

Sıçanlarda İndüksiyon Koliti Zemininde Enoksaparinin Anastomoz İyileşmesi Üzerine Etkisi

The Effects of Enoxaparine on Anastomotic Healing in Rats with Chemical Induced Inflammatory Bowel Disease

HAKAN M. KÖKSAL, A. DENİZ ERTÜRK, M. FEVZİ CELAYİR, SADIK YILDIRIM, MUHARREM ÖNER, ADİL BAYKAN
Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1.Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul

ÖZET

Amaç: İnflamatuvar Barsak Hastalıkları (İBH) sık görülen, kronik bir hastalık grubudur. Bu hastalıkların seyri süresince gelişen komplikasyonları nedeniyle acil ya da planlı cerrahi müdahaleler ve özellikle Crohn Hastalığı'nda zaman zaman hastalıklı barsak segmentinde striktüroplastiler uygulanmaktadır. Ortaya çıkabilecek komplikasyonlar, İBH zemininde yapılacak olan anastomozun güvenilirliğine etki eden faktörlerin bilinmesini önemli kılar. Bu çalışmada amacımız düşük molekül ağırlıklı heparininin hem kolit üzerine, hem de kolit zeminindeki anastomozu olan etkisini incelemektir.

Hastalar ve Yöntem: Çalışmada 72 adet genç erişkin Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 5 gruba ayrıldı. 2, 3, 4 ve 5. gruplar iki alt gruptan oluştu. 1.grup (n=8): kontrol; 2. grup (n=16): kolit; 3. grup (n=16): kolit+enoksaparin; 4.grup (n=16): kolit+anastomoz; 5. grup (n=16): kolit+ enoksaparin +anastomoz şeklinde oluşturuldu. Denekler rektal yoldan trinitro-benzen sülfonik asid verilerek kolit oluşturuldu. Kolitin 3. günü tedavi alan gruplara 80 g/kg enoksaparin intraperitoneal olarak verilmeye başlandı. Tedavinin 2. günü cerrahi uygulanacak grupların kolitli distal kolonlarına tam kat kesi yapılarak anastomoz yapıldı. İlk alt gruplar post-op 1.gün, ikinci alt gruplar post-op 5. gün sakrifiye edildiler. Alınan dokular makroskopik hasar skalası ve mikroskopik hasar kriterlerine göre değerlendirilirken, dokularda myeloperoksidaz aktivitesi(MPO), lipid peroksidaz (LPO), glutatyon(GSH) ve hidroksiprolin(HP) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Tedavi alan, cerrahi uygulanmış ve uygulanmamış tüm gruplarda makroskopik hasarın ve MPO düzeylerinin azaldığı, GSH düzeylerinin ise arttığı saptanırken mikroskopik hasar, LPO ve HP düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Enoksaparinin anastomoz üzerine herhangi bir yan etkisi saptanmamıştır.

Sonuçlar: Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinler, İBH zemininde yapılacak anastomozlarda iyileşme üzerine olumsuz etkileri olmadığından ve inflamasyonu azalttıklarından perioperatif dönemde kullanılabilirler, ancak bu verilerin desteklenebilmesi için daha çok kontrollü klinik ve deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Deneysel kolit, Heparin, Düşük molekül ağırlıklı heparin, TNBS, Miyeloperoksidaz.

ABSTRACT

Purpose: Bowel resection and anastomosis is required in a substantial number of patients with inflammatory bowel disease either in emergent or elective setting during their lifespan. In this experimental study we aimed to investigate the role of low molecular weight heparin on anastomotic healing in rats with chemical induced inflammatory bowel disease.

Patients and Methods: Seventy-two adult male Sprague Dowley(200 g-250 g) rats, divided in 5 groups; Group 1 (n=8): control, Group 2 (n=16): colitis, Group 3:(n=16) colitis + enoxaparine, Group 4: (n=16) colitis + anastomosis, Group 5: (n=16) colitis + enoxiparine + anastomosis. Colitis was induced by intrarectal installation of 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid in 50% ethanol (TNBS). Enoxaparin 80ig/kg was started intraperitoneally from 3rd day of colitis. At 2nd day of the treatment bowel divided and anastomosed at distal colon with experimental colitis. Each group subdivided in two as to those sacrificed on post operative day1 and 5. During sacrifices colonic resection encompassing anastomoses were performed. Specimens were assessed according to macroscopic and histologic tissue damage scale. Myeloperoxidase (MPO), Lipide Peroxisase (LP), Glutation (GSH) and Hydroxiprolin (HP) levels were also measured from colonic tissues.

Results: Enoxaparin therapy decreased the severity of macroscopic damage and the levels of MPO increased the levels of GSH in all groups but no significant difference was observed for microscopic damage and of LP and HP levels. No undesirable effect of enoxiparine on the anastomotic healing was observed.

Conclusion: LMWH have no untoward effect on anostomotic healing and it also seems to decrease inflammation and can safely be used during perioperative period. But these data indicate the need for a larger investigation

Key words: Experimental colitis, Heparin, Fractioned heparin, TNBS, Myeloperoxidase.

Başvuru Tarihi: 05.02.2009, Kabul Tarihi: 05.03.2009

Dr. Hakan Köksal

Zeytinoğlu Cad. Beyaz Köşk Apt.(67) Da:2 Akatlar
Beşiktaş 34335 İstanbul

Tel: (212)2340808, Fax: (212)2340808, Cep tel.:5053987637
e-mail:hakanmkoksal@yahoo.com

Giriş

İnflamatuar Barsak Hastalıkları (İBH), intestinal inflamasyon ve mukozal doku hasarıyla başlayan, intestinal ve ekstraintestinal belirtilere sebep olan, bozulmuş immün cevapla ilerleyen, sık görülen kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır. İnflamatuar Barsak Hastalıkları (İBH) seyri süresince gelişen komplikasyonları nedeniyle acil ya da planlı cerrahi müdahaleler ve özellikle Crohn Hastalığı'nda zaman zaman hastalıklı barsak segmentinde striktüroplastiler gibi tekrarlayan ameliyatlara gereksinimler olmaktadır. Ortaya çıkabilecek komplikasyonlar, İBH zemininde yapılacak olan anastomozun güvenilirliğine etki eden faktörlerin bilinmesini önemli kılar.

Düşük molekül ağırlıklı heparin ve heparinin etkilerinin İBH zemininde araştırıldığı çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar mevcuttur.^{1,2} Hiperkoagülasyon durumu, tromboembolik olayların insidansındaki artış, toksik megakolon, piyoderma gangrenozum gibi iskemik komplikasyonlar heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparinlerin (DMAH) antikoagülan etkileri nedeni ile İBH tedavilerinde yeri olabileceğini göstermektedir. Ayrıca heparin ve DMAH'ler antiinflamatuvar etki³⁻¹³ ve syndecan-1^{2,14,15} gibi etkileri sebebi ile İBH tedavilerinin protokollerinde yer almaktadır. Heparine göre DMAH'lerin artıları, klinik ve deneysel kullanımlarda oldukça fazladır.

Yaygın kullanımlarına rağmen, İBH zemininde cerrahi uygulamalarında anastomoz üzerine olan etkileri konusunda elimizde olumlu ya da olumsuz bir veri bulunmamaktadır. Bu deneysel hayvan çalışmasında amacımız, düşük molekül ağırlıklı heparin enoksaparinin hem kolit üzerine, hem de kolit zemininde yapılan anastomozla olan etkisini incelemektir.

Hastalar ve Yöntem

Çalışmamız, Marmara Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı Deney Hayvanı Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alınarak yürütülmüştür.

Çalışmada 150-300 gr ağırlığında, eşit sayıda dişi ve erkekten oluşan 72 adet genç erişkin Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı.

Çalışmamızda, çeşitli deneysel kolit modellerinden en kolay uygulanabilir olan indüklemeye modelini seçtik. Erken evrede kronik inflamasyon oluşturması, çalışma sonuna kadar spontan remisyon gelişmemesi, patogenezin benzer olması, histopatolojik ve klinik bulguların

benzerlik göstermesi nedeni ile trinitro-benzen sülfonik asid (TNBS) ile oluşturulmuş kolit modelini tercih ettik. Denekler 5 gruba ayrıldı. İkinci, 3, 4 ve 5.gruplar iki alt gruptan oluştu (Tablo 1).

1.Grup: Kontrol grubu (n=8)

2.Grup: TNBS ile kolit oluşturulan grup (n=16), çalışma grubunun sakrifasyon günlerine uygun olarak sakrifiye edilen iki alt gruba ayrıldı.

3.Grup: TNBS ile kolit oluşturulduktan sonra DMAH uygulanan grup (n=16). Bu grup da çalışma grubunun sakrifasyon günlerine uygun olarak sakrifiye edilen iki alt gruba ayrıldı.

4.Grup: TNBS ile kolit oluşturulup barsak anastomozu yapılan grup (n=16). Bu grup da benzer şekilde iki alt gruba ayrıldı.

5.Grup: Çalışma grubu (n=16). TNBS ile kolit oluşturulduktan sonra düşük molekül ağırlıklı heparin başlanıp, uygulamanın 2.gününde barsak anastomozu yapılan grup. Bu grup denekler anastomozun 1.günü ve 5.günü sakrifiye edildiler.

Tablo 1. Çalışma grupları.

1	Kontrol
2A	Kolit (6. gün)
2B	Kolit (11.gün)
3A	Kolit + Enoksaparin (kolitin 6., tedavinin 2. günü)
3B	Kolit + Enoksaparin (kolitin 11., tedavinin 6. günü)
4A	Kolit + Cerrahi (kolitin 6., anastomozun 1. günü)
4B	Kolit + Cerrahi (kolitin 11., anastomozun 5. günü)
5A	Kolit + Enoksaparin + Cerrahi (kolitin 6., tedavinin 2., anastomozun 1.günü)
5B	Kolit + Enoksaparin + Cerrahi (kolitin 11., tedavinin 6., anastomozun 5.günü)

Deneysel kolit, 24saatlik açlığı takiben eter ile oluşturulan genel anestezi altında, anal kanaldan yerleştirilen 8cm'lik kateter ile % 37etanoldeki TNBS solüsyonundan (1ml'de 25mg TNBS) 1ml verilerek oluşturuldu. Denekler kolit oluşturulmadan önce tartıldı. Çalışma grubunda kolit oluşumunun 3.gününde tüm deneklere 80µg/kg/gün dozunda günde tek doz enoksaparin intraperitoneal olarak verilmeye başlandı. Tüm deneklere sakrifasyon gününe kadar verilmeye devam edildi. Enoksaparin uygulamasının 2.gününde 24saatlik açlığı takiben tüm deneklere ketamin, klorpromazin anestezisi verilerek laparotomi yapıldı. Distal kolonda, hastalıklı bölümde

doku çıkartılmadan tam kat kesi yapılarak 4/0 yuvarlak prolen ile tek tek sütürlerle barsak devamlılığı sağlandı. Tüm cerrahi işlemler steril koşullarda uygulandı. Operasyon günü deneklerin sadece su içmesine izin verildi. İlk alt grup barsak anastomozunun 1.gününde sakrifiye edilirken diğer alt gruba enoksaparin verilmeye devam edildi ve post-operatif 5.gün sakrifiyasyon gerçekleştirildi. Sakrifiyasyon dekapitasyon yolu ile yapıldı. Tüm denekler sakrifiyondan hemen önce tartılarak her grup için vücut ağırlığındaki değişiklik ortalama değer olarak hesaplandı.

4.gruba kolit oluşturulduktan sonra herhangi bir drog uygulanmadan sadece anastomoz yapılarak ilk alt grup post-operatif 1.gün, ikinci alt grup ise 5.gün sakrifiye edildi.

3.gruba yalnız enoksaparin uygulaması yapıldı. Bu grup herhangi bir cerrahi işleme tabi tutulmadı. Alt grupların sakrifiyasyonları çalışma grubu ile eş zamanlı olarak gerçekleştirildi.

2. grupta sadece kolit oluşturuldu. Drog uygulaması ya da cerrahi işlem yapılmadı. Bu grupta da sakrifiyasyon çalışma grubu ile eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu sağlıklı sıçanlardan oluşturuldu. Bu gruptaki denekler (n=8) ilk alt gruplarla aynı gün sakrifiye edildi.

TNBS ile oluşturulmuş kolitin düzeyi klinik olarak vücut ağırlığındaki kayıp ve dışkı kalitesi ile değerlendirilirken, biyokimyasal olarak dokudaki myeloperoksidaz aktivitesi (MPO), lipid peroksidaz (LPO) ve glutatyon (GSH) düzeyi, makroskopik skala ve histopatolojik inceleme ile değerlendirildi. Anastomoz iyileşmesi dokuda hidroksiprolin (HP) düzeyi ölçümü ile değerlendirildi. Denekler kolit oluşturulmadan önce ve sakrifiyondan önce tartılarak vücut ağırlığındaki kayıp her grup için ortalama değer olarak ölçüldü.

Kolit düzeyinin makroskopik değerlendirmesi için sakrifiyondan sonra kolonun distal 8 cm'lik parçası çıkartılarak anti-mezenterik kenardan uzunlamasına açıldı. Makroskopik değerlendirme için Wallace ve ark.'ndan modifiye edilmiş makroskopik hasar skalası kullanıldı (Tablo 2).^{16,17}

Makroskopik skorlama yapıldıktan sonra dokular MPO, LPO, GSH, HP ölçümü ve mikroskopik değerlendirme için ayrıldı.

Histopatolojik inceleme için alınan dokular %10'luk formol solüsyonunda tespit edildi. Her dokudan lezyon bulunmuyorsa randomize, lezyon mevcutsa lezyonlu

Tablo 2. Makroskopik hasar skalası.

0	Hasar yok
1	Fokal hiperemi var, ülser yok
2	Hiperemi veya kolon duvarında kalınlaşma olmaksızın lineer ülserasyon
3	Bir bölgede inflamasyon ile birlikte lineer ülserasyon
4	İki ya da daha fazla bölgede ülserasyon ve inflamasyon bölgesi
5	İki ya da daha fazla majör ülserasyon ve inflamasyon, bir ya da daha fazla yerdeki hasarını 1 cm'den daha uzun kolon segmentini tutması
6-10	Ülser ve inflamasyon bölgesinin 2 cm'den daha uzun kolon segmentini tutması (her 1 cm'lik hasar için skor 1 birim artırıldı)

alanlardan 2-4 adet örnek alınarak rutin takip işleminden geçirildi. Parafin bloklara gömülen dokulardan 5 mikronluk kesitler alındı ve Hemotoksilen & Eosin boyası uygulandı. Histopatolojik inceleme Gue ve ark.'nın tanımladığı kriterler modifiye edilerek (vaskülit bu kriterler arasından çıkarılarak) yapıldı (Tablo 3).¹⁸

Tablo 3. Histopatolojik hasar kriterleri (Maksimum skor :10).

Nekroz	0 - 3
Submukozal ödem	0 - 3
İnflamatuar hücre infiltrasyonu	0 - 3
Perforasyon	0 - 1

Dokulardaki nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan MPO aktivitesi şu şekilde ölçüldü: Dokulardan alınan 0.2-0.3g ağırlığındaki örnekler 20Mm K₂HPO₄ (pH=7.4) çözeltisi ile 10 kez sulandırılıp homojenize edildikten sonra 12000 devirde 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüje edildi. Aynı hacimde %0.5'lik heksadesiltrimetilamonyum hidroksit içeren 50 Mm K₂HPO₄ ile yeniden homojenize edilen örneklerde MPO aktivitesi, O-dianizidin 2HCl'nin H₂O₂'e bağlı oksidasyonunun spektrofotometrik ölçümüyle saptandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 37°C'de 460nm absorbansta (1.0 ml/dk) meydana gelen değişiklik olarak değerlendirildi. Oksidan hasarın bir göstergesi olan dokudaki LPO miktarı ölçümü için 0.2-0.3 g ağırlığındaki doku örnekleri ağırlıklarının 10 katına denk gelen miktarda %10'luk

trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu ile Ultra Turrax (marka) doku homojenizatöründe homojenizasyonu takiben 3000 devir ve 4°C'de 15 dakika süreyle santrifüje edildi. Süpernatantlar ayrılıp 15000 devirde 8 dakika daha santrifüje edildi. Tiyobarbitürik asite (TBA) reaktif maddelerin oluşumu spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi ve $1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak, malonildialdehid (MDA) cinsinden ifade edildi. Glutatyon ölçümleri ise Ellman yöntemi modifiye edilerek, 0.3 M Na_2HPO_4 ve Ellman solüsyonlarına reaktif maddelerin oluşumu spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. Dokuda HP ölçümü için dokular serum fizyolojik ile homojenize edilip konsantr HCl ile dijestiyon işlemine tabi tutulduktan sonra Kloramin T ile oksitlendirildi. Isı ile pirol yapısına dönüştürülerek Ehrlich reaktifi (p-dimetilaminobenzaldehid) ile renklendirildi. Kivirikko'nun yönteminden¹⁹ modifiye Allen düzeltmesi yapılarak 540, 560 ve 580 nm'de spektrofotometre ile okundu.¹⁸

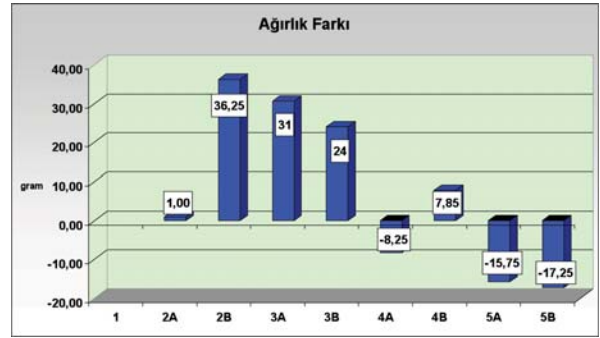
Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılımı test etmek için Kolmogorov Smirnov testi kullanıldı ve parametrelerimizin normal dağılım gösterdikleri görüldü. Gruplar arasındaki değerlendirmelerde Student t testi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

Bulgular

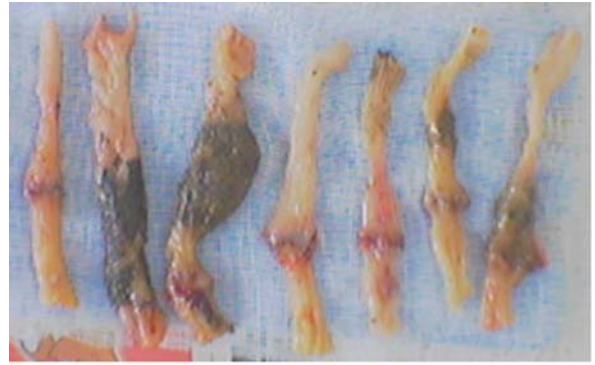
Deneklere TNBS uygulamasının 2. gününden itibaren tüm sıçanlarda sulu dışkılama olduğu gözlemlendi. Grupların çalışmanın başında ve sakrifikasyon günü ortalama ağırlıkları ölçüldü. Ancak 2A, 2B, 3A, 3B VE 4B'de ağırlık artışı saptanırken 4A, 5A ve 5B'deki sıçanların kilo kaybettiği görüldü, istatistiksel olarak anlamlılık saptanamadı (Grafik 1).

Makroskopik skalaya göre yapılan değerlendirmede tüm gruplarda hasar gözlenirken en fazla hasar 4A (Resim 1) ve 4B'de saptanmıştır.

5B grubunun makroskopik hasar düzeyleri 5A'ya göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). 3A grubunun makroskopik hasar düzeyleri 2A'ya göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer şekilde 3B grubunun makroskopik hasar düzeyleri



Grafik 1. Grupların ilk ve son ağırlık farkları.



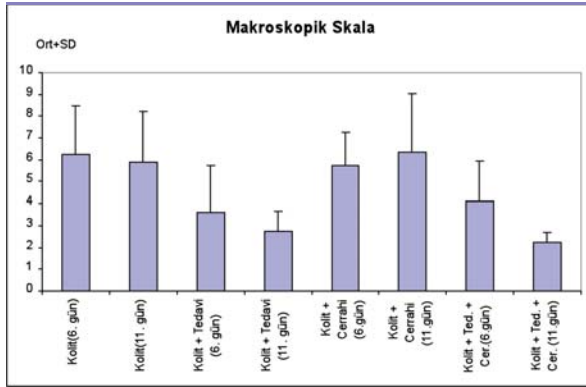
Resim 1. Grup 4A'nın (kolit + anastomoz grubu) fotoğrafı.

2B'ye (Resim 2) göre ileri düzeyde anlamlı düşük bulunurken ($p < 0.01$), 5B'nin makroskopik hasar düzeyleri 4B'ye göre ileri düzeyde anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0.01$). Diğer karşılaştırmalarda makroskopik hasar düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Resim 2. Grup 2B'nin (sadece kolit yapılan grup, kolitin 11. günü) fotoğrafı.

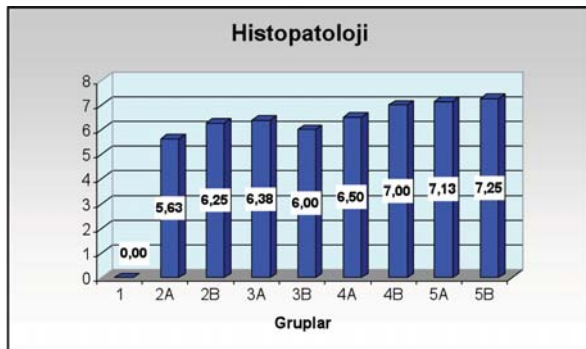
Makroskopik hasarda tedaviyle anlamlı fark saptanırken histopatolojik olarak benzer bir fark saptanamamış, patolojik olarak hasar düzeylerinin gruplar arasında benzer olduğu görülmüştür (Grafik 2).



Grafik 2. Makroskopik hasar düzeylerine göre grupların dağılımı.

Tablo 5'de görülen değerlendirmelere göre mikroskopik skala değerleri (Grafik 3) istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$).

Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda kolit oluşturulmuş ve bu hasarın göstergesi olan MPO aktivitesi tüm gruplarda kontrol grubu ile kıyaslandığında ileri derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$) (Grafik 5, 6) (Tablo 6).



Grafik 3. Gue ve ark.'nın 18 histopatolojik kriterlerinin modifiye edilmesiyle oluşturulan skalaya göre mikroskopik değerlendirme.

4A grubunun MPO düzeyi 4B'ye göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum anastomozun ikinci bir hasar oluşturduğu, bu yüzden post-operatif 5. günde, yani kolitin 11. gününde MPO değeri post-op 1. güne göre yüksek bulunmuştur. Benzer bir fark 5A ve 5B'nin karşılaştırılmasında saptanmazken daha önce kolit modelinde anastomoz yapılmış bir çalışma

olmadığından bu bulgumuzu destekleyecek herhangi bir literatür bilgisi mevcut değildir. Üstelik 3A'nın MPO düzeyi 5A'ya göre, 3B'ninki ise 5B'ye göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Bu da anastomozun ikinci bir hasar yaratıp yaratmadığı yargısını şüphede bırakmaktadır.

3A'nın MPO düzeyleri 2A'ya göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). 3B'nin MPO düzeyleri ise 2B'ye göre ileri düzeyde anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0.01$). Aynı şekilde 5A'nın 4A'ya göre, 5B'ninki

Tablo 4. MPO ölçümlerinin gruplara göre dağılımı.

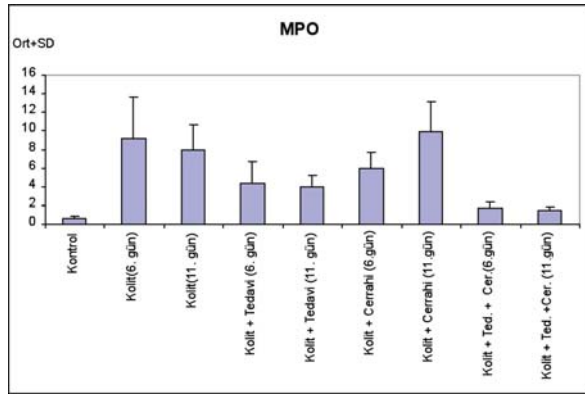
	MPO			
	N	Ort.	SD	Median
1	8	0,64	0,17	0,61
2A	8	9,18	4,45	9,30
2B	8	8,00	2,69	8,38
3A	8	4,37	2,34	3,68
3B	8	3,99	1,19	3,88
4A	8	6,01	1,63	6,14
4B	8	9,87	3,30	9,10
5A	8	1,76	0,54	1,74
5B	8	1,53	0,39	1,43
Toplam	8	5,04	3,92	3,99

	Test değ.	P
1 - 2A	5.429	0.001**
1 - 2B	7.732	0.001**
1 - 3A	4.507	0.003**
1 - 3B	7.853	0.001**
1 - 4A	9.278	0.001**
1 - 4B	7.895	0.001**
1 - 5A	5.645	0.001**
1 - 5B	5.907	0.001**
2A - 2B	0.641	0.532
3A - 3B	0.413	0.686
4A - 4B	2.965	0.010*
5A - 5B	0.979	0.344
2A - 4A	1.893	0.079
2B - 4B	1.241	0.235
3A - 5A	3.079	0.008**
3B - 5B	5.527	0.001**
2A - 3A	2.706	0.017*
2B - 3B	3.858	0.002**
4A - 5A	7.007	0.001**
4B - 5B	7.090	0.001**

* $p<0.05$ ** $p<0.01$, Student t test

ise 4B'ye göre ileri düzeyde anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Bu da bize yapılan çalışmalarda olduğu gibi enoksaparinin antiinflamatuvar etkilerine bağlı olarak koliti düzelttiğini göstermektedir. Ancak 3A ile 3B'nin ve 5A ile 5B'nin MPO değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Tedavi süresinin MPO değerlerini değiştirmediği sonucuna varılmıştır. Miyeloperoksidaz sonuçları ve karşılaştırmaları tablo 4 ve grafik 4'te özetlenmiştir.

Tıpkı MPO gibi lipid peroksidaz (LPO) da oksidan hasarın bir göstergesidir. Hasar fazla olduğunda LPO düzeyi de artar. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda LPO değerleri 2A'da ileri düzeyde anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). 2B'de ise $p<0.05$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Ayrıca 4B grubunun LPO düzeyleri kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Kontrol grubuna göre 3A, 3B, 4A, 5A ve 5B'nin LP değerleri anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Kolin 6. günündeki (2A) LP değeri 11.gündekine (2B) göre anlamlı düzeyde yüksek iken ($p<0.05$), anastomozlu barsakta tam tersi bir sonuç elde edilmiş, 4A'nın LPO değeri 4B'ye göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Grafik 4. MPO düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

3A'nın LP düzeyi 2A'ya göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.01$). Bu da enoksaparin kullanımına bağlanabilir.

2A grubunun LPO düzeyleri 4A'ya göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 5).

Dokuda oksijen metabolitlerine karşı koruyucu görevi olan glutatyon (GSH) düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 2A, 2B, 3A, 4A, 4B, 5A ve 5B'nin GSH değerleri ileri düzeyde anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.01$). Ancak 11.gün kilit+tedavi grubunun (3B) GSH düzeyleri ile kontrol grubu arasında

anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). Diğer tüm gruplarda GSH düzeyi düşerken 6 gün enoksaparin tedavisi alan grubun (3B) GSH düzeyi kontrol grubuna yakın olarak ölçülmüştür. Üstelik 6 gün enoksaparin alan grubun (3B) GSH düzeyleri de 2 gün tedavi uygulananlara (3A) göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 3A grubunun GSH düzeyleri 2A'ya göre anlamlı farklılık göstermemekle beraber ($p>0.05$); 3B'nin GSH düzeyleri 2B'ye göre ileri düzeyde anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Ayrıca 5A'nın GSH düzeyi 4A'ya göre ve 5B'nin GSH düzeyi de 4B'ye göre ileri düzeyde anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).

Tablo 5. LPO düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

	LPO			
	N	Ort	SD	Median
1	8	22,24	0,94	22,07
2A	8	34,5	5,87	36,03
2B	8	26,45	4,89	26,05
3A	8	23,44	1,89	23,74
3B	8	23,02	2,84	24,25
4A	8	23,57	2,84	23,81
4B	8	28,32	4,64	27,9
5A	8	23,82	4,89	23,87
5B	8	23,63	4,16	24,57
Toplam	8	25,44	5,25	24,64

	Test değ.	p
1 - 2A	5.832	0.001**
1 - 2B	2.390	0.046*
1 - 3A	1.610	0.138
1 - 3B	0.742	0.478
1 - 4A	1.258	0.229
1 - 4B	3.631	0.007**
1 - 5A	0.900	0.396
1 - 5B	0.384	0.922
2A - 2B	2.979	0.010*
3A - 3B	0.344	0.736
4A - 4B	2.470	0.030*
5A - 5B	0.085	0.934
2A - 4A	4.742	0.001**
2B - 4B	0.784	0.446
3A - 5A	0.207	0.841
3B - 5B	0.340	0.739
2A - 3A	5.072	0.001**
2B - 3B	1.712	0.109
4A - 5A	0.128	0.900
4B - 5B	2.126	0.052

* $p<0.05$ ** $p<0.01$, Student t test

Tablo 6. GSH düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

	GSH			
	N	Ort	SD	Median
1	8	1,88	0,2	1,87
2A	8	1,43	0,09	1,42
2B	8	1,31	0,16	1,31
3A	8	1,53	0,16	1,5
3B	8	1,82	0,2	1,78
4A	8	1,27	0,06	1,28
4B	8	1,38	0,19	1,35
5A	8	1,55	0,09	1,53
5B	8	1,65	0,14	1,65
Toplam	8	1,54	0,25	1,51

	Test değ.	p
1 - 2A	5.606	0.001**
1 - 2B	6.171	0.001**
1 - 3A	3.806	0.002**
1 - 3B	0.579	0.572
1 - 4A	8.085	0.001**
1 - 4B	4.957	0.001**
1 - 5A	4.097	0.001**
1 - 5B	2.579	0.022*
2A - 2B	1.792	0.095
3A - 3B	3.188	0.007**
4A - 4B	1.615	0.143
5A - 5B	1.758	0.101
2A - 4A	3.877	0.002**
2B - 4B	0.863	0.403
3A - 5A	0.305	0.765
3B - 5B	1.919	0.076
2A - 3A	1.555	0.142
2B - 3B	5.579	0.001**
4A - 5A	6.956	0.001**
4B - 5B	3.223	0.006**

*p<0.05**p<0.01, Student t test

Sadece kolit uygulanan grubun (2A) GSH düzeyi kolit+cerrahi uygulanan olgulara (4A) göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.01). Bu sonuçtan da cerrahi travmanın akut dönemde dokudaki GSH düzeyini azalttığı yorumunu çıkarabiliriz. Üstelik hem kolitin hem de anastomozun ilerleyen günlerinde yapılan GSH ölçümlerinin ilk günlerdekinden farklılık göstermemesi (2A ile 2B'nin ve 4A ile 4B'nin aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması (p>0.05)) (Tablo 6). Doku ve anastomoz iyileşmesini göstermek amacıyla dokuda HP ölçülmüş ancak matematiksel olarak Grup 5A ve 5B'de diğer gruplara göre yüksek değer elde

edilirken istatistiksel olarak hiçbir grupta HP değeri kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0.05).

Ayrıca tedavi alan gruplarla onların kontroller olan gruplar arasında da HP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (p>0.05).

Hidroksiprolin değerleri göz önüne alındığında enoksaparinin doku ya da anastomoz iyileşmesi üzerine olumlu ya da olumsuz bir etkisi gösterilememiştir (Tablo 7).

Tablo 7. HP değerlerinin gruplara göre dağılımı.

	HP			
	N	Ort.	SD	Median
1	8	1132.87	562.78	1221.50
2A	8	1206.12	301.00	1158.50
2B	8	1048.50	135.46	1014.00
3A	8	1055.12	185.20	1076.00
3B	8	960.12	343.49	948.00
4A	8	1048.12	872.02	841.50
4B	8	921.62	205.35	927.00
5A	8	112.25	438.58	1120.00
5B	8	1107.00	310.12	1196.00
Toplam	8	1066.86	414.14	1014.00

	Test değ.*	P
1 - 2A	0.325	0.750
1 - 2B	0.412	0.691
1 - 3A	0.371	0.720
1 - 3B	0.741	0.471
1 - 4A	0.231	0.821
1 - 4B	0.997	0.345
1 - 5A	0.042	0.967
1 - 5B	0.911	0.114
2A - 2B	1.351	0.198
3A - 3B	0.689	0.502
4A - 4B	0.399	0.696
5A - 5B	0.080	0.937
2A - 4A	0.484	0.636
2B - 4B	1.459	0.167
3A - 5A	0.399	0.696
3B - 5B	0.898	0.385
2A - 3A	1.208	0.247
2B - 3B	0.677	0.509
4A - 5A	0.215	0.833
4B - 5B	1.410	0.180

*Student t test

Tartışma

İnflamatuvar barsak hastalıklarında tıbbi tedavinin amacı aktif hastalık durumunda remisyonu sağlamak ve remisyonunda ise bu süreci uzatmaktır. Eski ve yeni tedaviler arasında Heparin ile yapılmış birçok klinik çalışmada heparinin çeşitli mekanizmalar ile İBH'nda etkili olduğu öne sürülmüştür. Heparinin üç ayrı mekanizma ile hem antiinflamatuvar hem de mikrovasküler düzeydeki antikoagülan özellikleri nedeniyle İBH'nda kullanılabilceği bildirilmiştir.^{8,10,13,20-22} Ağır aktif İBH olgularında heparin kullanılarak yapılan bir çalışmada heparinin etkileri kortikosteroidlerle karşılaştırılmış, klinik olarak her iki gruptan da benzer sonuçlar elde edilmiş ve heparinin aktif hastalıkta ilk tedavi seçeneği olabileceği öne sürülmüştür.²⁰ Başka bir çalışmada ise heparin, steroid dirençli ÜK vakalarında kullanılmış ve klinik olarak olumlu sonuçlar elde edilmiştir.²³ Ancak heparinin olumlu etkilerini ortaya koyan çalışmaların yanı sıra heparinin akut hastalıkta herhangi bir etkisinin olmadığını bildiren çalışmalarda mevcuttur.²⁴

Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinler(DMAH) heparine göre ek avantajları (antitromboembolik etkileri, uzun yarı ömürleri, kanamaya eğilimin daha az olması, yüksek biyoyararlanımları, kolay uygulanması ve heparine benzer antiinflamatuvar etkileri) nedeniyle klinik kullanımda heparine tercih edilmektedirler. DMAH'ler ile yapılan çalışmalarda aktif ÜK'te kortikosteroidlerle kombine tedavilerde DMAH'lerin steroid ihtiyacını azalttığı saptanmıştır.²⁵⁻²⁷ Bir başka çalışmada ise 5-ASA preparatları ile kombinasyonunda DMAH'lerin klinik, laboratuvar, endoskopik ve histolojik olarak iyileşmeyi hızlandırdığı tespit edilmiştir.^{3,4} Bu etkilerinin heparin gibi antiinflamatuvar ve antiembolik mekanizmaya bağlı olduğu belirtilmiştir. Ancak hafif ve orta derecede aktif ÜK hastalarında yapılan bir başka plasebo kontrollü çalışmada tinzaparin ile plasebo arasında klinik, endoskopik ve laboratuvar sonuçları açısından herhangi bir fark saptanamamıştır.²⁸

Deneysel kolit modelinde DMAH'ler ile yapılan çalışmalarda da DMAH'lerin olumlu sonuçlarına dair veriler elde edilmiştir. Dotan ve ark.'nın deneysel kolit modelinde hem heparin hem de enoksaparin kolit üzerine olan etkilerini araştırdığı çalışmada her ikisinin de makroskopik hasar, mikroskopik hasar, MPO ve nitrik oksid sentetaz aktiviteleri, mukozal PGE₂ düzeyleri ve kanda TNF- α düzeyleri üzerine olumlu etkileri tespit edilmiştir. Aynı çalışmada enoksaparinin optimum dozu

80 μ g/kg, heparinin ise 200 μ g/kg olduğu saptanmıştır. Biz de çalışmamızda bu çalışmayı referans olarak deneklere 80 μ g/kg dozunda enoksaparin uyguladık.^{3,4} Wan ve ark. ile Levine ve ark.'nın yaptığı benzer çalışmalarda da DMAH'lerin deneysel kolit modelinde makroskopik ve mikroskopik hasarı anlamlı ölçüde etkilediği ve MPO düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiş.^{5,9} Bizim çalışmamızda da cerrahi uygulanmamış-tedavi alan ve barsak anastomozu uygulanmış-tedavi alan gruplarda makroskopik hasar düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı saptanmıştır. Tedavi süresi uzadıkça anastomoz uygulanmış gruptaki iyileşme düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Bununla birlikte histopatolojik olarak anlamlı fark saptanamamıştır. Bu sonuç DSS ile oluşturulmuş kolit zemininde heparinin etkilerini araştıran bir çalışma ile benzerlik göstermektedir.²⁹

Çalışmamızda tedavi alan gruplarda almayanlara göre MPO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma tespit edilmiş, bu da literatür ile uygunluk göstermiştir. Ancak LPO düzeylerinde benzer sonuçlar elde edilememiş, sadece 2 gün tedavi alan-cerrahi uygulanmamış grupta anlamlı ölçüde azalma kaydedilmiştir.

Koruyucu nitelikteki glutatyon düzeyleri 6 gün enoksaparin tedavisi alan grupta anlamlı düzeyde yüksek bulunurken bu grubun GSH düzeyi 2 gün tedavi alan gruba göre de anlamlı olarak yüksek irlensaptanmıştır. Cerrahi uygulanan ve tedavi alan grupların GSH düzeyleri de almayanlara göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Literatürde deneysel kolit modeli ve DMAH'ler ile yapılmış çalışmalarda LP ve GSH düzeyleri ölçülmediğinden literatür ile uygun olup olmadığı belirlenememiştir.

Dokuların ve en önemlisi kolit zeminindeki anastomozun iyileşme düzeyini dokuda hidroksi prolin ile ölçtük. Ancak HP düzeyleri açısından anlamlı fark elde edemezken kolit zemininde HP ölçümü ile ilgili herhangi bir çalışma olmadığından bu sonucun da literatür ile uygunluğu değerlendirilememiştir.

Daha önce kolit zemininde yapılmış anastomoz üzerine herhangi bir ilacın etkilerini araştıran çalışma olmadığından anastomozun MPO, LPO, GSH ve HP düzeylerine etkisi konusunda olumlu ya da olumsuz herhangi bir veri bulunmamaktadır.

TNBS ile kolit oluşturulmuş sıçanlarda 80 μ g/kg dozunda enoksaparin uygulamasında herhangi bir yan etki

görülmezken, hem anastomoz uygulanan ve tedavi alan, hem de uygulanmayan ve tedavi alan gruplarda makroskopik hasar tedavi almayanlara göre azalmaktadır. Ancak, bu doz mikroskopik düzeyde belirlenen hasar üzerine hem cerrahi uygulanan hem de uygulanmayan gruplarda herhangi bir olumlu etki yapmamaktadır. Hasarın göstergesi olan MPO düzeyleri tedavi alan tüm gruplarda almayanlara göre anlamlı ölçüde azalmaktadır. Enoksaparin LPO düzeyinde anlamlı düşüş sağlayamamaktadır, ancak GSH değerlerini hem cerrahi uygulanan hem de uygulanmayan gruplarda yükseltmektedir.

Anastomoz iyileşmesinin göstergesi olan HP düzeylerine anlamlı etkisi olmamaktadır. Çalışma süresince enoksaparinin kolit zemininde yapılan anastomozla herhangi bir yan etkisi (kanama, anastomoz kaçağı.. gibi) gözlenmemiştir.

Düşük molekül ağırlıklı heparinler, İBH zemininde yapılacak anastomozlarda iyileşme üzerine olumsuz etkileri olmadığından ve inflamasyonu azalttıklarından perioperatif dönemde kullanılabilirler, ancak bu verilerin desteklenebilmesi için daha çok kontrollü klinik ve deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Malhotra S, Bhasin D, Shafiq N, Pandhi P. Drug treatment of ulcerative colitis: unfractionated heparin, low molecular weight heparins and beyond. *Expert Op Pharmacother* 2004;5:329-34.
2. Day R., Forbes A. Heparin, cell adhesion and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Lancet* 1999;354:62-5.
3. Dotan I, Hallak A, Arber N, Santo M, Alexandrowitz A, Knaani Y, Hershkoviz R, Brazowski E, Halpern Z. Low-dose low-molecular weight heparin (enoxaparin) is effective as adjuvant treatment in active ulcerative colitis: an open trial. *Dig Dis Sci* 2001;46: 2239-44.
4. Dotan I, Hershkoviz R, Karmeli F, *et al.* Heparin and low-molecular weight heparin (enoxaparin) significantly ameliorate experimental colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1087-97.
5. Levine A, Kenet G, Bruck R, *et al.* Effect of tissue binding activity of fibroblast growth factor and heparin-binding epidermal growth factor in experimental colitis in rats. *Pediat Resear* 2002;51: 635-40.
6. Xia B, Han H, Zhang K, *et al.* Effects of low molecular weight heparin on platelet surface P-selectin expression and serum interleukin-8 production in rats with trinitrobenzen sulphonic acid-induced colitis. *World J Gastroent* 2004; 10:729-32.
7. He G, Ouyang Q. The preventive and therapeutic effects of low molecular weight heparin on DSS-induced colitis in mice. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003;4:701-3.
8. Michell NP, Lalor P, Langman MJ. Heparin therapy for ulcerative colitis? Effects and mechanisms. *Europ J Gastroent Hepatol* 2001;13:449-56.
9. Wan MX, Liu Q, Wang Y, Thorlacius H. Protective effect of low molecular weight heparin on experimental colitis: role of neutrophil recruitment and TNF-alpha production. *Inflamm Res* 2002;51:182-7.
10. Papa A, Danese S, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Review article: potential therapeutic applications and mechanisms of action of heparin in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1403-1409.
11. Salas A, Sans M, Soriano A. Heparin attenuates TNF α induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut* 2000;47:88-96.
12. Carr J. The antiinflammatory action of heparin: heparin as an antagonist to histamine, bradykinin and prostaglandin E1. *Tromb Res* 1979;16:507-16.
13. Folwaczny C. Coagulation system and inflammatory bowel disease: therapeutic and pathophysiologic implications. *Z Gastroenterol.* 2002;40: 991-98.
14. Szabo S, Kusstatscyher G, Sakoulas G. Growth Factors: 'endogenous drugs' for ulcer healing. *Scand J Gastroent* 1995;30:15-18.
15. Kaplanski G, Fabrigoule M, Boulay V. Thrombin induces endothelial Type II activation in vitro IL-1 and TNFalpha dependent IL-8 secretion and E-selection expression. *J Immunol* 1997;58:5435-41.
16. Wallace JL, Keenan CM, Gale D, Shoupe TS. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroent* 1992;102:18-27.
17. Wallace JL, Le T, Carter L, Appleyard CB, Beck PL. Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *Pharmacol Toxicol Methods.* 1995;33:237-39.

18. Gue M, Bonbonne C, Fiaromonti J, *et al.* Stress-induced enhancement of colitis in rats: CRF and arginine vasopressin are not involved. *Am J Physiol* 1997; 272:84-91.
19. Kivirikko KI, Laitinen O, Prockop DJ. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Analytic Biochem* 1967;19:249-55.
20. Ang YS, Mahmud N, White B, *et al.* Randomized comparison of unfractionated heparin with corticosteroids in severe active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1015-22.
21. Folwaczny C, Fricke H, Endres S, *et al.* Antiinflammatory properties of unfractionated heparin in patients with highly active ulcerative colitis: a pilot study. *Am J Gastroent* 1997;92:911-12.
22. Folwaczny C, Wiebecke B, Loeschke K. Unfractionated heparin in the therapy of patients with highly active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1551-55.
23. Evans RC, Wong VS, Morris AI, Rhodes JM. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with heparin--a report of 16 cases. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:1037-40.
24. Panes J, Esteve M, Cabre E, *et al.* Comparison of heparin and steroids in treatment of moderate and severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000;119:903-908.
25. Torkvist L, Thorlacius H, Sjoqvist U, *et al.* Low molecular weight heparin as adjuvant therapy in active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1323-28.
26. Vrij AA, Jansen JM, Schoon EJ, *et al.* Low molecular weight heparin treatment in steroid refractory ulcerative colitis: clinical outcome and influence on mucosal capillary thrombi. *Scand J Gastroent* 2001;234:41-47.
27. Cui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. *World J Gastroent* 1999;5:448-50.
28. Bloom S, Kiilerich S, Lassen MR, *et al.* Low molecular weight heparin (tinzaparin) vs. placebo in the treatment of mild to moderately active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;15:871-78.
29. Korzenik JR, Hsu A, Robert ME. Effect of heparin on dextran sulfate sodium-induced colitis. *Dig Dis Sci* 1998;43:1800-05.