteric lymph node and cecum. *E. coli* was the most colonized bacteria among the groups. According to the number and type of the organism, Group II showed more colonization than Group III, but no statistical significance was detected.

Group III had lesser colonization than Group II; however, no significant effect of Amifostine was shown on the prevention of bacterial translocation. The facts that antioxidant therapies decrease mortality and improve microvascular circulation in burns, could be helpful in preventing bacterial translocation.

Keyword: Bacterial translocation, burn, WR-2721 (Amifostine)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç.....	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Bakteriyel Translokasyon ve Mekanizmaları	3
2.1.1. Bakteri Translokasyonunun Temel Mekanizmaları.....	3
2.1.2. Bakteri Translokasyonunu Arttıran Durumlar	4
2.1.3. Bakteriyel Translokasyonu Azaltan Durumlar.....	5
2.1.4. Barsaklardan Translokasyona Uğrayan Bakteriler	6
2.2. Yanık ve Bakteriyel Translokasyon.....	6
2.2.1. İskemi ve Serbest Oksijen Radikalleri	8
2.2.2. Antioksidan Maddeler	9
2.3. Amifostin	11
2.3.1. Amifostinin Hücre Koruyucu Mekanizması	12
2.3.2. Hücre Koruyucu Etkinliğin Seçiciliği	13
2.3.3 Amifostinin Farmokokinetiği.....	14
3. MATERYAL METOD.....	16
3.1. Araştırma Yeri ve Ortamı	16
3.2. Araştırma Tipi.....	16
3.3. Anestezi	16
3.4. Araştırma Grupları.....	16
3.5. Araştırma Parametreleri	17
3.6. Araştırma Yöntemi	17
3.7. Yanık Modeli	18

3.8. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	19
3.10. İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR	22
4.1. Mikrobiyolojik Değerlendirme Sonuçları.....	22
4.1.1. Gruplardaki Mikrobiyolojik Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	24
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇLAR.....	30
KAYNAKLAR.....	31

KISALTMALAR

BT	: Bakteriyel Translokasyon
CFU	: 1 gr dokudaki bakteri sayısı
E. Coli	: Escherichia Coli
GSH	: Glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HGPRT	: Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IgG	: Immunglobulin G
LT	: Lökotrien
LTB₄	: Lökotrien B ₄
MDA	: Malondialdehit
MLN	: Mezenterik lenf nodu
MOF	: Çoklu organ yetmezliği
NaCl	: Sodyum klorür
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂⁻	: Süperoksit
OH⁻	: Hidroksil iyonu
PG	: Prostaglandin
PGE₁	: Prostoglandin E ₁
SC	: Subkütan
sIgA	: Sekretuar İmmünglobulin A
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
WR-2721	: Amifostin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan mekanizmaların çalışma sistemleri.....	10
Şekil 2.2. Aktif olmayan WR-2721'in aktif metaboliti WR-1065'e dönüşümü. WR-1065 'in WR-33278'e oksidasyonu	11
Şekil 3.1. %30 3. derece yanık oluşturulması	18
Şekil 3.2. 3. derece yanık (Hematoksilen Eozin× 50)	19
Şekil 3.3. Doku örneklerinin alınması	20
Şekil 4.1. Gruplara göre mezenterik lenf nodlarında üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerleri	25
Şekil 4.2. Gruplara göre çekum'da üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerleri	26

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Grup I' de kültür alınan bölgelerde üreyen mikroorganizmaların logaritmik değerleri	22
Tablo 4.2. Grup II' de kültür alınan bölgelerde üreyen mikroorganizmaların logaritmik değerleri	23
Tablo 4.3. Grup III' de kültür alınan bölgelerde üreyen mikroorganizmaların logaritmik değerleri	23
Tablo 4.4. Kültürde üreme saptanan ratların bölgelere ve gruplara göre dağılımı.....	24
Tablo 4.5. <i>E. coli</i> ve <i>E.faecalis</i> üreme sıklığı yönünden ratların bölgelere ve gruplara göre dağılımı.....	24
Tablo 4.6. Mezenterik lenf nodlarında üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerlerinin gruplara göre incelenmesi.....	25
Tablo 4.7. Çekum'da üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerlerinin gruplara göre incelenmesi.....	25

1. GİRİŞ

Yanık, lokal ve sistemik etkileri olan, insan vücudunun karşılaştığı en ağır fiziksel ve psikolojik travmalardan biridir (1). Isı, elektrik, kimyasal maddeler, radyasyon, kaynar sıvılar ve alev gibi etkenlerle meydana gelen doku hasarına yanık denir. Yanıkta temel hasar; bu etkenlerin enerjisi ile ortaya çıkan koagülasyon nekrozu sonucu gelişir. Bozulmuş deri bütünlüğü hem sistemik değişikliklere yol açmakta, hemde infeksiyon için uygun ortam hazırlamaktadır. Buharlaştırma yanında üçüncü boşluklara olan sıvı kaybı çeşitli doku ve organların dolaşımını bozarak farklı derecelerde iskemiye neden olmaktadır (2-4). Yanık sonrası kompleks mediatör sistemlerinin aktivasyonu ile bir dizi patofizyolojik değişiklikler olur (3). Örneğin, iskemide veya organ yetmezliğinde serbest oksijen radikallerinin, nötrofillerin ve endotel hücrelerinin rolleri net olarak gösterilmiştir. Yanık hasarına karşı oluşan sistemik inflamatuvar cevabın bir sonucu olarak organlarda sekestre olan nötrofiller serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Yanık sonrası verilen antioksidanların, hücrel antioksidan savunma sistemlerini düzenlediği ve doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (5).

Yanık sonrası geç evrede meydana gelen morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni infeksiyonlardır. Birçok mekanizmanın birlikte çalışması sonucu ortaya çıkan bakteriyel translokasyon (BT) da sistemik infeksiyon gelişiminin en önemli nedenidir. 1979'da Berg ve arkadaşları BT'ü, fiziksel olarak sağlam barsak mukozasından endojen bakteri ve endotoksinlerinin mezenterik lenf nodlarına (MLN), kana ve solid organlara geçişi olarak tanımlanmıştır (6). Günümüzde sepsisteki hastaların yaklaşık %30'unda infeksiyonu tetikleyen bir odak bulunamaması BT'un önemine dikkat çekmiştir. BT'un nedenlerini, oluş mekanizmasını ve önleme yollarını inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmış ve enteral beslenme gibi daha fizyolojik olan bazı uygulamalar rutine girmiştir (7,8). Gastrointestinal sistem, absorpsiyon ve çeşitli sekretuar olayların önemli rol oynadığı kompleks bir organ sistemidir. Çeşitli besin maddeleri intestinal epitelden emilerek sistemik kullanım için karaciğere geçer. Sindirim sisteminin besin emilimi yanında immünolojik, metabolik ve bariyer fonksiyonları vardır (2). Konak, intestinal bakteri ve endotoksinlerin organ ve dokulara yayılımını önleyen, birlikte hareket eden multipl savunma mekanizmaları geliştirir. Bu mekanizmalar; mekanik savunma, normal intestinal mikrofloranın etkilerinin stabilizasyonu ve immünolojik savunmalardır (2).

Gastrointestinal sistem mukozasının en önemli görevlerinden biri lümen içindeki mikroorganizmaların sistemik dolaşıma katılımını engellemektedir. Mukozal bariyerin çeşitli etkenler ile bozulması sistemik infeksiyon ve çoklu organ yetmezliğinin önemli iki nedeninden biri olan BT ile sonuçlanır (9, 10). Serbest oksijen radikallerinin barsak duvarında meydana getirdiği hasar BT gelişiminde son derece önemli role sahiptir (11).

Amifostin (Ethyol, WR 2721), iyonize radyasyon ve kemoterapötik ajanlara karşı normal dokuların selektif geniş spektrumlu sitoproteksiyonunu sağlayan inorganik bir tiyofosfattır. Bu ajanlarla oluşan doku hipoksisini azaltır. Amifostin inaktif bir ön ilaçtır, dokuda membran alkalin fosfatazları ile metabolize edilir. Normal endotel hücrelerinde bulunan alkalin fosfatazlar ile defosforile edilerek aktif tiyole dönüşür. İlacın aktif metaboliti WR-1065' tir. Tümöral endotel ve stromal komponentlerde alkalin fosfatazın olmaması ilacın kanser tedavisindeki seçiciliğini sağlamaktadır.

Amifostinin hücre koruyucu mekanizmaları serbest radikallerin azaltılması, DNA'nın korunması, onarımının hızlanması ve hücrel hipoksinin azaltılmasını içerir. Amifostin, kalın barsak kanserlerinin karaciğer metastazlarının intraarteriyel kemoembolizasyonu sonrası oluşan serbest oksijen radikallerini önlemek için kullanılmıştır. Bu hastaların karaciğer enzimlerinde düşme sağlamış, intraarteriyel hepatik kemoembolizasyonun terapötik oranına olumlu katkıda bulunmuştur (12).

1.1. Amaç

Bu deneysel çalışmada, ratlarda oluşturulan yanık modelinde, BT üzerine Amifostin'in koruyucu etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Literatür taramasında Amifostin'in yanık dışında, değişik durumlarda sitoprotektif etkisinin olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Ancak yanıkta ortaya çıkan BT üzerine olan etkisini araştıran çalışma olmadığı görüldü. Vücut yüzeyinin %30 ve üzerindeki termal yanıklarda endotel hücre bütünlüğü bozulduğu için Amifostin'in etkili olabileceği düşünüldü. Yanık sonrası ortaya çıkan BT' nun önlenmesinde, klinik kullanımı ve güvenilirliği gösterilmiş bir ilaç olan Amifostin (WR 2721)'in etkisini ilk defa deneysel bir modelde araştırmış oluyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriye Translokasyon ve Mekanizmaları

2.1.1. Bakteri Translokasyonunun Temel Mekanizmaları

Bakteriyel translokasyon; bakterilerin gastrointestinal yoldan Mezenterik Lenf Nodülleri (MLN) kompleksine, karaciğer, dalak, böbrek ve kan gibi intestinal sistem dışı yerlere geçmesi olarak tanımlanır.

BT yerine çeşitli terimler kullanılmıştır. İlk kez 1958'de Keller ve Engley, daha sonra Hildebrand ve Volochow tarafından işaretlenmiş makrofajların oral yolla alınarak barsak lümeninden kana veya lenfatik dolaşıma geçişini tarif etmek için kullanılmıştır (13). Daha sonra 1979'da Berg ve Garlington gastrointestinal sistemden bakterilerin karaciğer, dalak, böbrek, MLN, kan gibi barsak dışı bölgelere geçişini BT olarak tanımlamışlardır (14).

Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında BT'un majör kriterleri saptanmıştır.

Bunlar;

- * Normal bakteriyel floranın ekolojik dengesinin bozulması, intralüminal aşırı çoğalma.
- * İntestinal mukozal bütünlüğün fiziksel yapısının bozulması.
- * Konakçı immün sisteminin bozulması.

Bu mekanizmaların bir veya birkaçının rol oynadığı BT, daha önceden birçok hastada sebebi bilinmeyen, klinik olarak şiddetli septik durumların günümüzdeki başlıca sebebi olarak gösterilmektedir (15, 18).

Barsak bariyerinin ilk komponenti intestinal mikrofloradır. Barsak duvarının potansiyel patojen bakterilerin aşırı çoğalmasını sınırlaması ve bu bakterilerin yapışmasını engellemesine "kolonizasyon direnci" denir. Geniş spektrumlu antibiyotikler ile anaerobik flora değişikliğe uğrarsa, bu koruyucu mekanizma kaybolur ve potansiyel patojen bakteriler epitele direkt tutunarak, bakteri translokasyonuna neden olabilirler. Bakterilerin normalin üzerinde artışının engellenmesi bu nedenle önemlidir (19, 20).

Gastrointestinal sistemde diğer önemli bir savunma mekanizması da esas elemanı münin olan normal mukoza tabakasıdır. Münin, goblet hücrelerinden salgılanan yüksek molekül ağırlıklı bir glikoproteindir (21). Müköz tabaka, submukozal plazma

hücrelerinden salgılanan IgA'yı (Sekretuar IgA: sIgA) da içeren bir grup koruyucu ihtiva eder. Müköz tabaka anaerob mikroorganizmaların üreyebilmesi için uygun bir ortam hazırlar ve bu da potansiyel patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engeller (22). Müköz tabakadaki değişiklikler, patojen bakterilerin sayılarının artmasına ve bunların epitel hücre yüzeyine tutunmasına neden olur (23).

Normal intestinal peristaltizm de önemli bir savunma faktörüdür. İleus gibi staz durumlarında, bakterilerin koruyucu müköz tabakaya penetrasyonu ve mukoza altındaki epitel hücrelerine yapışması ile koruyucu mekanizma kırılabilir (16, 24). İnce barsakların yüzeyindeki kolumnar epitel hücreleri de (enterosit) BT gelişimine karşı bariyer oluşturur. Enterositler; besin kaynağı olarak glutamin, proliferasyon için epidermal ve transforming growth faktörlere ihtiyaç gösteren kompleks hücrelerdir (25). Enterositler birbirlerine desmozomlar ile bağlanırlar. Bu bağlar küçük moleküllerin geçişine izin verirlerken bakterilerin ve büyük moleküllerin geçişini engellerler (26).

Hücresel bariyeri bozan pek çok faktör arasında iskemi-reperfüzyon hasarı önemli bir yer tutar. Hipovolemik ve kardiyojenik şokta kan daha çok beyin, kalp gibi hayati organlara yöneleceğinden splanknik yatakta vazokonstriksiyon olur ve intestinal mukozada kan akımı azalır. Mukozal bariyerin bozulması ile intestinal permeabilite artar, bakteri ve endotoksinler sistemik dolaşıma katılır. Hemorajik şok, yanık, sepsis ve endotoksemi durumlarında barsak kan dolaşımının zayıflığı BT oluşumunun ana mekanizmasıdır (27,28). Deneysel hayvan modellerinde; barsak lümenindeki bakterilerin aşırı çoğalması, direkt olarak birçok doğal flora bakterisinin gastrointestinal yoldan mezenterik lenf nodlarına translokasyonu başlattığı gösterilmiştir (29, 30). Gastrointestinal sistemde yüksek popülasyonlara varan belli bakteriler, mezenter lenf düğümlerine transloke olur. Endojen flora tarafından oluşturulan bakteriyel antagonizm, belli bakterilerin gastrointestinal popülasyon seviyelerini azaltır ve bu bakterilerin mezenter lenf düğümlerine translokasyonunu inhibe edebilir (31, 32).

2.1.2. Bakteri Translokasyonunu Arttıran Durumlar

- Yanık
- Endotoksin
- Parenteral beslenme
- İntestinal obstrüksiyon

- İntestinal motilite bozuklukları
- Biliyer obstrüksiyon
- Radyasyon
- Travma
- İnteraabdominal yabancı cisimler
- Hemorajik şok
- Tümörler
- Karaciğer rezeksiyonu
- İntestinal iskemi-reperfüzyon
- Nötropeni
- İnflamatuar barsak hastalığı

2.1.3. Bakteriye Translokasyonu Azaltan Durumlar

- Splenektomi
- Mezenterik lenfadenektomi
- Bombesin
- Prostaglandin E1
- Ksantin oksidaz inhibisyonu
- İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (İGF-1)
- Hipertonik NaCl infüzyonu (hemorajik şokta)
- Heparin
- Epidermal büyüme faktörü
- Enteral beslenme
- Oral fosfolipitler
- Enalapril
- Tromboksan A2 inhibisyonu

Bakteriyel translokasyon hızı arttıkça yaralı ve septik hastaların hipermetabolik cevabı artar. BT belirgin infeksiyöz odak olmaksızın, cerrahi hastalarda septik duruma neden olur ve çoklu organ yetmezliği (MOF) gelişimine sebep olur (33, 34). MOF görülme hızı travma sonrası %7-20, major intraabdominal sepsiste cerrahi sonrası %30-50 oranındadır. Bozulmuş organ sistemlerinin sayısına bağlı olarak morbidite ve mortalite %30-100 oranında değişir (34, 35). Gastrointestinal sistemde, normal koşullarda yaklaşık

10^{12} bakteri, 10^9 potansiyel patojen gram negatif enterik bakteri ve konağı öldürebilecek miktarın çok üzerinde endotoksin bulunmaktadır. Bakterileri ve endotoksini lümen içinde muhafaza etmek barsağın en önemli görevleri arasındadır. Bu görevi normal mikrobiyal flora, mekanik faktörler, sağlam bir immün sistem ve normal barsak-karaciğer aksına sahip barsak mukozası yapar (35, 36).

Travmalı veya ileri derecede genel durumu bozulmuş hastalarda BT'ü önleyen savunma sistemleri işlevlerini yitirmiştir. Buna ek olarak kullanılan antibiyotikler barsak mikroflorasının normal ekolojisini değiştirirler, böylece kolonizasyon rezistansı bozularak, potansiyel patojenlerle bakteri sayısında aşırı artış olur (15, 18, 37, 38).

2.1.4. Barsaklardan Translokasyona Uğrayan Bakteriler (40, 41)

- *Escherichia coli*
- *Proteus mirabilis*
- *Klebsiella*
- *Enterokoklar*
- *Enterobacter*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus feacalis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Basillus*
- *Citrobacter freundii*
- *Laktobasillus*

Endojen bakteriler sağlıklı ratların mezenter lenf düğümlerinde, dalak, karaciğer veya böbreklerinde bulunmaz. Bu bakteriler gastrointestinal mukozayı geçemez veya gastrointestinal mukozayı geçenlerde mezenterik lenf nodları gibi retiküloendotelial organlarda öldürülürler (42, 43).

2.2. Yanık ve Bakteriyel Translokasyon

Son yıllarda, yanıklı hastalarda mortalite oranı, modern yoğun bakım ünitelerinde yapılan etkin tedaviler ile önemli derecede azalmıştır. Ancak yanık sonrası sepsis ve buna

bağlı MOF önemli bir mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Bu hastalarda hücrel ve humoral immün cevapta yetersizlik mevcut olduğundan antibiyotik tedavisine rağmen sepsis önlenememektedir (44).

Ciddi travmalardan biri olan yanık sonrası derinin mekanik bariyeri ve bütünlüğü bozulur, kan tranfüzyonu gibi benzer mekanizmalar ile immün sistem zayıflar ve BT meydana gelir (45). Yanık hastalarında özellikle nötrofil fonksiyonlarında bozukluk tespit edilmiştir (46). Deneysel çalışmalarda BT ile yanık mortalitesi arasında anlamlı bir ilişki bildirilmiştir (18). Bundan dolayı BT'un engellenmesi yanığa bağlı mortaliteyi azaltıcı etki yapabilmektedir.

Yanığı izleyen ilk dakikalardan itibaren çeşitli inflamasyon mediatörlerinin etkisiyle kapiller geçirgenlik bozulur ve intravasküler sıvının interstisyel alana kaçması sonucunda hipovolemi (yanık şoku) ve yanan bölgede ödem gelişir. Kapiller geçirgenliğin bozulmasında; histamin, prostoglandinler, prostasiklin, lökotrienler, tromboksan, bradikinin, serotonin ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) rolü olduğu düşünülmektedir (47, 4). Yapılan deneysel çalışmalarda, yanık sonrası doğal flora bakterilerinin gastrointestinal yoldan transloke olduğu saptanmış ve bu durumun yanığa bağlı barsak mukoza hasarı ile direkt ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Vücut yüzeyinin %25'ini tutan haşlanma tipi yanıklarda ileal ve çekal mukozada büyük ülser alanlar oluşmuş, bu ülser alanların mukozal yenilenmesi ile BT'un da ortadan kalktığı gözlenmiştir (48).

Deneysel endotoksik şok, yanık ve hemorajik şok modellerinde iskemi-reperfüzyon sürecinde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin barsak mukoza hasarına neden olduğu ve BT için ciddi bir risk olduğu gösterilmiştir (49, 50). Yanık gibi major bir travmaya organizma; endokrin, metabolik ve en önemlisi inflamatuvar yanıt ile cevap verir. İnflamatuvar yanıt; plazma, dolaşımdaki hücreler, vasküler yapılar, konnektif dokunun hücrel ve hücre dışı elemanlarını içeren kompleks bir süreçtir (51, 52). İnflamatuvar yanıtta en önemli hücreler lökositler ve makrofajlardır. Ağır yanıklarda ve litik bakteriyel infeksiyonlarda endotelde direkt hücre nekrozu ve ayrılması ile sonuçlanan hasar oluşur.

Endotelial hasarın bir diğer önemli nedeni lökositlerdir. Lökositler inflamasyonun erken aşamasında endotele yapışarak toksik serbest oksijen radikalleri ve proteolitik enzimler salgırlar (53, 54). Ayrıca lökositlerin ekstrasvazasyonu sonrası ortaya çıkan kemotaktik ajanlar (bakteriyel endotoksinler, C5a, LTB4) lökositlerin inflamasyon bölgesine ulaşmasını sağlarlar. Kemotaktik ajanlar ayrıca; lizozomal enzimlerin degranülasyonu sonrası oksidatif mekanizmaları başlatır ve SOR oluştururlar.

Yanıkla birlikte başlayan birçok reaksiyon vardır. Plazmada lipid peroksidasyonuna ait ürünlerin bulunması yanıkta lokal ve uzak organ hasarında serbest oksijen radikallerinin önemli bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır. Yanık bölgesinin uzağında gelişen organ hasarlarında intravasküler kompleman aktivasyonu ve bunun sonucu olarak intravasküler nötrofil aktivasyonu sorumlu tutulmaya başlanmıştır(55).

2.2.1. İskemi ve Serbest Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijenin, hücre içinde oksidatif enzimler tarafından indirgenmesi ile SOR'leri oluşur. SOR'leri, yörüngelerinde çift olmayan elektronları bulunduran kararsız moleküllerdir. Kimyasal olarak unstabildirler ve hızla reaksiyona girerler. Nükleik asid ve membran lipidlerinin yıkılmasına sebep olurlar. En önemli serbest oksijen radikalleri; süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit(H_2O_2), hidroksil iyonu(OH^-) ve nitrik oksit(NO)'tir. Süperoksit radikali normal hücre metabolizmasında mitokondrial, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport işlemleri sırasında oluşan bir ara üründür.

İskemik koşullarda ise, hipoksantin ve ksantin katabolizması sırasında ksantin oksidaz enziminin katalize ettiği bir reaksiyon ile süperoksit radikalleri oluşur (56). Süperoksit radikalinden, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlediği reaksiyonla H_2O_2 oluşur. Hidrojen peroksit, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin katalize ettiği reaksiyon ile H_2O ve CO_2 'e dönüştürerek inaktive edilir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz, serbest oksijen radikallerine karşı organizmanın en önemli savunma elemanlarıdır. SOR aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, sitoplazmik membranda hasara ve geçirgenlik artışına yol açarak hücre içinde aşırı kalsiyum birikmesine yol açar. Oluşan hücre membran disfonksiyonu da, hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır.

Yüzey alanı geniş yanık travması sonrası, periferik perfüzyonu iyileştirmek ve iskemik dokulara oksijen sunumunu arttırmak ve hücre fonksiyonları ile canlılığını devam ettirmek amacıyla sıvı replasmanı yapılır. Öncesinde iskemik kalmış dokuların perfüzyonu, organizma için zararlı olabilecek kaskadları tetikler. Yanık travması sonrası sıvı desteği ile oluşan serbest radikaller nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi çeşitli hücre komponentlerini etkiler. Devam eden hipoperfüzyon zaman içerisinde hücrenin ölümü ile sonuçlanırken, hipoperfüzyonun düzeltilmesi iskemi-reperfüzyon hasarı yapar. Bu durum 'oksijen paradoksu' olarak ifade edilir (55).

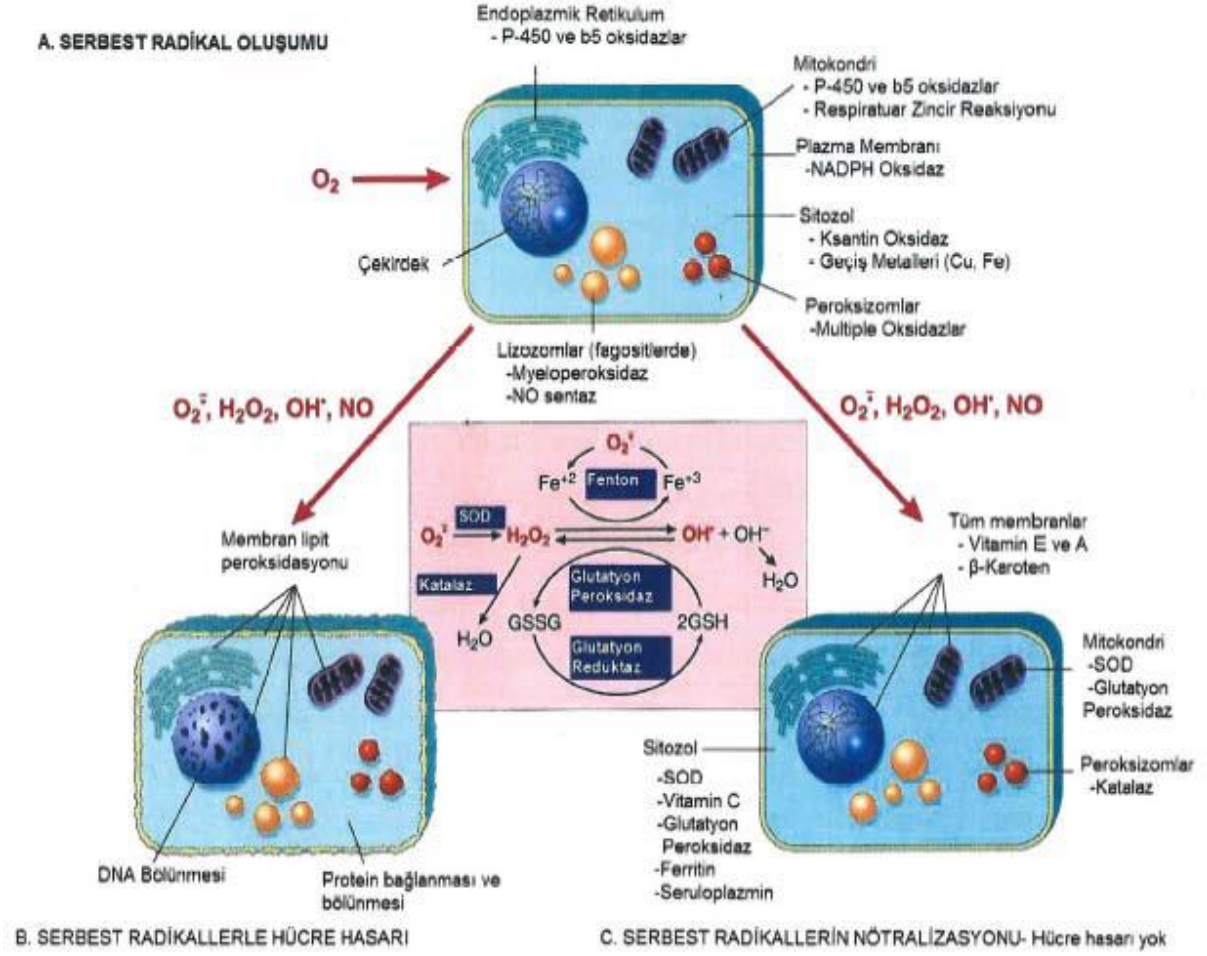
Yanık travmasında serbest oksijen radikallerinin ana kaynağının geçmişte ksantin oksidaz enzimi olduğu düşünülürken, günümüzde aktive nötrofillerden kaynaklandığı saptanmıştır (57,58,59). Nötrofiller normovolemik bir kişide invaze bakterilerin ortadan kaldırılmasında koruyucu rol oynar fakat yanık travması sonrasında nötrofillerin oluşturduğu serbest radikaller ksantin oksidaz aktivitesini artırır ve doku hasarı meydana getirir.

Yanık travması serbest radikal üretimini artırırken, antioksidan savunma mekanizmalarını da bozar ve yanıklı hastaları serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hücresel hasara daha yatkın hale getirir. Yanık travmasının enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarını bozduğu gösterilmiştir. α tokoferol, askorbik asit ve E vitamini düzeylerinde düşme olur.

Bu endojen antioksidan mekanizmalar hücre membranını lipid peroksidasyonundan korurken aynı zamanda serbest oksijen radikallerini de temizler. Yanık travması ayrıca enzimatik antioksidan savunma sistemlerini de bozar. Sonuçta süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon (GSH) seviyelerinde düşme görülür (60).

2.2.2. Antioksidan Maddeler

Antioksidan maddeler, hücreleri serbest radikallere karşı koruyan ve onları nötralize eden maddelerdir. İskemi reperfüzyon hasarı sürecinde gelişen hücre içi SOR, bu maddeler ile ortadan kaldırılabılır. Bunların çoğu endojen kaynaklı iken, bir kısmı eksojen kaynaklıdır. En sık üzerinde çalışılan antioksidanlar: triptofan, histidin, E vitamini, A vitamini, selenyum, katalaz, süperoksit dismutazdır (56) (Şekil 2.1)



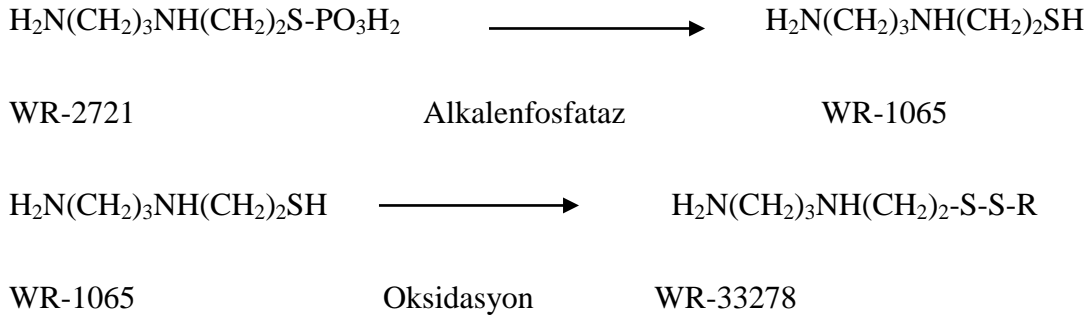
Şekil 2.1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan mekanizmaların çalışma sistemleri

Aktif nötrofillerden toksik SOR ortama salınmaktadır. Bunlar lokal doku hasarına ve yanık şokunun gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Yanıkta oluşan iskemi sonucu birçok mediatörün ortama salgılandığı (PG, LT v.s.), SOR oluştuğu ve bölgede nötrofil infiltrasyonunun arttığı, hatta nötrofil-endothel ilişkisinin bu olayda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Böylece iskemi ve hüresel fonksiyon bozukluğu ile doku yıkımı oluşmaktadır. Bunun lokal bir iskemi ve yavaş gelişen reperfüzyon olduğu düşünülmektedir. Yavaş reperfüzyonda nötrofil infiltrasyonu olur (61). Yanığı takiben IgG düzeyindeki düşüşün yanığın seyri sırasında ortaya çıkan septik komplikasyonlar ile alakalı olduğu ileri sürülmüştür. Yanığın hem süpresör hücre aktivitesini artıran hem de helper hücre aktivitesini azaltan düzenleyici T lenfositlerin alt gruplarının fonksiyonlarını etkilediği bildirilmiştir. Sonuçta T4/T8 oranı bozulmaktadır. Süpresör T hücrelerinin proliferasyonunun septik komplikasyonların görülmesi ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (62). Yanık şoku ile birlikte gelişen doku perfüzyon bozukluğu barsak duvarında bazı

iskemik değişikliklere sebep olur. Bu olay sonucu barsak florasındaki bazı bakteriler barsak duvarını geçerek mezenterik lenf nodları, karaciğer dalak gibi solid organlara geçerek BT oluşumuna neden olur.

2.3. Amifostin

Amifostin (WR-2721, Ethyol®, 2-[(3 – aminopropyl) amino] etilfosforothioik asit 214 kDa moleköl ağırlığında bir inorganik tiyofosfattır. Bu ilaç ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri ordusunda, savaşlarda askeri avantaj sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Daha sonra tıbbi araştırmalarda kullanılmıştır. WR-2721 aktif olmayan bir ön ilaçtır. Dokularda hücre membranlarına bağlı alkalen fosfataz enzimi ile defosforilasyonunu takiben, aktif metaboliti olan WR-1065 (2-[aminopropyl-amino] etantiyol)’e çevrilir (12) (şekil 2.2).



şekil 2.2 Aktif olmayan WR-2721’in aktif metaboliti WR-1065’e dönüşümü. WR-1065 ‘in WR-33278’e oksidasyonu (12).

Tiyol grubu primer olarak iyonize radyasyon veya antrasiklinler, bleomisinler, biyoredüktif bileşikler gibi kemoterapötik ajanların meydana getirdiği serbest oksijen radikalleri için temizleyicidir. WR-1065’de disülfid molekülüne (WR-33278; N, N’’ – (dithiodi-2, 1-ethanedil)bis-1,3-propanediamin) metabolize olur (12) (şekil 2. 2).

Hayvan deneyleri ile ilk yapılan askeri çalışmalarda Amifostin’in iyonize radyasyona karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Daha sonraları yine hayvan çalışmalarında amifostinin radyasyona maruz kalan deri, mukoza, sa folikülleri, intestinal duvar, tükruk bezleri ve gelişmekte olan kıkırdaklara karşı koruyucu etkisi olduğu da gösterilmiştir (12, 63). En fazla koruyucu olduğu dokular endotelyum, tükruk bezleri, bağ dokusu ve spermatogonal hücrelerdir. Koruyuculuğu nispeten düşük olan dokular ise akciğerler, böbrekler, özefagus, ince barsak ve kolondur.

Amifostinin lökomogenezis ve karsinogenezise karşı koruyucu etkisi deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Amifostin radyasyon veya platinyum, nitrozüre ve bleomisin gibi kimyasallarla meydana gelen Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) geninin mutasyonunu da önler (20, 64). İn vitro çalışmalarda radyasyona maruziyetten önce veya sonrasında WR-1065 verilmesi ile hücre dizilerinde transformasyon önlenmiştir (12). Kemoterapi veya kombine kemoradyoterapi sonrası gelişen sekonder malignansiler oldukça sıktır. Amifostinin radyoterapi ve kemoterapinin olumsuz etkilerini önlemesinin yanında karsinogenezise karşı koruyucu etkisinin olması kanser tedavisi gören uzun yaşam beklentisi olan hastalarda önemlidir. Farelerle yapılan in vivo çalışmalarda tek doz 35-37 Gy radyasyon öncesi 400mg/kg amifostin verilmesinin bacak fibrosarkomunun gelişimini önemli düzeyde azalttığı gösterilmiştir (12, 65).

Yetmişli yılların sonunda amifostinin alkilleyici ajanların, antineoplastik etkilerini değiştirmeden toksisitelerini azalttığı gösterilmiştir. 1980-82 yılları arasında hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalarda amifostinin, sisplatinin renal toksisitesini azalttığı gösterilmiştir. 1988'de amifostinin siklofosfamid ile kombine edilmesiyle pulmoner toksisitede azalma olduğu görülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda doksorubisinin kardiyak miyozitler üzerindeki yan etkilerinin de amifostin ile azaldığı gösterilmiştir (12).

2.3.1. Amifostinin Hücre Koruyucu Mekanizması

Amifostinin hücre koruyucu mekanizması oldukça karmaşıktır. WR-2721 inaktif ön ilaç iken, aktif metaboliti WR-1065 iyonize radyasyon veya kimyasalların meydana getirdiği serbest oksijen radikallerine karşı güçlü bir temizleyicidir. Örneğin antrasiklin ilişkili kardiyotoksitenin en önemli sebebi olan süperoksit anyonlar WR-1065'in tiyol grupları ile inaktive edilir (12, 66). Radyasyonun DNA'da meydana getirdiği kırıklar WR-1065 ile önlenebilir. Ayrıca WR-1065, alkilleyici ajanların NH₂ grupları ile meydana gelen DNA çapraz bağlanmalarının miktarını da azaltır (12, 67).

Amifostinin simetrik disülfiti olan WR-33278'e oksidasyonu amifostin metabolizmasında gerçekleşen bir süreçtir. WR-33278 yapısal olarak poliamin spermine benzer ve DNA'ya bağlanır. Bu bağlanma sonucu sitotoksik ajanlar ile oluşan DNA hasarı önlenir. Radyasyon uygulamasını takiben hücre dizilerinin WR-1065 ile inkübasyonu sonrası hücrelerin apoptotik hızlarının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (68). Bu mekanizma henüz tam olarak netleşmemekle birlikte, bazı çalışmalar WR-33278'in

topoizomeraz- 1 ile birlikte çalışarak DNA'nın onarım sürecine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. WR-33278'in önemli bir rolü de hücrel transformasyonu önlemesidir (12).

2.3.2. Hücre Koruyucu Etkinliğin Seçiciliği

Klinik onkolojide, terapötik indeks = kontrol edilen tümör / normal dokuda meydana gelen komplikasyonlar olarak ifade edilir. Hücre koruyucu ajanların terapötik indeksi arttırmaları, paydayı yani normal dokularda olan komplikasyonları azaltmalarına bağlıdır. Hücre korunmasında seçicilik kritik bir özelliktir. Tümörün korunması halinde pay sabit kalacak dolayısıyla da terapötik indeks azalacaktır. Seçici olmayan hücre koruyucu ajanların kullanımı klinik açıdan sakıncalıdır. Çünkü kansere karşı olan tedavinin de etkinliğini azaltırlar (12).

Tümörlerin kanlanması iyi olmadığı ve nekrotik alanlar içerdiği gayet iyi bilinir. Azalmış kan akımı nedeniyle amifostinin tümör ortamına ulaşması zordur. Bu da hücre koruyucu etkinin seçiciliğinin mekanizmalarından birisidir (12).

Normal dokulara göre tümördeki alkalen fosfataz (ALP) eksikliğinden dolayı, amifostinin tümör ortamında aktif metabolitine dönüşmemesi diğer bir seçici özelliğini oluşturur. Tümörlerde ALP kaybının nedeni bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada immünohistokimyasal yöntemlerle tümör dokularında ve normal dokularda ALP ekspresyonu değerlendirilmiş; tümöral damarlardan ve tümör stromasının fibroblastlarından ekspresse edilen ALP'da belirgin bir kayıp görülmüştür (12, 69). Glikolitik yolların aktivasyonu ile oluşan asidik tümör ortamı, ALP ekspresyonunun kaybının bir nedeni olabilir (70, 71).

Tümör ortamının asidik olması, alkalen ortamda hidrolize olan WR-2721 için bir diğer seçicilik mekanizmasıdır. Yapılan çalışmalarda kanser hücresinde WR-2721'in alınımının düşük olduğu görülmüştür. Normal hücreler WR-2721'i aktif olarak absorbe ederken, kanser hücrelerinde bu süreç pasif olarak gerçekleşir (12).

2.3.3 Amifostinin Farmokokinetiği

Amifostinin standart verilış yolu intravenöz (iv)'dür. Bununla birlikte subkutan (sc) verilmesi de son zamanlarda ilgi alanı olmuştur (72). Amifostinin verilmesinden hemen sonra alkalen fosfatazlar hızlıca önilaç WR-2721'i aktif tiyol metaboliti olan WR-1065'e hidrolize ederler. WR-1065' te simetrik disülfiti olan WR-33278'e okside olur. WR-33278 DNA'nın histonik olmayan bölgelerine bağlanır. ALP ile WR-2721'in defosforilasyonu optimal alkalen koşullarda olur (optimal ph 9.0). Asidik ortamda WR-2721 defosforile olamaz, alkalen fosfatazın plazma konsantrasyonu transformasyon için yeterli değildir. Defosforilasyon primer olarak normal dokuda ve özellikle normal endotelde olur. Kültür ortamlarına ALP'in eklenmesiyle WR-1065'in hücre içi birikimi hızla artmakta ve amifostinin hücre koruyucu etkisini arttırmaktadır.

Alkalen fosfatazı kodlayan dört farklı gen vardır. Bu genlerden üç tanesi ikinci kromozomda bulunur ve intestinal, plasental ve plasenta benzeri ALP'ı kodlar. Dördüncü gen ise birinci kromozomda bulunur, karaciğer, böbrek ve kemik ALP'ını kodlar. Hem karaciğer hem de intestinal tip alkalen fosfatazlar WR-2721'i hidrolize edebilirler. Karaciğer tipi enzimin varlığında bu hidroliz daha hızlı gerçekleşir. İlacın verilmesinden hemen sonra maksimum konsantrasyona bir dakika içinde erişilir. WR-2721'in yarılanma ömrü 0.88 dakikadır ve hızla plazmadan kaybolur. İlaç verildikten altı dakika sonra plazmada %5'inden azı bulunur. WR-1065'in konsantrasyonu bir dakika içinde 22 µmol/L'ye ulaşırken, WR-2721'inki verilışinden 4 dakika sonrasında 8 µmol/L olur. Amifostinin iv enjeksiyonu sonrası WR-33278'in plazma seviyesi bir dakika içerisinde 11 µmol/L'ye ulaşırken, üç dakika sonra 7 µmol/L olur. Verilen ilacın ve metabolitlerinin ancak %2.2'si idrarda saptanır. Bu durum ilacın ve metabolitlerinin %90'ından fazlasının hücre içerisine girdiğini gösterir (12).

WR-2721'in deney hayvanları ile yapılan farmakokinetik çalışmaları, amifostinin tüm dokularda hızla dağıldığını ancak kan beyin bariyerini iyi geçemediğinden beyin dokusunda çok düşük miktarlarda saptandığını göstermiştir (12). Plasenta bariyerini ise kolaylıkla geçebilir. Amifostin sc olarak da uygulanabilir. Subkutan uygulamanın iv uygulamaya göre daha basit olması ve hipotansiyon oluşturmaması gibi avantajları vardır.

AMİFOSTİNİN YAN ETKİLERİ:

Bulantı, kusma

Hipotansiyon (iv yol)

Asteni

Ateş yükselmesi

Allerjik reaksiyonlar (sc yol ile uygulamada)

Hipoglisemi

Serum kalsiyum seviyelerinde azalma.

3. MATERİYAL METOD

3.1. Araştırma Yeri ve Ortamı

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde yapıldı. Çalışmada ağırlıkları 180-350 gr arasında değişen 27 adet (Wistar Albino) erkek rat kullanıldı. Denekler çalışmaya başlamadan bir hafta önce üretim merkezinden araştırma merkezine getirilerek sıcaklığı sabit ortamda (22°C), 12 saat gündüz 12 saat gece ortamında tutularak ve standart rat yemi verilerek deneye hazırlandı. Deneyde kullanılacak ratlar 12 saat önce aç bırakılarak sadece su içmelerine izin verildi.

3.2. Araştırma Tipi

Deneysel çalışma protokolü Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Kurulu tarafından etik ve bilimsel yönden onaylandıktan sonra “National Institute Of Health Guide for the care and use of laboratory animals” kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi (Etik kurul onay numarası: DA13/05). Deneyde kullanılan ratlar Başkent Üniversitesi Araştırma Merkezi'ne bağlı Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edildi.

3.3. Anestezi

Bütün hayvanların yanık, laparotomi ve sakrifikasyon aşamalarında anestezi, 50mg/kg Ketamin Hidroklorür (ketalar Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent-İstanbul) ve 7 mg/kg Xylazine Hidroklorit (Rompon Bayer ilaç şişli-İstanbul)'in aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile sağlandı.

3.4. Araştırma Grupları

Deneysel çalışma her biri sırayla seçilen ve 9' ar rattan oluşan 3 grup üzerinde yapıldı.

Grup I (n=9): Kontrol grubu (yanık oluşturulmayan ve amifostin verilmeyen grup).

Grup II (n=9): 3. derece %30 temas yanığı oluşturulan grup.

Grup III (n=9): 3. derece %30 temas yanığı oluşturulan ve intraperitoneal Amifostin 200 mg/kg yükleme dozunu takiben 10 mg/kg/gün idame dozu intraperitoneal olarak verilen grup.

3.5. Araştırma Parametreleri

Araştırmada deney guplarında dalak, karaciğer ve mezenterik lenf nodundaki (MLN) ve kandaki bakteri varlığı incelendi. Bakteriyel translokasyon olan deneklerde; bakterilerin koloni tipi ve sayısı değerlendirildi.

3.6. Araştırma Yöntemi

Kontrol grubundaki ratlara (Grup I) 12 saatlik açlık periyodunu takiben intraperitoneal olarak verilen ketamin hidroklorür ve xylazinhidroklorit ile anestezi uygulandı. Kontrol grubundaki ratlara anestezi işleminden altı saat sonra yem ve su verildi. 48 saat sonra aynı anestezi şekliyle doku ve kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edildi. Yanık işlemi yapılacak tüm ratlara (Grup II ve III) 12 saatlik açlık periyodunu takiben intraperitoneal olarak ketamin hidroklorür ve xylazin hidroklorit ile anestezi verildi. Sonra ratların sırtları vücut alanının %30'unu içerecek şekilde tıraş edildi. Pirinç levha bek alevinde ısıtıldıktan sonra deriye temas ettirilerek 3. derece yanık oluşturuldu. Grup II'deki ratlara başka bir işlem uygulanmadı. Amifostin uygulanacak gruba (Grup III) yanık işlemini takiben 200 mg/kg Amifostin başlangıç dozu intraperitoneal olarak verildi. Daha sonra 10 mg/kg/gün sc dozunda idame olarak devam edildi. Yanık uygulanan gruplara (Grup II ve III) işleminden altı saat sonra standart rat yemi ve su verildi. Bu iki gruptaki ratlar, 48 saat sonra aynı anestezi şekliyle doku ve kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edildi.

3.7. Yanık Modeli

İşlem öncesi ratlar tartıldı ve aşağıdaki formül ile %30'luk yanık için gereken yüzey alanı hesaplandı.

$$\text{Total vücut yüzey alanı: } 9.1 \times W^{2/3}$$

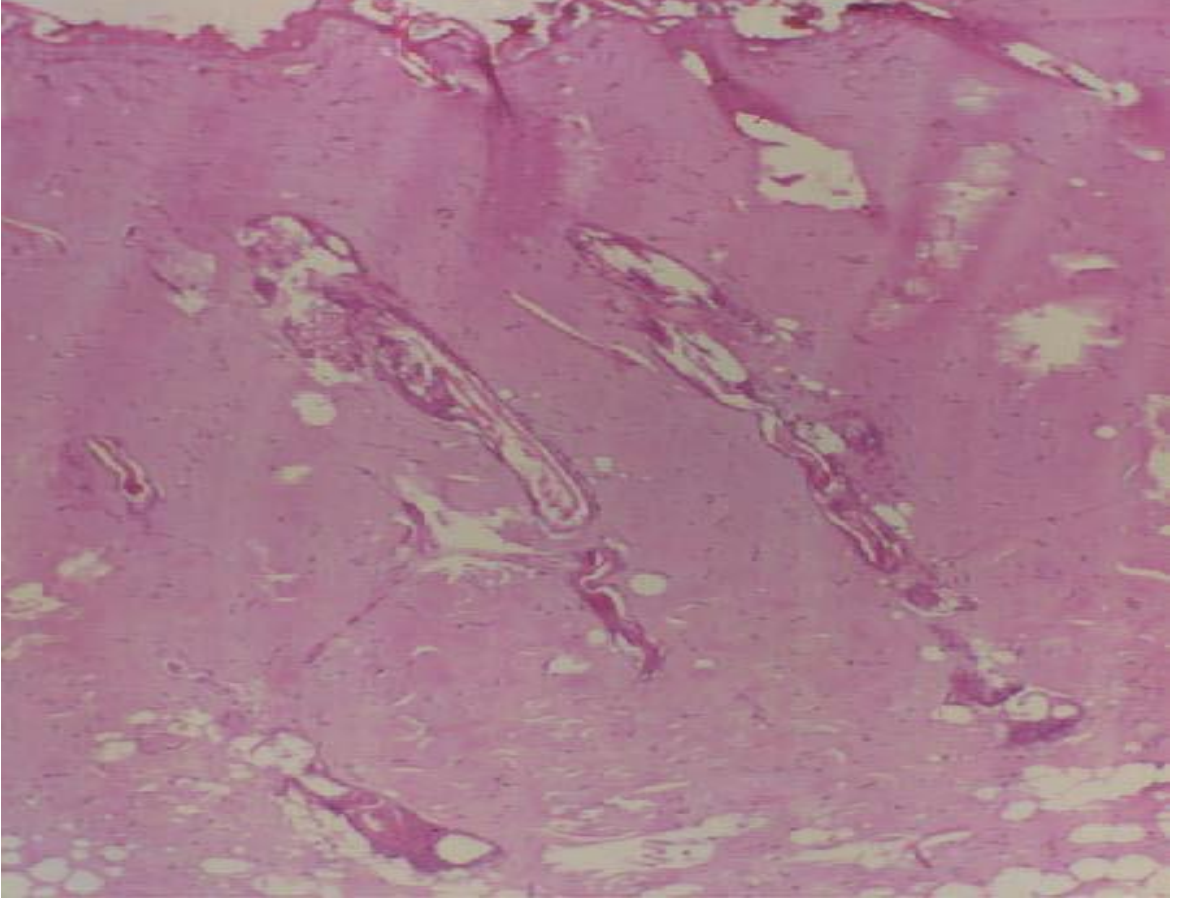
W: gram cinsinden ağırlık.

Anestezi sonrası ratların sırtı tıraş edildi. Planlanan yanık yüzdesi (%30) genişliğindeki alan, bek alevinde 2 dakika ısıtılan pirinç plaka yardımı ile deriye 10 saniye temas edilerek 3. derece yanık oluşturuldu (73).



Şekil 3.1. %30 3. derece yanık oluşturulması

Denekler işlem sonrası intraperitoneal olarak verilen 5 cc % 0,9 NaCl ile resusite edildi (66). Yanık bölgesi Opsite (Smith&Nephew, Medikal Limited England) ile kapatıldı. Tam kat yanık oluşturulduğu için deneklere analjezik verilmedi. Yanık derinliğinin 3. derece olduğu Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında histopatolojik olarak doğrulandı.

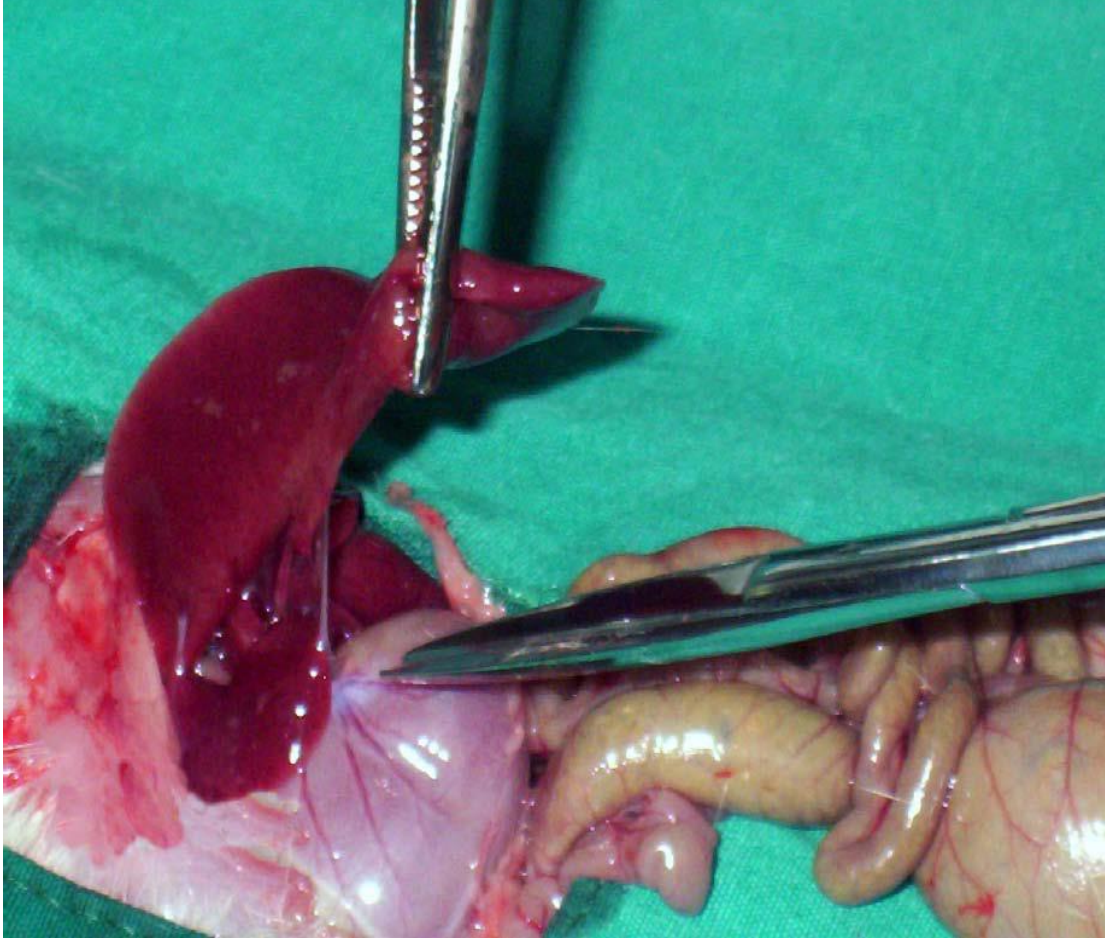


Şekil 3.2. 3. derece yanık (Hematoksilen Eozin× 50)

3.8. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Yanık oluşturulduktan 48 saat sonra 50 mg/kg Ketamin Hidroklorür ve 7 mg/kg Xylazine Hidroklorit'in aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesi ile anestezi sağlandıktan sonra bütün ratlardan doku ve kan örnekleri alındı. Karın bölgesi povidon iyot ile boyandıktan sonra steril şartlarda geniş bir laparotomi yapıldı. Bakteriyolojik inceleme için önce ratın portal venine enjektör ile girilerek steril şartlarda kan örneği alındı. Alınan kan örneği, hemen ameliyat ortamında, bakteriyolojik inceleme için steril şartlarda kültür vasatına [Kanlı Agar (BD, ABD), MacConkey Agar (BD, ABD), iki adet Schaedler Agar (BD, ABD), Sabouraud Dekstroz Agar (BD, ABD)] direkt ekimi yapıldı. Daha sonra bakteriyolojik inceleme için sırasıyla; karaciğer orta lob, dalak, MLN ve çekumdan alınan doku örnekleri, ağırlığı bilinen standart steril kaplara konuldu. Denekler işlem sonrası anestezi altında iken servikal dislokasyon yapılarak sakrifiye edildi.

Kültürlerde, bakteriyel üreme olduğu durumlarda, koloni tipi ve sayısı ayrıntılı olarak Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında değerlendirildi. Sonuçlar bilgi formuna her bir rat için kaydedildi.



Şekil 3.3. Doku örneklerinin alınması

3.9. Mikrobiyolojik İnceleme

Rata ait kan, dalak, karaciğer, Mezenter Lenf Nodu ve çekum örnekleri, yanık sonrası 48. saatte steril koşullarda alındı. Mikrobiyolojik incelemede kontaminasyonun önlenmesi için önce kan ve en son çekum örnekleri alındı. Örnekler; içlerinde thioglycollate broth (BD, ABD) bulunan steril, daraları alınmış 5 mL'lik tüplere konuldu. Tartımları tekrar yapılarak alınan örneklerin doku ağırlıkları belirlendi. Kan dışındaki örnekler doku parçalayıcısı (gentleMACS Dissociator, Almanya) ile homojenize edildi.

Ratın portal veninden alınan kan, direkt 100 mikrolitre olacak şekilde kanlı agar, MacConkey Agar, iki adet Scheadler Agar ve Sabouraud Dekstroz Agara tek koloni düşürme yöntemiyle ekildi. Homojenizatör yardımıyla ezilen doku örneklerinin 10 kat seri

dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 100 mikrolitre olacak şekilde örnekler, Kanlı Agar, MacConkey Agar, iki adet Schaedler Agar, Sabouraud Dekstroz Agara tek koloni düşürme yöntemiyle ekildi. Schaedler Agar çiftlerinin birisi anaerob şartlarda diğeri aerob şartlarda en az 48-72 saat 37°C’de inkübe edildi. Diğeri tüm besiyerleri aerob şartlarda 24-72 saat 37°C’de inkübe edildi.

Plaklarda üreyen bakterilerin koloni sayımları yapıldı ve standart mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak tiplendirildi. Bir gram dokudaki koloni oluşturma ünitesi (colony forming unit-CFU) sayısı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Bakteri sayısı (CFU/gram)} = \frac{\text{1cc'deki bakteri sayısı(CFU/ml)}}{\text{Doku ağırlığı (g)}}$$

3.10. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin analizleri Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 9.0) paket programı ile yapıldı. Kontrol, yanık ve yanık+Amifostin değerleri araştırmanın grup bilgisi olarak tanımlandı. Grup verileri arasındaki varyansın çok büyük olması sebebi ile bakteri sayıları (CFU/ml 1gram) için logaritmik dönüşüm (Log10) uygulandı ve dönüşümü yapılan ölçümlerin (Log10 (MLN) ve Log10 (çekum)) normal dağılıma sahip olduğu belirlendi ve parametrik istatistik yöntemler kullanıldı. Grupların kültür alınan bölgelerdeki bakteri sayılarının dağılımları tabloda gösterildi. Bu tablolardan elde edilen grupların; ortalama, standart sapma ve istatistik analizleri gösterildi. Gruplar arasında (kontrol, yanık ve yanık+Amifostin) sırasıyla; çekumda bakteri sayılarının ortalamalarının farklılığının istatistiksel olarak anlamlılığı Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ve mezenterik lenf nodunda ise iki bağımsız örneklem(yanık ve yanık+amifostin) t-testi (Independent Samples t-test) ile araştırıldı. Sonuçlar için p<0,05 sağlayan analiz sonuçları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mikrobiyolojik Değerlendirme Sonuçları

Kontrol grubunda (Grup I); çekum dışında diğer bölgelerde ve kanda bakteri üremesi saptanmadı. Yanık grubunda (Grup II); bir ratta karaciğerde, bir ratta dalakta, sekiz ratta MLN'da ve dokuz ratta çekumdan alınan kültürlerde üreme görüldü. Yanık+Amifostin grubunda (Grup III) ise bir ratta karaciğerde, bir ratta dalakta, sekiz ratta MLN'da, ve dokuz ratta çekumdan alınan kültürlerde üreme saptandı. En fazla MLN ve çekum'da bakteriyel üreme saptandı. En sık *Escherichia coli* ve *Enterococcus faecalis* üremesi görüldü. Her üç gruptaki ratların çekum bölgesinde *E. coli* üreme sıklığının *E. faecalis*'e göre daha fazla olduğu saptandı.

Tablo 4.1. Grup I' de kültür alınan bölgelerde üreyen mikroorganizmaların logaritmik değerleri

Denek No	KAN		KARACİĞER		DALAK		MLN		ÇEKUM	
	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr
1		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	5.952
									<i>E.faecalis</i>	20.833
2		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	95
									<i>E.faecalis</i>	269
3		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	41.026
									<i>E.faecalis</i>	15.385
4		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	9.615
									<i>KNS</i>	19.231
5		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	1.238
6		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	114
									<i>E.faecalis</i>	170
7		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	534
									<i>E.faecalis</i>	76
8		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	64.815
9		0		0		0		0	<i>E.coli</i>	6.250
									<i>E.faecalis</i>	2.500

MLN: Mezenterik Lenf Nodları, CFU/gr: Bir gram dokudaki koloni oluşturma ünitesi

Tablo 4.2. Grup II' de kültür alınan bölgelerde üreyen mikroorganizmaların logaritmik değerleri

Denek No	KAN		KARACİĞER		DALAK		MLN		ÇEKUM	
	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr
1		0		0		0	<i>E.coli</i>	157	<i>E.coli</i>	2.121
							<i>E.faecalis</i>	19	<i>E.faecalis</i>	1.818
2		0		0		0	<i>E.coli</i>	6	<i>E.coli</i>	123
							<i>E.faecalis</i>	56	<i>E.faecalis</i>	123
3		0		0		0	<i>E.coli</i>	24	<i>E.coli</i>	839
							<i>E.faecalis</i>	73	<i>E.faecalis</i>	140
4		0		0		0	<i>E.faecalis</i>	4	<i>E.coli</i>	1.200
5		0		0		0	<i>E.faecalis</i>	3	<i>E.coli</i>	1.600
									<i>E.faecalis</i>	240
6		0	<i>E.faecalis</i>	11	<i>E.faecalis</i>	28		0	<i>E.coli</i>	3.000
									<i>E.faecalis</i>	5.000
7		0		0		0	<i>E.faecalis</i>	21	<i>E.coli</i>	625
									<i>E.faecalis</i>	15.625
8		0		0		0	<i>E.coli</i>	31	<i>E.coli</i>	833
									<i>E.faecalis</i>	4.167
9		0		0		0	<i>E.faecalis</i>	10	<i>E.coli</i>	250

MLN: Mezenterik Lenf Nodları, CFU/gr: Bir gram dokudaki koloni oluşturma ünitesi

Tablo 4.3. Grup III' de kültür alınan bölgelerde üreyen mikroorganizmaların logaritmik değerleri

Denek No	KAN		KARACİĞER		DALAK		MLN		ÇEKUM	
	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr	Bakteri	CFU/gr
1							<i>E.coli</i>	40	<i>E.coli</i>	160.000
									<i>E.faecalis</i>	600.000
2							<i>E.coli</i>	17	<i>E.coli</i>	240.000
3			<i>E.coli</i>	6			<i>E.coli</i>	16	<i>E.coli</i>	30.000
			<i>E.faecalis</i>	6			<i>E.faecalis</i>	80	<i>E.faecalis</i>	10.000
4							<i>E.faecalis</i>	13	<i>E.coli</i>	15.000
5								0	<i>E.coli</i>	33.333
									<i>E.faecalis</i>	33.333
6							<i>E.faecalis</i>	4	<i>E.coli</i>	50
									<i>E.faecalis</i>	50
7							<i>E.faecalis</i>	4	<i>E.coli</i>	50
									<i>E.faecalis</i>	50
8							<i>E.coli</i>	3	<i>E.coli</i>	200
					<i>E.coli</i>	4	<i>E.faecalis</i>	3	<i>E.faecalis</i>	467
9							<i>E.coli</i>	13	<i>E.coli</i>	85714
									<i>E.faecalis</i>	57.143

MLN: Mezenterik Lenf Nodları, CFU/gr: Bir gram dokudaki koloni oluşturma ünitesi

Tablo 4.4. Kültürde üreme saptanan ratların bölgelere ve gruplara göre dağılımı

	GRUP I	GRUP II	GRUP III
KAN	-	-	-
KARACİĞER	-	1/9 (%11)	1/9 (%11)
DALAK	-	1/9 (%11)	1/9 (%11)
MLN	-	8/9 (%89)	8/9 (%89)
ÇEKUM	9/9 (%100)	9/9 (%100)	9/9(%100)

MLN: Mezenterik Lenf Nodları

Tablo 4.5. *E. coli* ve *E.faecalis* üreme sıklığı yönünden ratların bölgelere ve gruplara göre dağılımı

<i>E.coli</i>	GRUP I	GRUP II	GRUP III	<i>E.faecalis</i>	GRUP I	GRUP II	GRUP III
KAN	-	-	-	KAN	-	-	-
KARACİĞER	-	-	1/9	KARACİĞER	-	1/9	1/9
DALAK	-	-	1/9	DALAK	-	1/9	-
MLN	-	4/9	4/9	MLN	-	7/9	5/9
ÇEKUM	9/9	9/9	9/9	ÇEKUM	6/9	7/9	7/9

KC: Karaciğer, MLN: Mezenterik Lenf Nodları KC: Karaciğer, MLN: Mezenterik Lenf Nodları

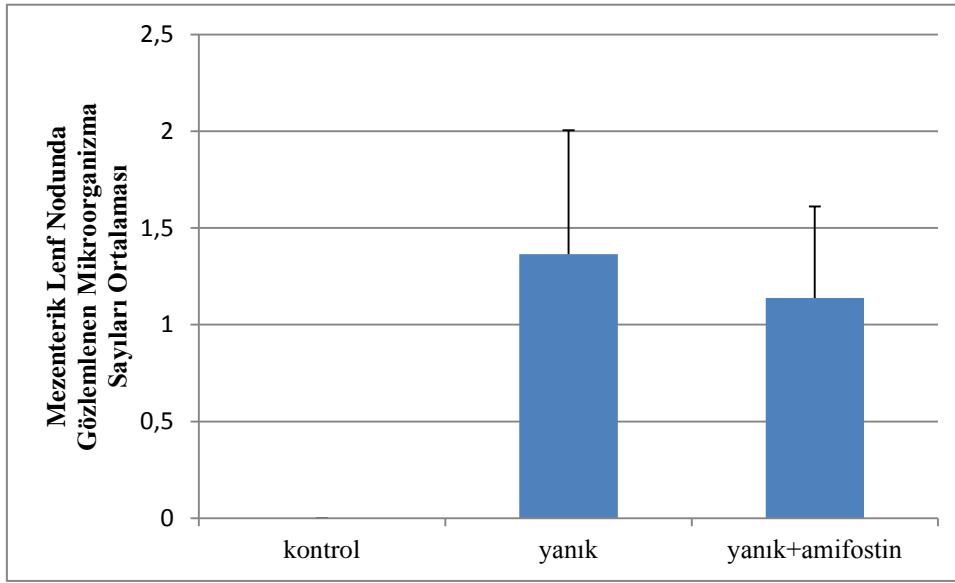
4.1.1. Gruplardaki Mikrobiyolojik Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Grup I de çekum harici diğer kültür alınan bölgelerde bakteri üremesi saptanmadı. Grup I, II ve III'te tüm deneklerde çekumdan alınan kültürlerde bakteri üremesi mevcuttu (Bkz. tablo 4.1, tablo 4.2, tablo 4.3). Çekumda üreyen bakteri sayısı en fazla Grup III sonra Grup I ve en az Grup II' de bulundu. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($F=1,275$, $p=0,298$). Mikroorganizma çeşidi bakımından her üç gruptaki deneklerin çekum bölgesinde *E.coli* üreme sıklığının (%100) *E.faecalis*'e göre (%74,1) daha fazla olduğu görüldü (Bkz. tablo 4.5). Bulgular tablo 4.7 ve grafik 4.2 de özetlendi.

Grup II ve III'te karaciğer ve dalaktan alınan kültürlerde birer üreme mevcuttu. Grup II ve III' te çekumdan sonra en fazla MLN' ndan alınan kültürlerde üreme saptandı (Bkz.tablo 4.4). Grup II ve III'te MLN'ndan üreyen bakteri sayısı Grup II'de Grup III'e göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($t=0,834$ ve $p=0,418$). Deneklerin MLN bölgesinde Grup II'de %77,7 oranla en sık rastlanan bakteri çeşidi *E.faecalis* oldu, *E.coli* görülme oranı ise %44,4 olarak bulundu. Deneklerin MLN bölgesinde Grup III'de *E.coli* ve *E.faecalis* üreme oranı eşit olarak (%55,5) saptandı. Bulgular tablo 4.6 ve grafik 4.1 de özetlendi.

Tablo 4.6. Mezenterik lenf nodlarında üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerlerinin gruplara göre incelenmesi

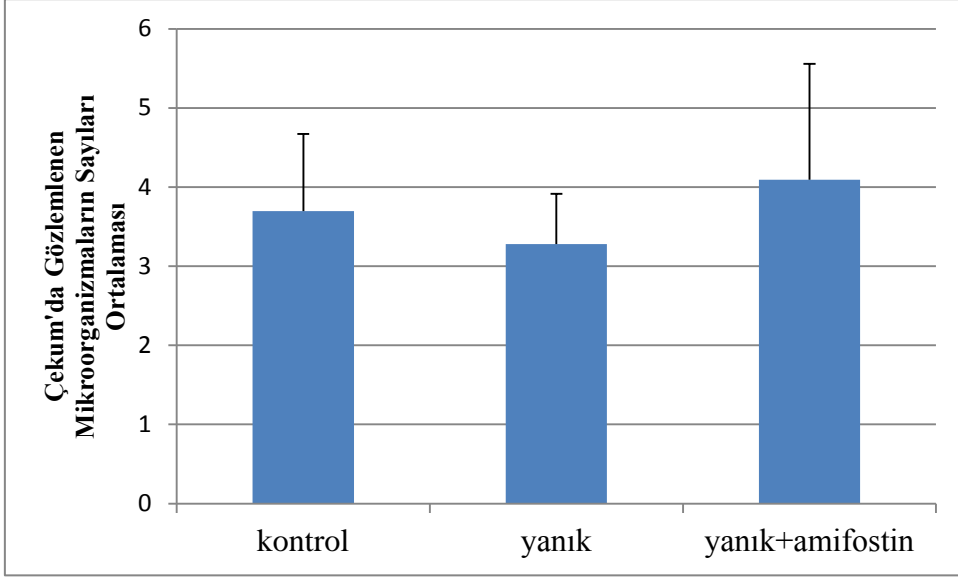
Gruplar	Bakterilerin ortalama logaritmik değerleri
Grup II (Yanık)	1,36±0,64
Grup III (Yanık+Amifostin)	1,13±0,48
t istatistiği	0,834
p değeri	0,418



Şekil 4.1. Gruplara göre mezenterik lenf nodlarında üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerleri

Tablo 4.7. Çekum'da üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerlerinin gruplara göre incelenmesi

Gruplar	Bakterilerin ortalama logaritmik değerleri
Grup I (Kontrol)	3,7±0,97
Grup II (Yanık)	3,3±0,63
Grup III (Yanık+Amifostin)	4,1±1,46
F istatistiği	1,275
p değeri	0,298



Şekil 4.2. Gruplara göre çekum'da üreyen mikroorganizmaların ortalama logaritmik değerleri

5. TARTIŞMA

Yanık insan vücudunun karşılaştığı lokal ve sistemik etkileri olan en ağır fiziksel ve psikolojik travmalardan biridir. Yanık sonrası geç evrede meydana gelen morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni enfeksiyonlardır. Birçok mekanizmanın birlikte çalışması sonucu ortaya çıkan BT bu enfeksiyon gelişiminin en önemli nedenlerinden biridir (1). BT; intestinal intralüminal canlı ve ölü bakterilerin epitelyum mukozasından lamina propriaya buradan da MLN ve uzak organlara geçmeleri olarak tanımlanabilir. Bunda etken; normal barsak florasının ekolojik dengesinin bozulması, mukoza bütünlüğünün kaybı, iskemi / reperfüzyon hasarı ve konakçı immün sisteminin zayıflamasıdır. BT'ü arttıran faktörlerin başında; yanık, bakteri endotoksinleri, intestinal motilite bozuklukları ve inflamatuvar barsak hastalıkları gelmektedir (16,17-76,77,78).

BT'nun belirgin infeksiyöz odak olmaksızın, cerrahi hastalarda septik duruma neden olduğu ve MOF gelişimine zemin hazırladığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (33,34). Deneysel çalışmalarda BT ile yanık mortalitesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Yanık gibi major bir travmada BT'un en önemli nedeni barsak duvarında meydana gelen indirekt endotel hasarı ve endotelial hücre nekrozudur. Bunun yanında vücudun yanık travmasına verdiği inflamatuvar yanıt BT gelişiminde önemli rol oynar (74,75). Çalışmalarda yanık travmasında mezenterik kan akımında azalma olduğu bildirilmiştir (78). Artmış intestinal geçirgenlik normalde steril olan peritoneal alan, mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak ve sistemik dolaşıma bakteri ürünlerinin translokasyonunu artırarak sistemik inflamatuvar cevabın ortaya çıkmasına neden olur (79). Bu inflamatuvar yanıtın en önemli bileşenleri; lökositler, inflamatuvar mediyatörler ve makrofajlardır. Aktive lökositler endotele yapışarak proteolitik enzimler salgılar ve SOR'nin açığa çıkmasına neden olur. Bu SOR'leri; direkt endotel hasarı ve mikrovasküler trombüs oluşturarak BT meydana gelmesine neden olur (18).

Organizmada meydana gelen bu değişikliklerin neticesinde organizmanın tüm dokularında zararlı olabilecek serbest oksijen radikalleri oluşur. Ksantin oksidaz aracılı serbest oksijen radikallerinin oluşumunun yanında aktive nötrofiller ilave serbest radikaller oluşturur. Artmış serbest oksijen radikallerinin oluşumu organizmanın kendini savunmasında etkili hücrel antioksidan mekanizmaları da bozmaktadır. Yanık travması sonrası SOD, katalaz, GSH, α -tokoferol ve askorbik asit seviyelerinin azalması bu durumun bir göstergesidir. Yanık sonrası serbest radikallerin meydana getirdiği hücrel

hasar dokudaki ve dolaşımdaki lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA'nın artmasıyla desteklenmektedir. Yanık tedavisinde askorbik asit, GSH, N-asetil-L-sistein gibi antioksidan tedaviler yanıkta meydana gelen sepsis kaynaklı mortaliteyi azaltırlar. Bu antioksidan tedaviler hücrel enerjistiklerdeki değişikliklerin şiddetini azaltır, mikrovasküler dolaşımı düzeltir, dokulardaki lipid peroksidasyonunu azaltır.

Yanık sonrası MOF gelişiminin patogenezi değerlendirilmek amacıyla köpeklerle yapılan deneysel bir çalışmada %50 total vücut yanığı oluşturulduktan sonra, erken ve geç sıvı resusitasyonunun organlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA'nın geç sıvı resusitasyonu yapıldığında belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Artmış serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bu sürecin MOF gelişiminde önemi vurgulanmıştır (80).

Literatürde yanıkta antioksidan tedavinin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığı, MOF gelişimini önlediği ve yanık travması sonrası serbest oksijen radikallerinin neden olduğu organ hasarını önlediği belirtilmektedir (55).

Bizde çalışmamızda radyoterapi ve kemoterapi sonrası serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarı önlemek için klinik onkolojide kullanılan Amifostin'i yanık sonrası oluşan BT üzerindeki etkilerini araştırmak için kullandık. Yapılan çalışmalarda, deneysel yanık oluşturulmuş ratlarda, Amifostin'in serbest oksijen radikalleri sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (83). Bununla birlikte, literatürde Amifostin'in yanıkta BT oluşumu üzerine etkilerini araştıran çalışmaya rastlamadık.

Glutasyon, oksidatif stres gibi uyarılara karşı önemli hücrel savunma mekanizmalarından biridir. Endojen protein olmayan sülfidril havuzunun en önemli komponenti olan redükte glutasyon sitoplazmada serbest oksijen radikalleri için temizleyici fonksiyon görür (81,82). Yanık travması sonrası iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan serbest radikallere karşı, redükte glutasyon konsantrasyonlarını idame ettirebilen antioksidanlar hücrel savunma mekanizmalarını iyileştirerek lipid peroksidasyonunu önleyebilirler. Bu sayede dokuları oksidatif hasara karşı koruyabilirler. Literatürde yanık travması sonrası antioksidan tedavinin, glutasyon gibi endojen savunma mekanizmalarına katkıda bulunduğuna dair yayınlar vardır(55).

Yapılan çalışmalarda %20 ve üzeri 3. derece yanık oluşan olgularda travmadan sonraki ilk 48-72 saatte en fazla olmak üzere BT geliştiği gösterilmiştir (6). Biz de çalışmamızda daha önce deneysel ve klinik olarak BT varlığı gösterilmiş %30 3. derece yanığı model olarak kullandık. Literatür ile benzer şekilde en fazla üremenin görüldüğü 48.

saatte ratlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. Ayrıca doku ağırlığına göre 1 cc'deki bakteri sayısı (CFU/gr) standart formülü kullanıldı (6).

Çalışmamızda; ratlarla oluşturulan deneysel yanık modelinde BT üzerine Amifostin'in koruyucu etkisini olup olmadığını görmeyi amaçladık. Literatüre bakıldığında yanıkta antioksidan tedavinin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığı, amifostin'in sitoprotektif etkisinin olduğu, serbest oksijen radikalleri sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu yanıklı ratlarda azalttığı ancak yanıkta ortaya çıkan BT üzerine olan etkisini gösteren bir çalışma olmadığı görüldü. Vücut yüzeyinin %25 ve üzerindeki termal yanıklarda endotel hücre bütünlüğü bozulduğu için Amifostin'in etkili olabileceği düşünüldü.

WR-2721 (Amifostin) daha önceki çalışmalar ile gösterildiği ve uygulandığı şekilde 200 mg/kg başlangıç dozunda intraperitoneal olarak daha sonra ise sakrifiye edilinceye kadar 10mg/kg/gün sc dozunda idame olarak verildi (81). Barsaklardan en sık translokasyona uğrayan bakteriler *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Enterokoklar*, *Enterobacter* olarak bildirilmiştir (39, 40).

Çalışmamızda, kontrol grubunda (Grup I) sadece çekum bölgesinde bakteriyel üreme saptandı. Bu bakteriler normal kolon florasında bulunan bakteriler olup üreme miktarı ile yanık (Grup II) ve yanık+Amifostin (Grup III) arasında istatistiksel fark bulunmadı. Literatür ile uyumlu olarak tüm gruplarda en sık üreyen bakteri tipi *E.coli* olarak tespit edildi. Grup II ve III de karaciğer, dalak, MLN ve çekum'da mikroorganizma üremesi olmasına rağmen en sık MLN ve çekum'da üreme gerçekleşti. Bu iki grupta karaciğer ve dalakta birer denekte üreme görüldü. Sayı yeterli olmadığı için bu değerlere istatistiksel analiz yapılmadı. MLN' nda üreyen bakteri sayısı Grup III te Grup II ye göre daha düşük bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. MLN bölgesinde Grup II ve III' de eşit sayıda denekte *E. coli* üremesi saptandı. Bununla birlikte MLN' nda *E.fecalis* üremesi Grup II de III e göre daha fazlaydı.

Özetle; çalışmamızda deneysel sepsis modeli olarak kullandığımız yanıkta, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarı önlemek için kullanılan Amifostin'in BT'nu azaltma/engelleme üzerine belirgin etkisinin olmadığı saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da yanık grubunda, MLN'da üreyen mikroorganizma sayısı ve tipi, yanık oluşturulup Amifostin kullanılan gruba göre daha yüksek oranda bulundu. Bu çalışma, antioksidan tedavilerin yanıkta meydana gelen sepsis kaynaklı mortaliteyi azalttığı, mikrovasküler dolaşımı düzelttiği ve dokulardaki lipid peroksidasyonunu azalttığı bilgileri eşliğinde, BT'nun önlenmesi için yapılacak çalışmalarda yol gösterici olabilir.

6. SONUÇLAR

- 1- Yanık oluşturulan deneklerde, erken dönemde, en sık bakteriyel translokasyon olan bölgenin mezenterik lenf nodları olduğu görüldü. Karaciğer ve dalakta da az sayıda olmakla birlikte bakteriyel translokasyon saptandı.
- 2- Yanık oluşturulan deneklerde mezenterik lenf nodları bölgesinde en sık üreyen bakterinin *E.faecalis* daha az sıklıkla *E.coli* olduğu görüldü.
- 3- WR-2721 (Amifostin) BT'ü engelleme üzerine belirgin etkisinin olmadığı ama en azından BT'nu arttırmadığı görüldü.
- 4- İstatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da amifostin kullanılan yanık grubunda üreyen mikroorganizma sayısı ve tipi amifostin kullanılmayan yanık grubuna göre daha az olarak bulundu. Ancak bu konunun farklı ve denek sayısı daha fazla çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.
- 5- Çalışmamızda, Amifostin, yanık travması sonrası bakteriyel translokasyonu engellemede ilk defa kullanılmıştır. Bu durumun daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Speller DCE. Hospital associated infections. In: Smith GR, Easman CFS. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, 8 th edn, vol. 3 London: Edward Arnold, 1990;151.
2. Nguyen TT, Gilpin DA, Meyer NA. Current treatment of severely burned patient. *Ann Surg* 1996;223:14-25
3. Ward PA, Till GO. Pathophysiologic events related to thermal injury of skin. *J Trauma* 30:S75-9, 1990
4. Onq YS, Samuel M, Song C. Meta analysis of early excision of burns. *Burns* 2006;32(2):145-150
5. Hansbrough JF, Wikström T, Braide M, Tenenhaus M, Rennekampff OH, Kiessig V. Neutrophil activation and tissue neutrophil sequestration in a rat model of thermal injury. *J Surg Res* 61:17-22, 1996
6. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF. The Process of Microbial Translocation. *Ann Surg* 1990; 212:496-512
7. Maejima K, Deitch EA, Berg RD. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tract of mice. *Arch Surg* 1984;119:166-172
8. Kut A, Başaran O, Haberal M. Epidemiologic analysis of patients with burns presenting to the burn units of a university hospital network in Turkey, *Journal of burn care & research* 2006 March/April:161-169
9. Wolochow H, Hildebrand GJ, Lamana C. Translocation of microorganism across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J infect Dis* 1966;116:523
10. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC. Multiple organ failure syndrom, *Arch Surg* 1986; 121:196-208
11. Offenbartl K, Bengmark S. İntraabdominal infections and gut origin sepsis. *World J Surg* 1990;14:191-195
12. Koukourakis MI. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications, *Anti-Cancer Drugs* 13: 181-209, 2002
13. Keller R, Engley FB, JR. Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958; 98: 577-580
14. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Comp. Ther.* 1990;16; 8-15
15. Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma.* 1990;30 Supplement 1990; 12:184-189
16. Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg.* 1989;124:699-701
17. Deitch EA, Winterton J, Berg R. Effect of starvation, malnutrition and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation. *Arch Surg.* 1987;122:1019-1024
18. Deitch EA. Berg RD. Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice. *J Trauma.* 1987; 27:2,161-166

19. VAN derWaaji D, Berghuid de Vries. Colonization of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J Hyg.* 1971; 69:405
20. Yao YM, Yu Y, Sheng ZY, et al. Role of gut-derived endotoxaemia and bacterial translocation in rats after thermal injury: effects of selective decontamination of the digestive tract. *Burns.* 1995; 21:8,580-585
21. Allen A, Cunliffe WJ, Pearson JP. Studies on gastrointestinal mucus. *Gastroenterol.* 1993;101,19
22. Roozee KR, Cooper D, Lam K. Microbial flora of the mouse ileum mucus layer and epithelial cell surface. *Ap Environ Micro.* 1982; 43:1451
23. Banwell JG, Howard R, Cooper D. Intestinal microbial flora after feeding phytohemagglutinin. Lectins (*Phaseolus vulgaris*) to rats. *Ap Environ Micro.* 1985 Jul;50(1):68-80.
24. Ding JW, Andersson R, Soltesz V. Obstructive jaundice impairs reticuloendothelial function and promotes bacterial translocation in the rat. *J Surg Res.* 1994; 57:2,238-245
25. Ko TC, Beauchamp RD, Townsend CM, et al. Glutamin is essential for epidermal growth factor stimulated intestinal cell proliferation. *Surgery* 1993; 114:147
26. Kavuklu B, Agalar C, Güç MO. Evidence that aminoguanidine inhibits endotoxin induced bacterial translocation. *B J Surg.* 1998; 85:1103-1106
27. Agalar F, Iskit AB, Agalar C, et al. The effects of G-CSF treatment and starvation on bacterial translocation in hemorrhagic shock. *J Surg Res.* 1998; 78:2, 143-147
28. Lemaire LC, van Wagenveld BA, van Gulik TM. Bacterial translocation to the thoracic duct in a setting of ischemia, partial resection and reperfusion of the porcine liver. *Dig Surg.* 1999; 16:3,222-228
29. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of the translocation rates of various bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes. *J. Infect. Dis.* 1988; 157: 1032-1037
30. Steffen EK, Berg RD. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect Immunity* 1983; 39: 1252-1259
31. Berg RD, Owens WE. Inhibition of translocation of viable *Escherichia coli* from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism. *Infect Immun.* 1979; 25:820-827
32. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.* 1998; 42:1,29-35
33. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF. The process of microbial translocation. *Ann Surg.* 1990; 212:469-512
34. Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg.* 1992; 216:2,117-134
35. Epstein MD, Tchervenkov JI, Alexander JW. Increased gut permeability following burn trauma. *Arch Surg.* 1991; 126:198-200
36. Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.* 1999;178:6,449-453

37. Deitch EA, Bridges MR. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. *J Surg Res.* 1987; 42:536-542
38. Deitch EA, Ma WJ, Ma L. Endotoxin-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. *Surgery.* 106:2,:292-9; discussion 1989; 299-300
39. Kueppers PM, Miller TA, Chen CYK, et al. Effect of total parenteral nutrition plus morphine on bacterial translocation in rats. *Ann Surg.* 1993; 217:286-292
40. Deitch EA, Winterton J, Li M. The gut as a portal entry for bacteremia. *Ann Surg.* 1987; 205:681-692
41. Miller A. Bacterial translocation: Is it of clinical significance? (Comment). *Gastroenterology* 1990; 98:243-244
42. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun.* 1979; 23:403-411
43. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.* 1998; 42:1,29-35
44. Border JR, Hassett J, LaDuca J. Gut origin septic states in blunt multiple trauma (ISS=40) in the ICU. *Ann, Surg,* 2006: 427-446
45. Alexander JW. Transfusion-induced immunomodulation and infection: *Transfusion* 1991;31:195
46. Deitch EA: Gut failure its role in the multiple organ failure syndrome. In Deitch, E.A. (ed): *Multiple Organ Failure*, New York, Thieme, 1990; pp. 40-59
47. Kramer GC, Lund T, Beckum OK. Pathophysiology of burn shock and burn edema. In: Herndon DN ed. *Total Burn Care*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007: 93-106
48. Deitch E, Maejima K, Berg RD. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the GI. Tract mikroflora in burned rats. *J. Trauma* 1985; 25:385-392
49. Deitch EA, Taylor M, Grisham M. Endotoxin induces bacterial translocation and increases Xantine oxidase activity. *J. Trauma* 1989; 29: 1679-1683
50. Rush BF, Sori AJ, Murphy TF. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock: Rush The link between trauma and sepsis. *Ann. Surg.* 1998; 207: 549-554
51. Jones WG, Barber AE, Minei JP. Differential pathophysiology of bacterial translocation after thermal injury and sepsis. *Ann. Surg.*1990; 214: 24-30
52. Dhainaut JF, Marin N, Mignon A. Hepatic response to sepsis interactions between coagulation and inflammatory processes *crit care med* 2001; 29(7);42-47
53. Kumar A, Wood KDO, Parillo JE. Circulating substances and energy metabolism in septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31(2):632-633
54. Lin E, Lawry SF. The human response to endotoxin sepsis 1998;2:255-262
55. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma:the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189:75-88, 2003
56. Folden DV, Gupta A, Sharma AC. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 2003;139:1310-1316

57. Horton JW, Mileski WJ, White DJ, Lipsky P. Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 reduces cardiac contractile dysfunction after burn injury in rabbits. *J. Surg. Res.* 64:49-56, 1996
58. Basadre JO, Sugi K, Traber DL, Niehaus GD, Herndon DN. The effect of leukocyte depletion on smoke inhalation injury in sheep. *Surgery* 104:115-208, 1988
59. Mileski W, Winn R, Harlan J, Rice C. Transient inhibition of neutrophil adherence with monoclonal antibody 60.3 does not increase susceptibility to abdominal sepsis. *Surgery* 109:497-501, 1991
60. Cynober L, Desmoulins D, Lioret N, Aussel C, Hirsch-Marie H., Saizy R. Significance of vitamin A and retinol binding protein serum levels after burn injury. *Clin. Chim. Acta* 148:247-253, 1985
61. Ninneman JL. Immunologic defenses against infection. Alterations following thermal injuries. *Burn care Recon* 1982; 3:335
62. Munstar AM. Immunologic response of trauma and burns. An overview. *Am J Med*, 1984;76:142
63. Damron TA, Spadaro JA, Tamurian RM, Damron LA. Sparing of radiation-induced damage to the physis: fractionation alone compared to amifostine pretreatment. *Int. J Radiat Oncol. Biol. Phys.* 47: 1067-71, 2000
64. Nagy B, Dale PJ, Grdina DJ. Protection against cis-diaminodichloroplatinum cytotoxicity and mutagenicity in V79 cells by 2-[(aminopropyl) amino] ethanethiol. *Cancer Res.* 45: 1132-5, 1986
65. Milas L., Hunter NR., Stephens LC., Peters LJ. Inhibition of radiation carcinogenesis in mice by S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res.* 44: 5567-9, 1984
66. Dorr RT. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol* 23(suppl 8): 23-4, 1996
67. Treskes M, Nijtmans LG, Fichtinger-Schepman AM, van der Vijgh WJ. Effects of modulating agent WR-2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol* 148: 1817-21, 1992
68. Romakrishnan N, Catravas GN. N-(2-mercaptoethyl)-1,3-propylenediamine (WR-1065) protects thymocytes from programmed cell death. *J Immunol.* 148:1817-21, 1992
69. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Koroussis C. Hypofractionated and accelerated radiotherapy and cytoprotection (HypoARC). A short, safe and effective post-operative regimen for high-risk breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52: 144-55, 2002
70. Yamagata M, Hasuda K, Stamato T, Tannock IF. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 77: 1726-31, 1998
71. Parkins CS, Stratford MR, Dennis MF, Stubbs M, Chaplin DJ. The relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br J Cancer* 75: 319-23, 1997

72. Cassatt DR, Fazenbaker CA, Kifle G, Bachy CM. Subcutaneous administration of Amifostine (Ethyol) is equivalent to intravenous administration in a rat mucositis model. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 57:794-802, 2003
73. Gilpin DA. Calculation of a new meeh constant and experimental determination of burn size. *Burns* 1996;22:607-611
74. Karakayalı H, Özyaylalı İ, Moray G, et al. The effect of heparin and selective vasodilaor drugs on apoptosis and burn induced bacterial translocation in the rat, The Second Meeting of the Middle East Burn and Fire Disaster Society Abstract Book, October 11-12, 2002; Ankara-Turkey
75. Yagmurdur MC, Turk E, Moray G, Can F, Demirbilek M, Haberal N, Karabay G, Karakayali H, Haberal M. Effects of heparin on bacterial translocation and gut epithelial apoptosis after burn injury in the rat: dose-dependent inhibition of the complement cascade. *Burns*. 2005 Aug;31(5): 603-9
76. Palmieri TL, Jackson W, Greenhalgh DG. Benefits of early tracheostomy in severely burned children. *Crit Care Med* 2002;30:922-924
77. Cumming J, Purdue GF, Hunt JL. Objective estimates of the incidence and consequences of multiple organ dysfunction and sepsis after burn trauma. *J. Trauma* 2001; 50:510-1
78. Herek O., Kara İ.G, Kaleli İ. Effects of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in burn injury. *Surg. Today*, 34: 256-60, 2004.
79. Demirkan A, Aksoy M, Kuzu MA. Deneysel ileusta indometazin kullanımının intestinal permabilite ve bakteriyel translokasyon üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2006; 59: 119- 127.
80. Huang YS, Yang ZC, Liu XS, Chen FM, He BB, Li A, Crowther RS. Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns. *Burns* 24:706-16, 1998
81. Szabo S, Nagy L, Plebai M. Glutathione, protein sulfhydryls”and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta* 206:95-105, 1992
82. Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Sciece* 214:200-2, 1981
83. Aydoğan C. Yanık sonrası karaciğerde gelişen oksidatif hasar üzerine WR-2721(Amifostin)’in etkisinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 2005.