

Deneysel Tıkanma Sarılığı Modelinde Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF) Uygulanmasının RES Fonksiyonlarına Etkisi

THE EFFECT OF GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR ON THE RES FUNCTIONS IN EXPERIMENTAL OBSTRUCTIVE JAUNDICE

Mehmet ÇAĞLIKÜLEKÇİ*, Taner ORUĞ*, Kuzey AYDINURAS**,
Metin KIR***, Seher DEMİRER****, Musa AKOĞLU*, Koray ÖCAL*****

*Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Gastroenteroloji Cerrahisi Kliniği, **Genel Cerrahi ABD, ANKARA

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp ABD, *Genel Cerrahi ABD, ANKARA

*****Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD, İÇEL

ÖZET

Amaç: Deneysel oluşturulan tıkanma sarılığı modelinde GM-CSF uygulanması ile RES fonksiyonlarındaki değişiklikleri inceledik.

Durum Değerlendirilmesi: Tıkanma sarılığında RES fonksiyonlarının deprese olduğu ve bununda sepsisin önemli sebeplerinden biri olduğu belirtilmektedir.

Yöntem: Deneysel çalışmamızda 41 denekten oluşan 4 grup oluşturduk. Grup A: Sarılık grubu; Grup B ve Grup C 1 ve 5 µgr/kg GM-CSF uygulanan gruptardan oluştu. Grup D ise sham grubu şeklinde oluşturuldu. Tüm gruptara 8. gün kuyruk veninden Tc^{99m} kolloid verilerek karaciğer (KC) ve dalaktaki gr doku başına kolloid aktivite tutulumu hesaplandı.

Çıkarımlar: Sarılık oluşturulan grupta hem karaciğer hem de dalakta en az aktivite tutulumu ortaya çıktı. Grup A ile Grup D ve Grup B ile Grup D arasında kolloid tutulumu açısından dalakta fark saptanırken karaciğerde Grup B ile D arasında fark saptanmadı. 5 µgr/kg GM-CSF verilen C grubunda hem dalak hem de karaciğerde sham grubuna çok yakın sonuçlar bulundu.

Sonuçlar: Tıkanma sarılığının mortalitesi yüksek septik komplikasyonlarının önlenmesinde GM-CSF uygulanmasının klinik çalışmalar ile desteklenmesi durumunda faydalı olabileceğini düşünmektedir.

Anahtar kelimeler: Tıkanma sarılığı, GM-CSF, RES fonksiyonları

SUMMARY

In obstructive jaundice RES functions depressions which trigger the septic process is the most important factor of multiple organ failure. In our experimental study 41 rats were used and randomized to four groups. Group A (n: 13) obstructive jaundice (OJ), Group B (n: 11) obstructive jaundice and GM-CSF was given 1 µgr/kg sc for 5 days. Group C (n: 9) OJ and GM-CSF was given in 5 µgr/kg sc for 5 days. Group D (n: 8) sham group. RES functions were evaluated by Tc^{99m} sulphur colloid scintigram on postoperative 8th day. In Group A colloid uptake were depressed. The colloid uptake were significantly different between group A and group D, group B and group D for spleen. There was no different at the colloid uptake between group C and group D both liver and spleen. We concluded that GM-CSF is an effective factor to stimulate and restorate the RES functions. And GM-CSF can be used in the obstructive jaundice for stimulating the RES functions after clinical studies.

Keywords: Obstructive jaundice, GM-CSF, RES

Tıkanma sarılığı önemli bir klinik problem olup organizmada ciddi sekellere yol açmaktadır. Hiperbilirubinemi ve tıkanma sarılığının sistemik sekelleri son yıllarda ortaya konulmaya başlamıştır. Tıkanma sarılığının yol açabilecegi problemler böbrek yetmezliği, kardiyovasküler bozukluklar, yara iyileşmesinde gecikme, sekonder biliyer siroz, karaciğer yetmezliği, koagülasyon bozuklukları, gastrointestinal kanama ve sepsis olarak sayılabilir (1,2).

Tıkanma sarılığında immün sisteme yetmezlik ortaya çıktıgı, fagosit ve nötrofil fonksiyonlarında bozukluk geliştiği bildirilmektedir. Tıkanma sarılığında kuppfer hücresayısında azalma olduğu, bilirubin ve diğer toksik bileşiklerin RES'e çöktüğü, yine sarılıkta yükselen TNF- α ve IL-1 sitokinlerinin RES fonksiyonlarını etkilediği ve hücresel immüniteyi baskıldığı belirtilmektedir (3,4).

GM-CSF hematopoietik bir büyümeye faktörü olup nötrofil kemotaksisini, makrofaj aktivitesini uyarmaktar (5).

Literatürde GM-CSF ve G-CSF'nin tıkanma sarılığında RES üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle deneysel bir modelde konuyu incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyel çalışmalarımızı Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında, Sintigrafik çalışmalarımız ise Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp ABD'de gerçekleştirildi. Bu amaca 4 grup oluşturuldu.

Grup A (n=13) : Sarılık grubu

Grup B (n=11) : Sarılık + GM-CSF grubu 1 μ gr/kg

Grup C (n=9) : Sarılık + GM-CSF grubu (5 μ gr/kg)

Grup D (n=8) : Sham grubu

Çalışmamızda ağırlıkları 150-200 gr arasında değişen 41 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Tüm denekler standart laboratuaryem ile beslendi. Tüm deneklere intramusküller ketamin hidroklorür ile anestezi uygulandı. Deneklerin karın traşı yapıldıktan sonra üstleri cerrahi drape ile örtüldü. Tüm deneklere 3 cm'lik orta hat ke-sisi ile batına girildi. Grup A'da koledok bulundu. Altından ve üstünden askiya alındı. 5/0 vikril ile bağlandı. Rekanalize olmaması için kesildi (Resim 1).

Grup B'de yukarıdaki işlemler uygulandı. 3. günün sonunda GM-CSF 1 μ gr/kg SC olarak günde bir kez 5 gün süre ile yapıldı.

Grup C'de de yukarıdaki işlemler uygulandı.

3. günün sonunda GM-CSF 5 μ gr/kg SC olarak günde bir kez 5 gün süre ile yapıldı.

Grup D'de laparotomiyi takiben koledok bulundu. Düz bir penset ile koledok tutulup bırakıldı ve işleme son verildi.

Tüm denekler 8. gün kuyruk veninden 5 μ curie TC99m sülürkolloid verilerek RES fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla karaciğer ve dalak sintigrafileri çekildi. Daha sonra ratlar sakrifiye edilerek karaciğer ve dalakta 1 gr doku başına düşen koloid aktivite tutulumu hesaplandı (Resim 2: 5 μ gr/kg GM-CSF grubundan ratın karaciğer sintigrafik görüntüsü) (Resim 3: Sarılık grubundaki ratın karaciğer sintigrafik görüntüsü).

İstatistik sonuçlarının değerlendirilmesi için Kruskal-Wallis varyans analiz testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel açısından anlamlı olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

Sarılık grubunda 5 denek beklenme periyodundan 3-4-5 günlerde kaybedildi. 1 μ gr/kg GM-CSF verilen grupta postoperatif 4 ve 5 içinde 3 denek kaybedilirken, 5 μ gr/kg GM-CSF verilen grupta ve sham grubunda kaybedilen denek olmadı. Koledok ligasyonu yapılan A-B ve C grubunda 3. günden itibaren sarılık gelişti. Grup A'da bilirubin düzeyi 11.5 mgr/dl, Grup B'de 12, Grup C'de 11 mgr/dl olarak bulundu.

KARACİĞER İÇİN :

Grup A ile Grup D arasında radyoaktivite tutulumu açısından istatistiksel açısından anlamlı fark saptandı. Grup B ile Grup D arasında (B'de daha fazla koloid tutulumu olmasına karşın) radyoaktivite tutulumu açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Grup C'de (5 μ gr/kg GM-CSF) Grup A ve Grup B'ye göre iki katına varan düzeyde koloid tutulumuna karşın bu fark istatistiksel açısından anlamlı bulunmadı.

Grup C ile Grup D arasında radyoaktivite tutulumu açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

DALAK İÇİN :

Grup A ile Grup B arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. Grup A ile Grup D arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı.

Grup C'de (5 μ gr/kg GM-CSF) Grup A ve Grup B'ye göre iki katına varan koloid tutulumu olmasına karşın istatistiksel açısından anlamlı fark saptanmadı.

Grup C ile Grup D arasında istatistiksel açısından

TABLO 1: DENEKLERİN KOLLOİD AKTİVİTE TUTULUMU İLE İLGİLİ İSTATİSTİKSEL VERİLERİ

		Ar. Ort ± SD	n	median	(min-maks)
Grup A	Dalak	4.5±0.85	(8)	4.5	(3.24-5.96)
	Karaciğer	5.6±0.82	(8)	5.8	(4.50-6.63)
Grup B	Dalak	5.2±0.83	(8)	5.6	(3.7-5.99)
	Karaciğer	5.8±0.63	(8)	6.0	(4.85-6.63)
Grup C	Dalak	5.3±1.13	(9)	6.1	(3.41-6.38)
	Karaciğer	5.9±1.23	(9)	6.7	(3.58-6.88)
Grup D	Dalak	6.1±7.74	(8)	6.1	(6.07-6.27)
	Karaciğer	5.9±0.41	(8)	5.8	(5.58-6.90)
TOTAL	Dalak	5.3±0.98	(33)	5.8	(3.24-6.38)
	Karaciğer	5.8±0.82	(33)	5.9	(3.58-6.90)
2) Kruskal Wallis = $\chi^2 = 6.13$		$p = 0.003$ ($p < 0.005$)			
3) Anlamlı Farklılık gösteren gruplar:					
Grup A-B (Dalak)		$U = 0.000$			
		$P = 0.001$			
Grup A-D (Dalak)		$U = 0.000$			
		$P = 0.001$			
Grup A-D (Karaciğer)		$U = 0.000$			
		$P = 0.001$			
		$p < 0.05$			
		$P < 0.05$			
		$p < 0.05$			

anlamlı fark saptanmadı. Sonuçlar ile ilgili istatistiksel veriler Tablo 1-2 ve 3'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Gram (-) sepsis ve bunun ortaya çıkaracağı sekeller tıkanma sarılığı olgularında görülebilen önemli problemlerdir. Retiküloendotelial sistem (RES) mezenkimal hücrelerden ve makrofajlardan oluşmaktadır. Karaciğer (KC), dalak, akciğer, lenf bezleri ve kemik iliği bu sistem içinde yer alır. Özellikle karaciğer ve dalak RES'in en önemli parçalarını oluşturmaktadır. RES organizmalarına karşı bir defans oluşturmaktır, ölü hücrelerin, hücre debrislerinin ve inorganik materyalin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Immunolojik cevabı sağlanırken, monositlerin, prostoglandinlerin ve nötrofillerin sentezini sağlamaktadır (6).

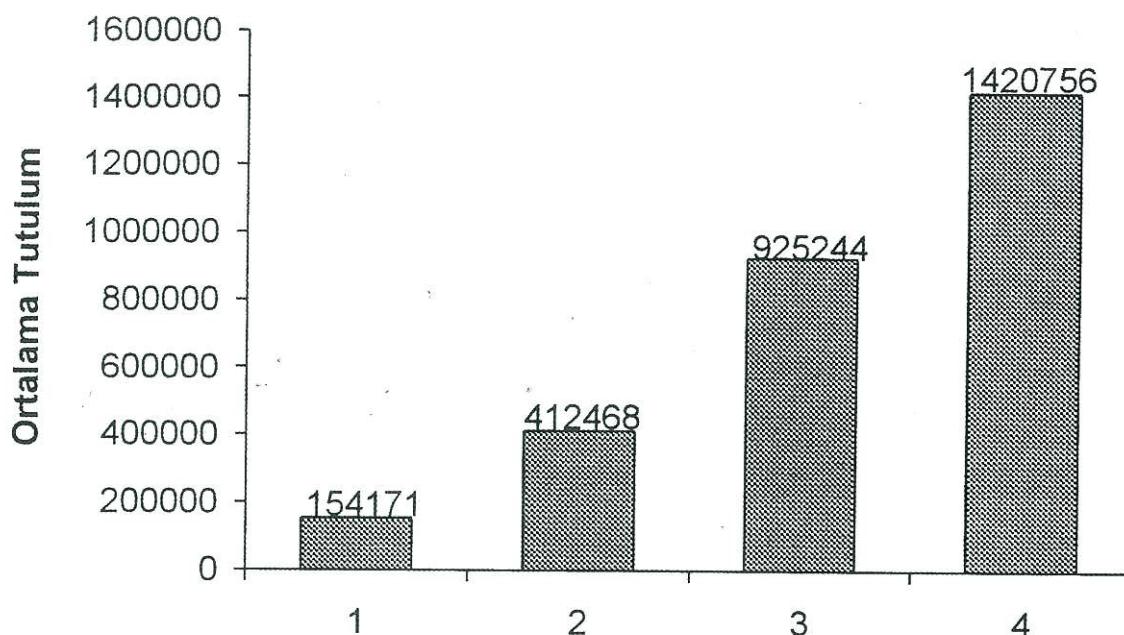
Tıkanma sarılığında RES'in fagositik fonksiyonlarında inhibisyon ortaya çıkmaktadır. Biliyer obstrüksiyon ne kadar uzun sürese RES hücrelerinin bakteri ve endotoksinleri yok etme yeteneği de bozulmaktadır (7). Vücuttaki mononükleer hücre populasyonunun % 80-90'ını kupffer hüc-

releri ve makrofajlar oluşturur. Normalde portal dolaşımı geçebilen küçük miktarlardaki endotoksinler kupffer hücreleri tarafından temizlenmektedir. Böyle bir durumda kupffer hücreleri aktivite olmakta ve aynı zamanda salınan inflamatuuar mediatörler bir immün cevap oluşturmaktadır. Ancak proinflamatuuar kaskaddaki bu aktivasyon ve oluşan cevap ısrarlı ve kontrol edilemez şekilde devam ederse bu immun cevap sistemik inflamatuuar cevap sendromuna yol açmakta, çoğul organ yetmezliği içinde zemin oluşturmaktadır (8).

Tıkanma sarılığında safranın barsağa ulaşamaması sonucunda intestinal mukoza safra tuzları, pigmentleri ve fosfolipidlerden faydalananamamaktadır. Safra tuzlarının olmaması sonucu hepatik IgA üretimi azalmakta ve intestinal mukozal düzen bozulmaktadır. Sonuçta bakteri populasyonu artmakta ve bakteriyel translokasyon ortaya çıkmaktadır (9,10).

Tıkanma sarılığında endotoksinlerin RES ve karaciğerdeki kupffer hücreleri tarafından etkisiz hale getirilmesi kesintiye uğramaktadır. Endotoksin ve özellikle lipopolisakkaritlerin sistemik sirkulasyona geçmesi tıkanma sarılığında bir çok

TABLO 2: RATLarda GRUPLARA GÖRE DALAKTA RADYOAKTİVİTÉ TUTULUMU



komplikasyonun temelinde yatan sistemik endotoksemiyi ortaya çıkarmaktadır (11).

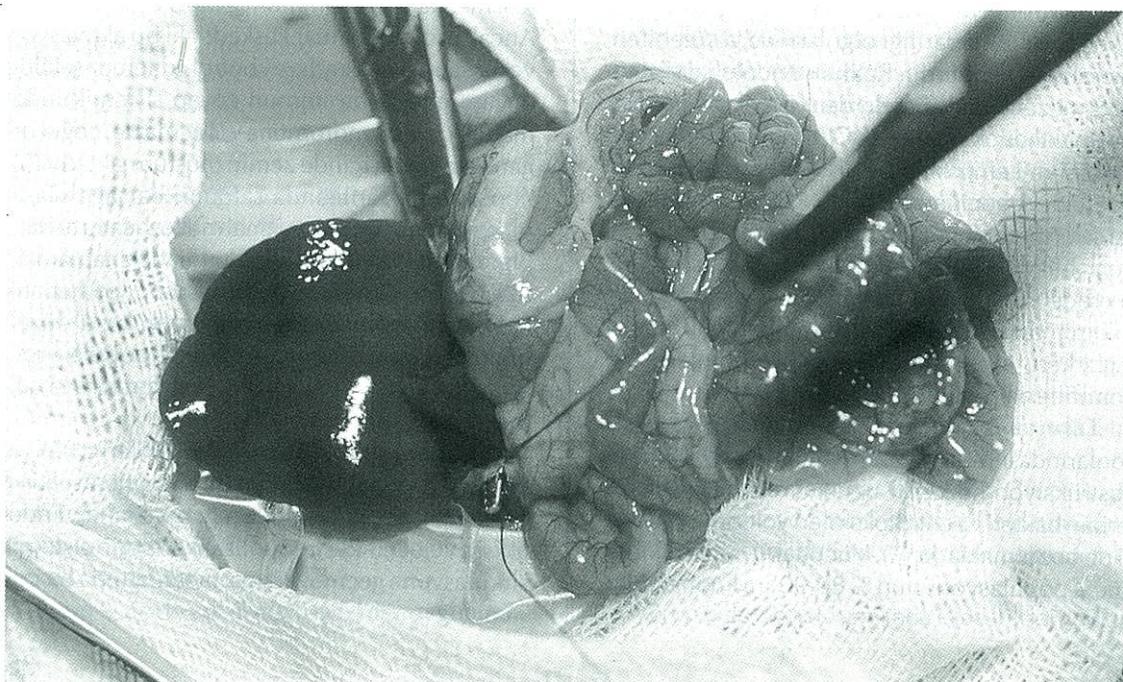
Kupffer hücreleri TNF ve IL-6'nın esas kaynaklarıdır. Yapılan deneysel çalışmalarında tıkanma sarılığında peritoneal makrofaj ve monositlerden sitokin sekresyonunun arttığı gösterilmiştir (12).

Tanaka ve arkadaşları Tc99 sülür koloid uygulayarak tıkanma sarılığı oluşturdukları deneklerde kupffer hücre kolloid tutulumunu irdelediler ve tıkanma sarılığında RES aktivitesinde

yetmezlik olduğunu gösterdiler (13).

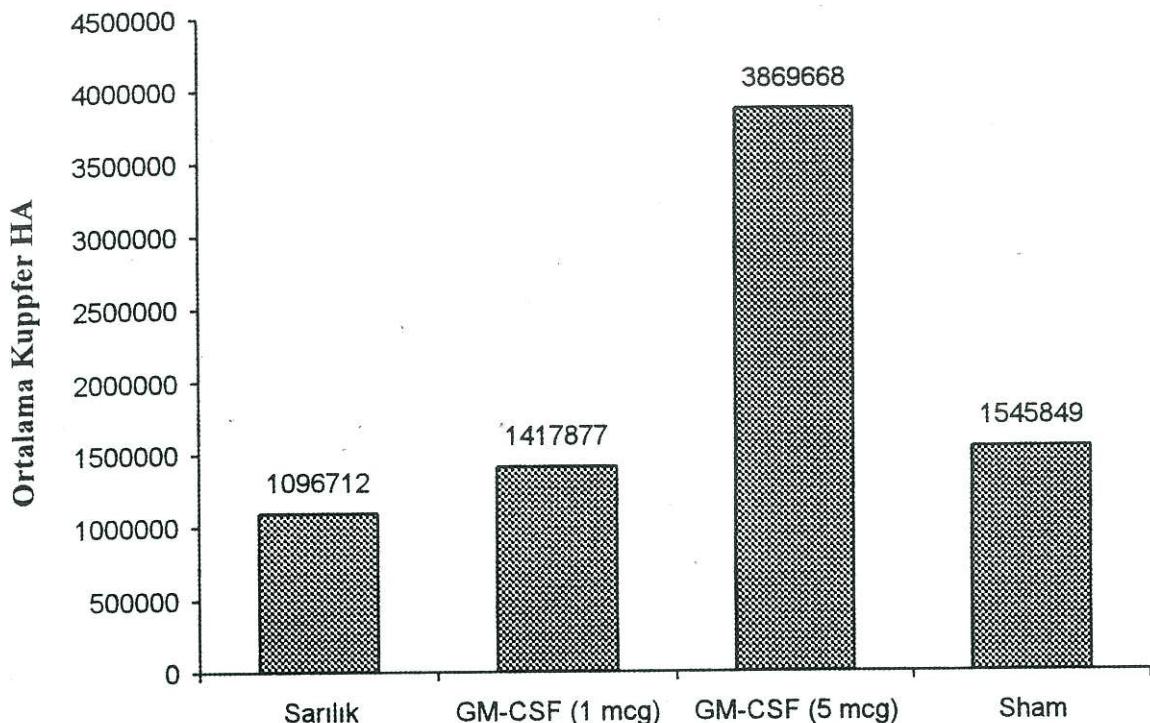
Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) hematopoietik bir büyümeye faktörü olup nötrofil kemotaksisini ve makrofaj aktivitesini uyarmaktadır. Kemik iliğindeki öncü hücreleri stimüle etmekte ve fagositozu uyarmaktadır (14).

Tıkanma sarılığında RES aktivitesindeki depresyonun GM-CSF ile nasıl etkileneceğini incelemek amacıyla böyle bir deneysel çalışma planladık.



Resim 1: Koledok ligasyonu yapılan denek

TABLO 3: RATLarda GRUPLARA GÖRE KC RADYOAKTİVİTÉ TUTULUMU



Karaciğerde Grup A ile Grup D arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı. Grup C ($5 \mu\text{gr}/\text{kg}$ GM-CSF) de A ve B'ye göre iki katına varan düzeyde kolloid tutulumu olmasına karşın bu fark anlamlı bulunmadı. Çalışmamızda dalak için kolloid tutulumuna bakınca Grup A ile Grup B ve Grup D arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. Karaciğer için sonuçlara bakıldığına GM-CSF uygulanmayan sarılık grubunda kolloid aktivitesi düşük bulundu. Bunun sebebinin tikanma sarılığının RES'deki depresif etkisine bağlı olduğunu düşünüyoruz.

Yine Grup C'de A ve B'ye göre 2 katına varan düzeyde kolloid tutulumu olmasına karşın istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Hem karaciğer hem de dalakta Grup C ($5 \mu\text{gr}/\text{kg}$ GM-CSF) ile Grup D (sham) grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı. Her iki organda da $1 \text{kgr}/\text{kg}$ GM-CSF uygulanan grupla (B), sham (D) grubu arasında fark olmamasını ilacın dozunun yetersiz olmasına ve doz cevap ilişkisine bağladık.

GM-CSF ve G-CSF ile yapılan çalışmalara bakıldığına; Paksoy ve arkadaşları splenektomi uygulanan deneklerde bakteriyel translokasyonun arttığını, G-CSF ile belirgin olarak azaldığını göstermişlerdir (15). Tikanma sarılığında GM-CSF uygulanması ile immün parametrelerin düzeltilebileceği deneysel olarak gösterilmiştir (16). İpek ve arkadaşları terminal ileumun bağ-

lanma modeli ile oluşturdukları bakteriyel translokasyona G-CSF'nin önleyici etkisinin olduğunu gösterdiler (17).

Cantürk ve arkadaşları diyabet ve deneysel sepsis modelinde G-CSF'nin immün parameteleri restore ettiğini gösterdiler (18).

Yalçın ve arkadaşları deneysel çalışmalarında yanık sepsisinde gelişen bakteriyel translokasyonun G-CSF uygulanması ile önlenliğini gösterdiler (19). Bozkurt ve arkadaşları tikanma sarılığı oluşturdukları deneklerde G-CSF uygulanmasının bakteriyel translokasyona etkisini araştırırlar ve G-CSF'nin translokasyonu azalttığını gösterdiler (20).

Çalışmamızda tikanma sarılığı oluşturduğumuz deneklerde RES aktivitesinin deprese olduğu görülmektedir. Özellikle $5 \mu\text{gr}/\text{kg}$ GM-CSF uyguladığımız Grup C'de hem karaciğerde, hem de dalakta sham grubu ile yakın sonuçların bulunması bize GM-CSF'nin tikanma sarılığında RES fonksiyonlarını aktive ve restore ettiğini göstermektedir. Sonuç olarak tikanma sarılığında bozulmuş RES fonksiyonlarının restorasyonunda GM-CSF'nin olumlu etkisi deneysel çalışmamızda gösterilmiştir.

Tikanma sarılığının ciddi ve mortalitesi yüksek septik komplikasyonlarının önlenmesinde, RES fonksiyonlarının düzeltilmesinde GM-CSF kullanılmasının klinik çalışmalar ile desteklenmesi sonucunda yer bulacağı düşünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cunzoz M, Potel, Puente J: Anergy in jaundiced patients. *Br J Surg.* 1988; 75: 147-149.
2. O'Conner AM, Wilton PB, Barke RA et al: Effects of biliary obstruction on hepatic clearance of bacteria. *Arch Surg* 1989; 124: 673-677.
3. Pain JA, Cahill CJ, Bailey ME: Perioperative complications in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1985; 72: 942-945.
4. Katz S, Grosfeld JL, Gross K et al: Impaired clearance and trapping in obstructive jaundice *Ann. Surg* 1984; 199: 14-20.
5. Anderlini P, Przeplorka D: Biologic and clinical effects of granulocyte colony stimulating factor in normal individuals. *Blood* 1996; 88 (8): 2819-2825.
6. Pain JA: Reticuloendothelial function in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1987; 74: 1091-4.
7. Holman JM, Rikkers LF: Reticuloendothelial function and biliary obstruction. *Curr Surg* 1980; 37: 366-367.
8. Kennedy JA, Clements W.D.B, Kirk SJ, MC Caigue MD, Campbell GR, Erwin PJ, Halliday MI, Rowlands BJ: Characterization of the Kupffer cell response to exogenous endotoxin in a rodent model of obstructive jaundice. *Br. J. Surgery* 1999; 86: 628-633.
9. Roughreen PT, Drath DB et al: Impaired nonspecific cellular immunity in experimental cholestasis. *Ann Surg* 1987; 206: 578-82.
10. Bailey ME: Endotoxin, bile salts and renal function in obstructive jaundice *Br J Surg.* 1976; 63: 774-8.
11. Holman JM, Rikkers LF: Biliary obstruction and host defense failure *J Surg Res* 1982; 32: 208-13.
12. Puntis MCA, Jiang WG: Plasma cytokine levels and monocyte activation in patients with obstructive jaundice *J. Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 7-13.
13. Tanaka N, Ryden S, Serggvist L: Reticulo-endothelial function in rats with obstructive jaundice *Br J Surg* 1985; 72: 946-949.
14. Glasp JA, Colde DW: Granulocyte colony-stimulating (G-CSF): Preclinical and clinical studies *Semin Oncol* 1992; 19: 386-394.
15. Paksoy M, İpek T, Oral C, Polat E, Doğusoy G: The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on bacterial translocation in the splenectomized rat. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 411-416.
16. Çağlıkulekçi M, Ayaz S, Bayramoğlu E, Akoğlu M, Demirbağ A, Yılmaz S, Kırımlıoğlu V: Granulosit Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktör Uygulanmasının Tıkanma Sarılığı oluşturulan Deneklerde İmmünlük Parametrelere Etkisi. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 1998 14 (5): 309-315.
17. İpek T, Paksoy M, Oral C, Doğusoy G, Ülker G: Ratlarda granulosit-koloni stimulan faktörün bakteriyel translokasyona etkisi. *Türkiye Tıp Dergisi* 1996; 3: 79-84.
18. Cantürk Z, Önen F: effects of granulocyte colony stimulating factor against septicaemia on diabetic rats. *Surgical infection society Annual Meeting May 1997. Abstract book.* Kocaeli University School of Medicine.
19. Orhan Y, Gürsel S, Ferda K, Hakkı K et al: Effects of granulocyte colony-stimulating factor on bacterial translocation due to burn wound sepsis. *Surg Today* 1997; 27: 154-158.
20. Bozkurt S, Çelik F, Ekinci Ö: Tıkanma Sarılığında Granulosit Koloni Stimulan Faktör Uygulanmasının Bakteriyel Translokasyona Etkisi. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 1998; 14 (5): 316-322.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr.Mehmet ÇAĞLIKÜLEKÇİ
Mavi Şehir 85 624 sok. No.36
06530 Çayyolu, ANKARA