



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
LEVOBUPİVAKAİNİN ANTIİNFLAMATUAR ETKİNLİĞİ

Dr. Uğur DUMAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2009



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
LEVOBUPİVAKAİNİN ANTIİNFLAMATUAR ETKİNLİĞİ**

Dr. Uğur DUMAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Tuncay YILMAZLAR

BURSA – 2009

İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
Summary.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	5
Bulgular.....	11
Tartışma ve Sonuç.....	17
KAYNAKLAR.....	21
Ekler.....	23
Ek-1: Kısaltmalar.....	23
Teşekkür.....	24
Özgeçmiş.....	25

ÖZET

İnflamatuvar barsak hastalığının (IBH) tedavisinde çeşitli lokal anestezipler alternatif bir seçenek olarak önerilmiştir. Levobupivakain aminoamid grubuna dahil yeni ve uzun etkili bir lokal anesteziptir. Bu çalışmanın amacı IBH'nda levobupivakainin antiinflamatuvar etkinliğini araştırmaktır.

Çalışmamızda 30 adet erkek Sprague–Dawley cinsi sıçanda intramuskuler (i.m.) ketamin + xylazine ile anestezi uygulanmasını takiben trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) + etanol ile kolit oluşturuldu ve 10 adet sıçan da sham grubu olarak kullanıldı. Kolit oluşturulmasını takiben 7 gün boyunca, budesonide grubunda (n:10) 0,1 mg/kg budesonide; levobupivakain grubunda (n:10) 10 mg/kg levobupivakain; hastalık grubunda (n:10) ise sadece 1 ml serum fizyolojik rektal yoldan uygulandı. Sham grubunda kolit oluşturulmadı ve sadece rutin rektal kateterizasyon sağlandı. Deneyin 8. gününde tüm gruplardaki sıçanlara laparotomi ve histopatolojik inceleme için total kolektomi uygulandı. Total kolektomi sonrası tüm sıçanlar serum IL–6 ve TNF– α ölçümleri için intrakardiak yoldan yüksek miktarda kan alınarak sakrifiye edildi.

Ağırlık kaybı ve makroskopi skorları hastalık grubunda diğer 3 gruba göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,05$). Levobupivakain ve budesonide gruplarında hastalık grubuna göre histopatolojik iyileşme görülmeyle birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). TNF– α ölçümlerinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$). Levobupivakain grubunda IL–6 düzeyleri daha düşük olmasına rağmen budesonide ve hastalık grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$).

Makroskopi skorlarındaki iyileşme, histopatolojik değerlendirme skorlarında ortalama değerlerin gerilemesi ve IL–6 seviyesinin düşüklüğü bize levobupivakainin topikal uygulamada deneysel kolit modelinde

antiinflamatuvar etki potansiyelinin olabileceğini düşündürmekle birlikte istatistiksel analizler anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: trinitrobenzen sulfonik asit, kolit, levobupivakain, budesonide

SUMMARY

Antiinflammatory efficiency of levobupivacaine in an experimental colitis model

In the treatment of inflammatory bowel disease (IBD); various topical local anesthetics have been recommended as an alternative. Levobupivacaine is a new, long acting local anesthetic drug belonging to the amino amide group. The aim of this study was to investigate the antiinflammatory efficiency of levobupivacaine on IBD.

In our study; TNBS + ethanol induced colitis was performed in 30 rats after the rats were anesthetized with i.m. ketamin + xylazine; also 10 rats were used as sham group. As treatment; 0,1 mg/kg budesonide had been used in budesonide group (n:10), 10 mg/kg levobupivacaine had been used in levobupivacaine group (n:10), only 1 ml saline solution had been used in disease group (n:10) for 7 days by rectal route subsequent to induction of colitis. In sham group; only routine rectal catheterization was performed without induction of colitis. On the 8th day of experiment; laparotomy and total colectomy were performed for histopathological examination in all rats. The rats were sacrificed subsequent to total colectomy by intracardiac puncture to get blood sample for serum TNF- α and IL-6 measurements.

Weight loss and macroscopic examination scores were significantly higher in disease group than other 3 groups ($p < 0,05$). Budesonide and levobupivacaine groups showed histopathological improvement against disease group with no statistical significance ($p > 0,05$). There was no significant difference in TNF- α levels between all groups ($p > 0,05$). Although IL-6 levels were found to be decreased in levobupivacaine group; there was no statistical significance between levobupivacaine group and budesonide group or disease group ($p > 0,05$).

Despite the improvement in macroscopic scores, decrease in histopathological assessment scores and lower IL-6 levels suggest that levobupivacaine may have topical antiinflammatory effects in experimental colitis model; however, this finding was not supported by statistical methods.

Keywords: Trinitrobenzene sulfonic acid, colitis, levobupivacaine, budesonide.

GİRİŞ

İnflamatuvar barsak hastalığı (İBH) terimi genellikle benzer karakteristiklere sahip ve etyolojisi bilinmeyen iki hastalık olan ülseratif kolit ve Crohn hastalığını ifade etmek üzere kullanılır. Bu iki tablo arasındaki ayırım klinik ve patolojik kriterler üzerine kurularak yapılabilmekte ancak kolonda yerleşik hastalık olgularının %10–15’inde net ayırım yapılamamaktadır ve “belirsiz kolit” olarak isimlendirilmektedirler (1).

Crohn, Ginzburg ve Oppenheimer (2) tarafından 1932 yılında yayınlanan ve intestinal nonspesifik granülomatöz inflamasyon mevcut 52 hastadan oluşan seride; 13 hastada “rejyonel ileitis” tanımlanarak hastalığın formal klasifikasyonu ile birlikte nonkazeöz granülomlar ile ilişkisi de açıklanmıştır. Hastalığın sahip olduğu değişken klinik ve anatomik özellikler nedeniyle daha sonra bu hastalık “Crohn Hastalığı” olarak adlandırılmıştır.

Lockhart–Mummery ve Morson (3), 1960 yılında ülseratif kolit ve Crohn hastalığı arasındaki farklılıkları aydınlattıkları çalışmalarını yayınlamaya kadar Crohn hastalığının kolonik formu ile ülseratif kolit ayırımındaki karmaşa devam etmiştir.

Crohn hastalığı ağızdan anüse kadar gastrointestinal sistemin herhangi bir yerini tutabilen, kronik seyirli, progresif, granülomatöz inflamasyonla karakterize bir hastalıktır. İnce barsağın en sık görülen kronik hastalığıdır. Hastalık ilk tutulumunda en sık terminal ileumu veya ileokolik bölgeyi tutarken (%40), hastaların %15’inde hastalık kolonda sınırlı olabilir ve ülseratif koliti taklit edebilir.

Crohn hastalığı insidansı coğrafi lokalizasyona bağlı olarak 100000’de 1 ve 10 arasında değişkenlik gösterir. İskandinav ülkeleri, İskoçya, İngiltere ve Kuzey Amerika insidansın yüksek olduğu bölgelerdir. Bimodal yaş dağılımına sahiptir (4); ilk tepe noktası 15–30 yaş arasında görülürken ikinci tepe noktası 55–80 yaş arasındadır. Yahudi popülasyonda ve kentsel yerleşimlerde daha sık görülmektedir (5).

Etyolojisi halen gizemlidir ancak hastalığın manifest hale geçebilmesi için üç faktöre ihtiyaç olduğu öne sürülmüştür. Bu faktörlerin birincisi antijenik etki potansiyeline sahip bir ligand veya “tetik” olarak tanımlanır. İkincisi bu antijenik uyarının konak tarafından algılanabilmesi için defektif bir mukozal bariyer varlığıdır. Son olarak ise bu uyarana konağın aşırı cevabı üçüncü faktör olarak gereklidir (6).

Ülseratif kolit; kolon ve rektum mukozasını tutan, tekrarlayan inflamasyon ve ülserlerle karakterize, remisyon ve relapslarla seyreden kronik, idyopatik bir hastalıktır. İlk kez 1859 yılında Samuel Wilks tarafından tanımlanmış, sonraki yıllarda barsak mukozasındaki patolojik değişiklikler ortaya konmuştur (7). Lokalize formları proktit ve proktosigmoidit (distal kolit) olarak adlandırılır.

Ülseratif kolit her yaşta görülebilir, ancak en sık olarak 2.–3. dekatta başlar. Olguların %5–10’unda ailevi bir predispozisyon bulunur. Hastalığın sık olarak görüldüğü İngiltere’de insidans 100000’de 5 seviyesinde seyretmektedir. Tüm dünyada görülmesine ve birçok ırkı etkilemesine rağmen beyazlarda zencilerden daha sık rastlanır (8).

Crohn hastalığında olduğu gibi ülseratif kolitte de etyoloji belirsizliğini korumakla birlikte patogeneze; genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde immün sistemin disregulasyonuna bağlı oluşan aşırı otoimmün bir yanıt süreci sorumlu tutulmaktadır.

Etyopatogeneze deki belirsizlik nedeniyle IBH için günümüze kadar oldukça farklı tedavi seçenekleri denenmiştir. Çeşitli antimikrobial ajanları içeren yaklaşımları takiben antiromatizmal olarak kullanıma giren sulfasalazinin ülseratif kolit hastalarının eklem yakınmalarının tedavisinde kullanılması sırasında; hem diare hem de artraljinin azaldığı keşfedilmiştir. İleri araştırmalarda ise sulfasalazinin aktif metaboliti olan 5–aminosalisilatın (5–ASA) etki potansiyeli ortaya konularak klinik kullanıma geçişi sağlanmıştır. IBH’nın histolojik olarak immün aktivasyonu işaret etmesi ile kortikosteroidler iki ucu keskin bıçak olarak tedavi alternatifi haline gelmiştir (9).

Steroid kullanımının keskin kenarı olan ciddi yan etki potansiyeli ve invaziv tedavi gerektirecek kadar ciddi komplikasyonları olması kullanımdaki

sınırlayıcı unsurlardır (10). Steroid kullanılan hastaların %16'sının steroide rezistan olduğu, tedavinin başlangıcından itibaren 1 yıl sonra %22'sinin steroide bağımlı olduğu ve %29'unun cerrahi tedavi gerektirdiği bildirilmiştir. Steroid tedavisine alternatif olarak görülen immünsupresanların kullanımında; IBH'nda doz bağımlı olarak minör yan etkilerden ciddi fırsatçı enfeksiyonlar gibi ölümcül komplikasyonlara kadar değişebilen bir risk profili mevcuttur (11).

IBH'nın uzun vadedeki komplikasyonları veya tedaviye yanıtız semptomatik hastalık hastayı cerrahi tedaviye götürmektedir. Cerrahi tedavi masum olmadığı gibi kronik antiinflamatuvar veya immünsupresan tedavi de masum değildir. Bu nedenle etyoloji ve patogenezi halen net olmayan IBH'nda yan etki potansiyeli düşük tedavi modaliteleri halen araştırma sürecindedirler (11).

IBH'nın fizyopatolojisinde sempatik ve parasempatik sinirler arasında otonomik imbalans olduğu daha önce ileri sürülmüştür (12). Proktitli hastalarda submukoza, muskularis mukoza ve mukozada adrenerjik hiperinnervasyon tespit edilmiştir (12). Adrenerjik baskınlığın mukozal hasar ile sonuçlanacak şekilde epitelyal yenilenme hızının artışı ve vazokonstriksiyonu tetikleyebileceği bildirilmiştir (13). IBH üzerinde nikotinin sahip olduğu olumlu etki potansiyeli otonomik imbalans mekanizmasını desteklemektedir (14).

Lokal anestezik olarak kullanımda olan lidokainin konak immün cevabının farklı basamaklarında etkisi olabileceği bildirilmiştir (15). Lidokain tedavisi sonrası mukozada inflamatuvar belirteç olarak gözlenebilmekte olan polidendritik hücre ve lenfosit sayısında gerileme beklenebileceği; olası antiinflamatuvar etki mekanizması olarak da hiperaktif nöronal reflekslerin inhibisyonu, çeşitli basamaklarda (lenfosit maturasyonu ve proliferasyonu, makrofaj migrasyonu) immün regülatuar etki, membran stabilizasyonu etkisi olabileceği öne sürülmüştür (16). Lidokainin proinflamatuvar gen transkripsiyonunu azaltarak sitokin üretimini de azaltabileceği bildirilmiştir (17).

Björck ve ark.'nın (18) 1992 yılında yayınladıkları 100 vakalılık seride sadece proktit mevcut olan hastalarda lidokaine başlangıçta tam cevap alınmasına rağmen tedavinin kesilmesini takiben iki yıl içinde hastaların %68'inde relaps gözlemlendiği; proktosigmoiditli olgularda uygulanan rejim ile %83 tedavi yanıtı alınırken tedavisiz ilk 16 aylık zaman diliminde %50'nin altında bir relaps izlendiği bildirilmiştir. Relaps yüksekliği yine nöronal hipotez ile açıklanmıştır. Tedavi kesildikten sonra nöronal aktivitenin kademeli olarak geri dönmekte olduğu belirtilmiştir (18).

Kolit tedavisinde lidokaine alternatif olarak öne sürülen ropivakain; uzun etkili bir lokal anestezi olarak sinir blokları ve epidural analjezide kullanılmak üzere geliştirilmiştir (19). In vitro olarak Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)'nın proinflatuar etkisini antagonize ettiği ve araziidonik asit sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (20).

Lokal anestezi ilaçların lokal uygulamalarında çok düşük bir oranla da olsa sistemik yan etki potansiyelleri olduğu bilinmektedir. Lidokain karşısında uzun etkili ajan olarak kullanılmakta olan amino amid grubundan bupivakainin ciddi sistemik yan etkileri olması nedeniyle; bupivakainin sol izomeri olarak üretilmiş olan levobupivakainin aynı düzeyde klinik etkinlik yanında oldukça nadir yan etki riskine sahip olduğu gösterilmiştir (21).

IBH araştırmalarında kullanılacak bir hayvan modelinde trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) ile oluşturulan kolit modeli haptan ile indüklenmiş gecikmiş tip hipersensitivite sonrası oluşan kronik bir inflamasyon modelidir. Mukozal bariyer kırılarak doza bağımlı olarak ülserasyon ve inflamasyon gelişir. Segmental ülserasyon ve inflamasyon sıktır. İnflamasyon ve ülserasyonun uzun süre devam etmesi nedeniyle kolonik IBH'nın patofizyolojisinin ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasında uygun bir modeldir (22). Bu çalışmadaki amacımız kimyasal indüksiyon ile oluşturulmuş sıçan kolit modeli üzerinde levobupivakainin antiinflatuar etkinliğe sahip olup olmadığını araştırmaktır.

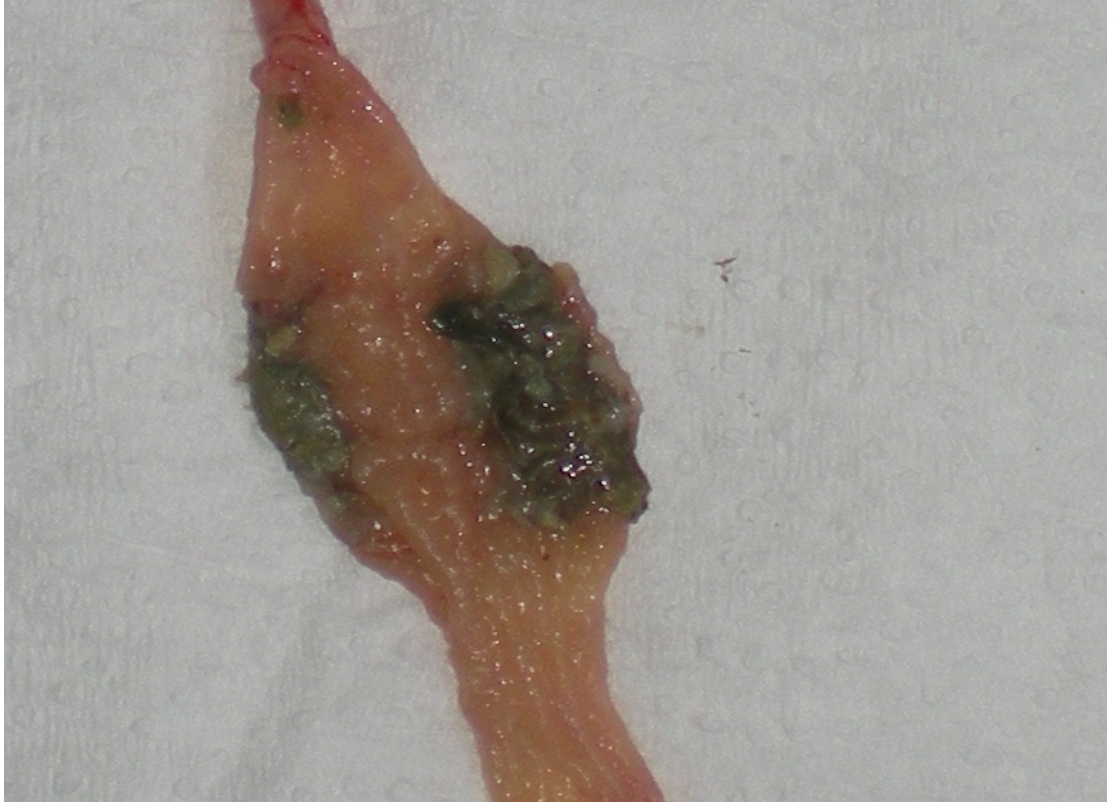
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2008 – 4/1 numaralı kararı ile Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Histopatolojik incelemeler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda; IL-6 ve TNF- α ölçümleri ise Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

Çalışmamızda 270–390 gr arasında ağırlığa sahip erkek Sprague–Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar çalışma sürecinde sadece çalışma ekibinin giriş imkanı olan standart bir odada bireysel kafesler içerisinde tutuldular (Şekil–1). Her sıçan için yeterli su ve standart pelet yem sağlanarak açlık ve stresten minimal etkilenmeleri sağlandı. Her grupta 10 adet olmak üzere 3 grupta 30 sıçanda kolit oluşturuldu (Şekil–2). Sham grubu ise 10 adet sıçan ile oluşturuldu.



Şekil–1: Bireysel kafeslerde tutulan sıçanlar



Şekil-2: Tek doz TNBS + Etanol sonrası 24 saatte oluşan inflamasyon.

Gruplar:

1. Grup (Budesonide): TNBS ile kolit oluşturularak budesonide uygulanan grup (n=10)

2. Grup (Levobupivakain): TNBS ile kolit oluşturularak levobupivakain uygulanan grup (n=10)

3. Grup (Hastalık): TNBS ile kolit oluşturularak serum fizyolojik uygulanan grup (n=10)

4. Grup (Sham): Kolit oluşturulmaksızın işlem standardizasyonu için rutin rektal kateterizasyon yapılan grup (n=10)

olarak isimlendirildi. Kolit oluşturulan gruplarda kolit indüksiyon günü tüm sıçanlara ketamin (8mg/kg; Ketalar®) ve xylazine (90mg/kg; Ronpum®) karışımı ile intramusküler anestezi uygulandı. Anesteziyi takiben 6F feeding tüp ile rektal yoldan 8 cm proksimale ilerletildi. 0,6 ml TNBS (%5 w/v, 40 mg; Sigma Chemical Co.) + 0,25 ml %50 etanol karışımı feeding tüp aracılığı ile lümeneye verildi (Şekil-3). Tüp içerisinde kalan hacim dikkate alınarak 0,5 ml

hava tp içerisine verilerek tüm karışımın 0,85 ml toplam hacim olarak barsak lümenine geçişi sağlandı ve tp geri çekildi.



şekil-3: TNBS ile kolit indüksiyonu.

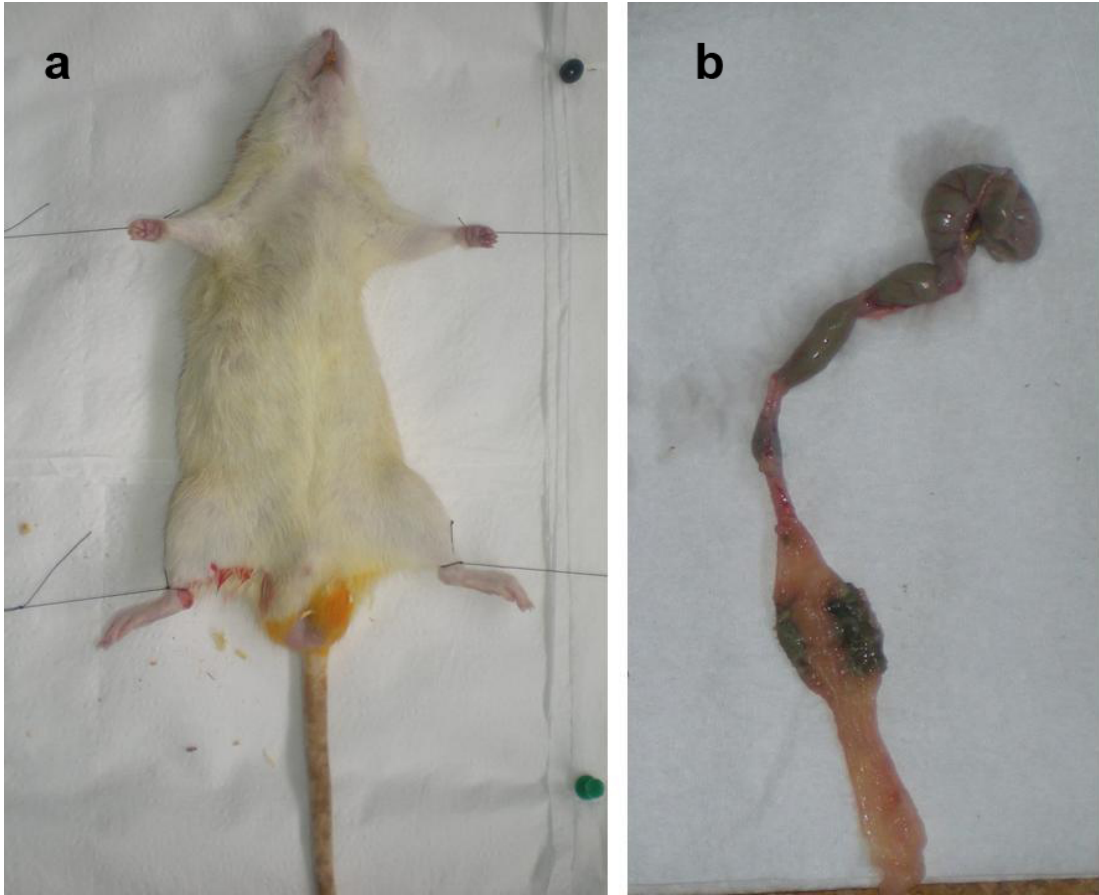
Budesonide grubunda kolit indüksiyonunu takiben 7 gün boyunca her gün intramuskuler standart anestezi sonrası rektal yoldan 6F feeding tp 10 cm proksimale ilerletilerek budesonide (Entocort® enema) 0,1 mg/kg tek doz olarak kolon lümenine verildi. Takiben 0,5 ml hava feeding tp içerisine verilerek tüm ilaç hacminin lümene geçişi sağlandı.

Levobupivakain grubunda kolit indüksiyonunu takiben 7 gün boyunca intramuskuler standart anestezi sonrası 10 mg/kg levobupivakain (Chirocaine® 50mg/10ml) tek doz olarak rektal yoldan 6F feeding tp aracılığı ile 10 cm proksimale uygulandı. Takiben 0,5 ml hava feeding tp içerisine verilerek tüm ilaç hacminin lümene geçişi sağlandı.

Hastalık grubunda ise kolit indüksiyonunu takiben standart intramuskuler anestezi sonrası 6F feeding tp rektal yoldan 10 cm ilerletilerek 7 gün boyunca günde tek doz olmak üzere 1 ml serum fizyolojik uygulandı. Diğer gruplarda olduğu gibi son olarak 0,5 ml hava feeding tp içerisine verilerek tüm serum fizyolojiğin lümene geçişi sağlandı.

Sham grubunda ise işlem standardizasyonu için sadece standart intramuskuler anestezi prosedürü ve 7 gün boyunca günde bir defa rektal yoldan 6F feeding tüp ilerletilmesi basamakları rutin uygulandı.

Tüm gruplarda sıçanlar her gün tartılarak ağırlık değişimleri kayıt altına alındı. Yedi günlük tedavi sonrası 8. günde tüm gruplardaki sıçanlara intramuskuler anestezi altında laparotomi uygulandı. Laparotomide adhezyon gözlemi sonrası total kolektomi uygulandı (Şekil-4).



Şekil-4. Laparotomi öncesi tespit pozisyonu (a) ve total kolektomi (b) materyali.

Sistemik inflamatuvar yanıt göstergesi olarak interlökin-6 (IL-6) ve TNF- α serum düzeylerinin tespitinde kullanılmak üzere intrakardiak puncture ile yüksek miktarda kan alınarak sıçanlar sakrifiye edildi. Her sıçan için total kolektomi materyalinin lümeni açılarak makroskopik skorlama Wang ve arkadaşlarının (23) TNBS kolit modelinde kullandıkları skala modifiye

edilerek yapıldı (Tablo–1). Makroskopik skorlama aynı kişi tarafından gruplar hakkında bilgilendirilme olmaksızın kör olarak yapıldı.

Tablo–1: Makroskopik hasar skorlama cetveli; Wang ve ark.nın (23) adaşlarının skalasından modifiye edilmiştir.

Makroskopik Değişiklik	Puan
Ülserasyon ve İnflamasyon	
Normal	0
Fokal hiperemi, ülser yok	1
İnflamasyon veya duvar kalınlaşması olmadan tek ülser	2
İnflamasyon + tek ülser	3
İnflamasyon + ≥ 2 ülser	4
1 cm > inflame segment + ≥ 2 ülser	5
1 cm < inflame segment + ≥ 2 ülser	6
2 cm \leq hasarlı segment (her cm için 1 puan eklenir)	7–10
Adhezyonlar	
Yok	0
Minör	1
Major	2
Diare	
Yok	0
Var	1

Makroskopi skorlaması sonrası doku örnekleri %10 formaldehid solusyonu içerisinde muhafaza edildi.

Her total kolektomi materyalinden distal uçtan 5 mm, 4 cm proksimaldeki segmentten 5 mm ve 8 cm proksimaldeki segmentten 5 mm olmak üzere üçer örnekleme yapılarak parafin bloklara alındı. Her segment her sıçan için distal, orta ve proksimal olarak isimlendirildi. Preparatlar rutin histopatolojik inceleme için hematoksilen – eozin (HE) ile boyanarak hazırlandı.

Işık mikroskopisi altında mikroskopik lezyonlar her segment için ayrı olarak skorlandı (Tablo–2) ve her sıçan için üç farklı segmentten yapılan histopatolojik skorlamanın aritmetik ortalaması alındı. Histopatolojik skorlama Wang ve ark.'nın (23) TNBS kolit modelinde kullandığı skalaya göre yapıldı. Işık mikroskopisi incelemeleri aynı patolog tarafından yapıldı.

Tablo–2: Histopatolojik değişiklik skorlama cetveli (23).

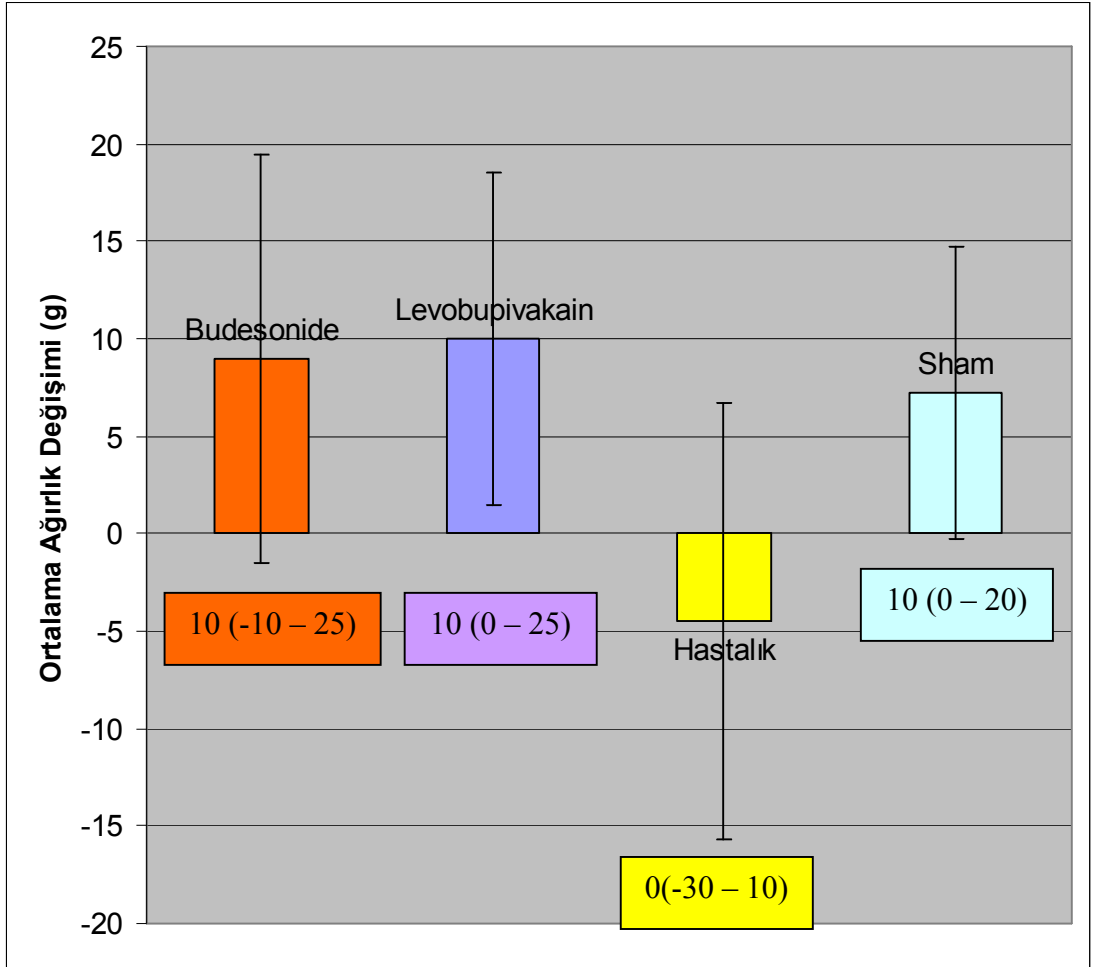
Bulgu	Puan
Ülser	
Yok	0
3 mm'den küçük	1
3 mm'den büyük	2
İnflamasyon	
Yok	0
Hafif	1
Ciddi	2
Granülom	
Yok	0
Var	1
Hastalığın Derinliği	
Yok	0
Submukozal	1
Muskuler	2
Serozal	3
Fibrozis	
Yok	0
Hafif	1
Ciddi	2

Biyokimyasal analiz ELISA yöntemi ile serumda sıçan IL–6 ve TNF– α kitleri (Invitrogen™ Rat Immunoassay Kit; Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel analizler için The Statistical Package for Social Sciences version 11.5 (SPSS, Chicago, IL, ABD) bilgisayar programı kullanıldı. Devamlı veriler; çoklu gruplar için Kruskal Wallis varyans analizi, ikili gruplar için Mann – Whitney U testi kullanılarak ve kategorik veriler ise ki–kare test ile karşılaştırıldı, $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar medyan (minimum – maksimum) olarak verildi.

BULGULAR

Günlük tartı takipleri sonucunda kolit sonrası budesonide ve levobupivakain uygulanan gruplarda ve sham grubunda ağırlık artışı saptanırken hastalık grubunda ağırlık kaybı mevcuttu (Şekil-5).

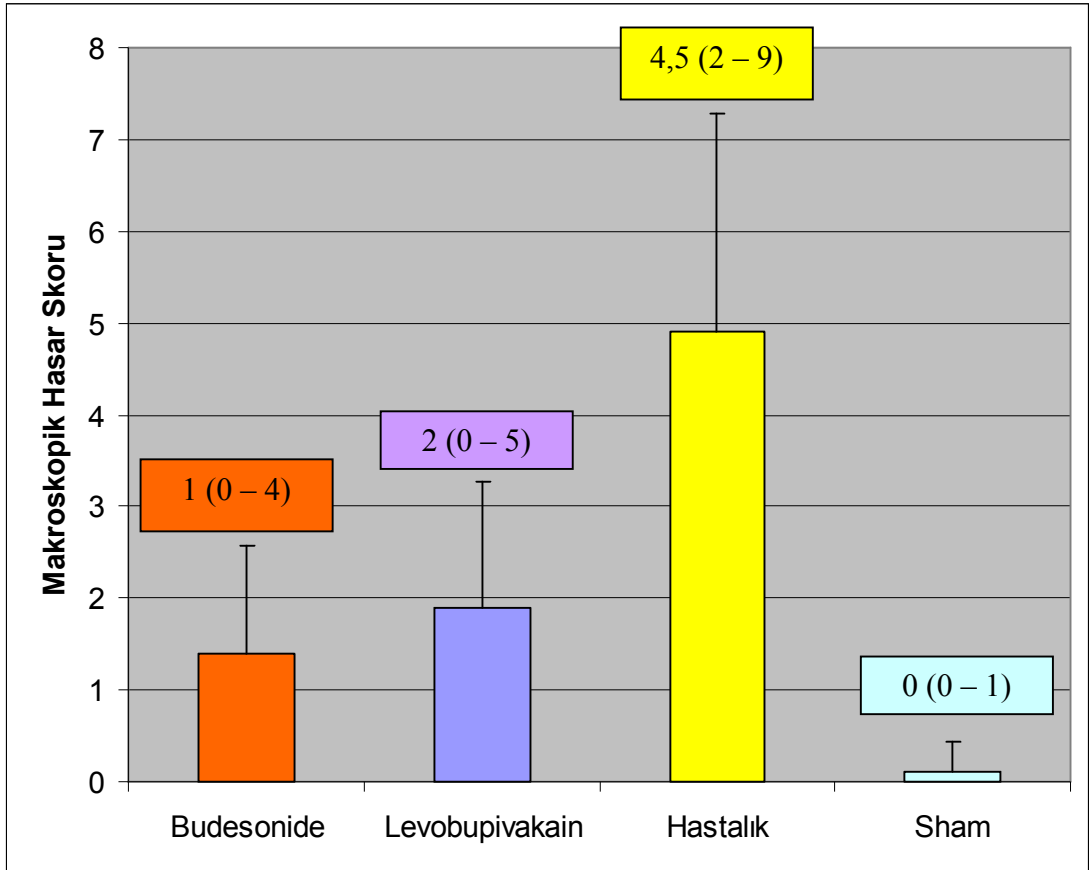


Şekil-5: Gruplara göre ortalama ağırlık değişimleri.

Budesonide, levobupivakain ve sham grupları arasında ağırlık değişimi açısından anlamlı fark gözlenmedi ancak her üç grup ile hastalık grubu arasındaki ağırlık değişimi açısından fark anlamlı olarak bulundu ($p=0,016$).

Makroskopik inceleme: Laparotomi sonrası tüm sıçanların kolon lümenleri açılarak makroskopik hasar skorum cetveli ile değerlendirildiğinde budesonide, levobupivakain ve hastalık gruplarında makroskopik hasar skorları sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulundu ($p=0,001$).

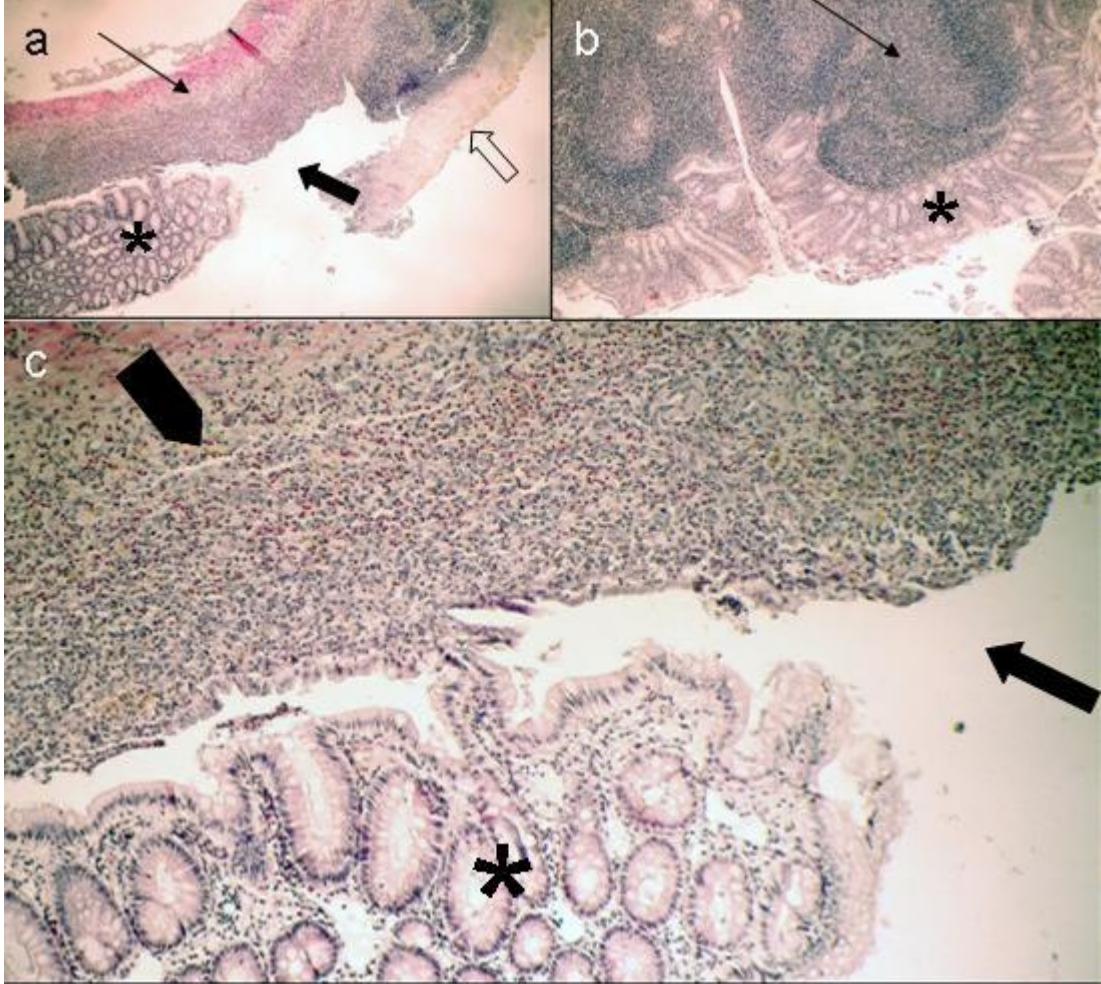
Budesonide ve levobupivakain gruplarında inflamasyon gözlenmekle birlikte hastalık grubuna göre gerileme mevcuttu. Budesonide ve levobupivakain grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadı ancak her iki grupta da hastalık grubuna göre makroskopi skorları anlamlı olarak düşüktü (Budesonide vs. Hastalık grubu: $p=0,001$; Levobupivakain vs. Hastalık grubu: $p=0,002$) (Şekil-6).



Şekil-6: Gruplara göre makroskopik hasar skorları dağılımı.

Mikroskopik inceleme: Hematoksilen Eozin boyama sonrası histopatolojik incelemede granülom formasyonu ve fibrozis hiçbir örnekte

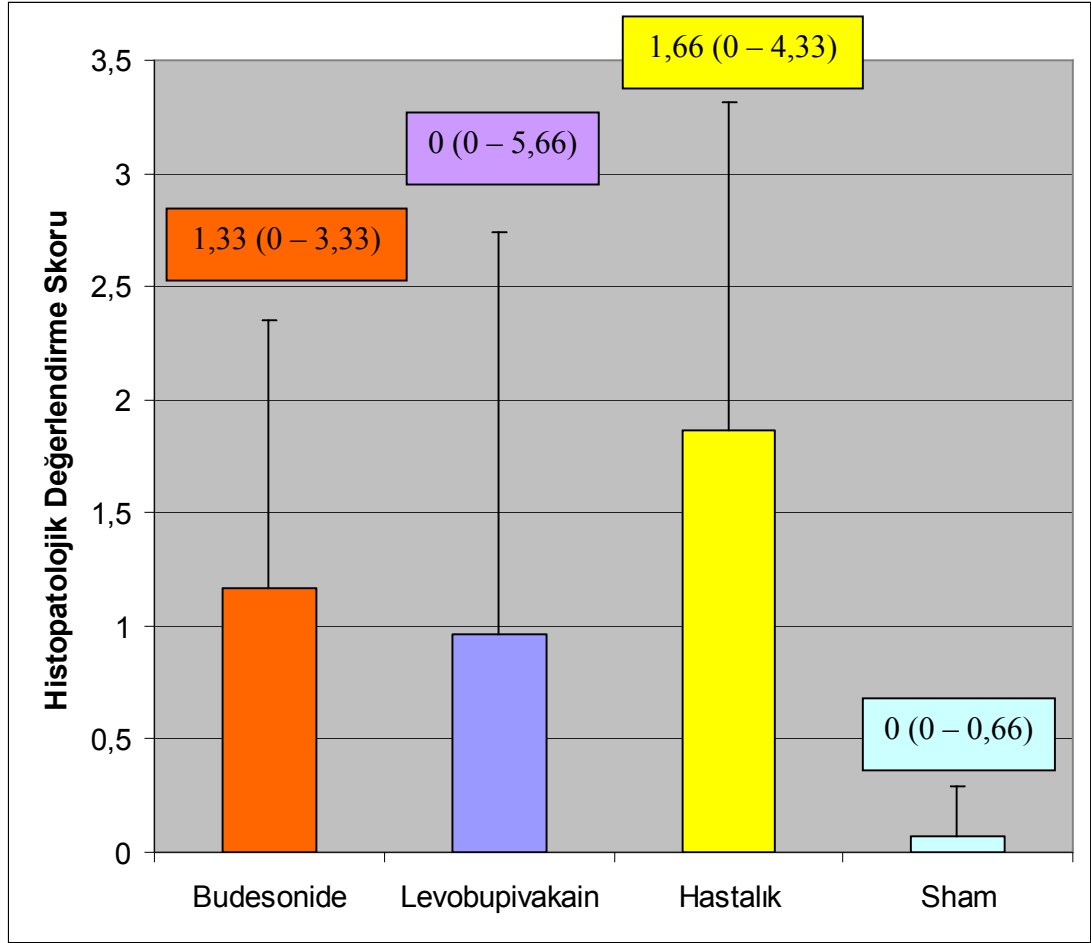
gözlenmezken çeşitli düzeyde inflamatuvar hücre birikimi ve ülser oluşumu budesonide, levobupivakain ve hastalık gruplarında izlenebilen ana değişikliklerdi (Şekil-7).



Şekil-7: Kolit indüksiyonu sonrası inflamatuvar değişiklikler. a: Ülserasyon (➔), fibrinli eksüda (⇨), ülserasyon zemininde inflamatuvar hücre birikimi (➔) ve eşlik eden intakt mukozal alanlar (★) (HE X 40). b: Ülserasyon olmaksızın inflamatuvar hücre birikimi (➔) (HE X 100). c: İnflamatuvar hücreler arasında oluşmakta olan kapiller proliferasyonlar (➔) (HE X 200).

Tüm örnekler histopatolojik değerlendirme skorlama cetveline göre incelendiğinde kolit oluşturulmuş üç grupta skorlar sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,014$). Levobupivacaine grubunun skorları budesonide ve hastalık gruplarına göre düşük olmasına rağmen istatistiksel değerlendirmede anlamlı olarak farklı değildi (Budesonide vs.

Levobupivacaine grubu: $p=0,436$; Hastalık vs. Levobupivacaine grubu: $p=0,105$ (Şekil-8).



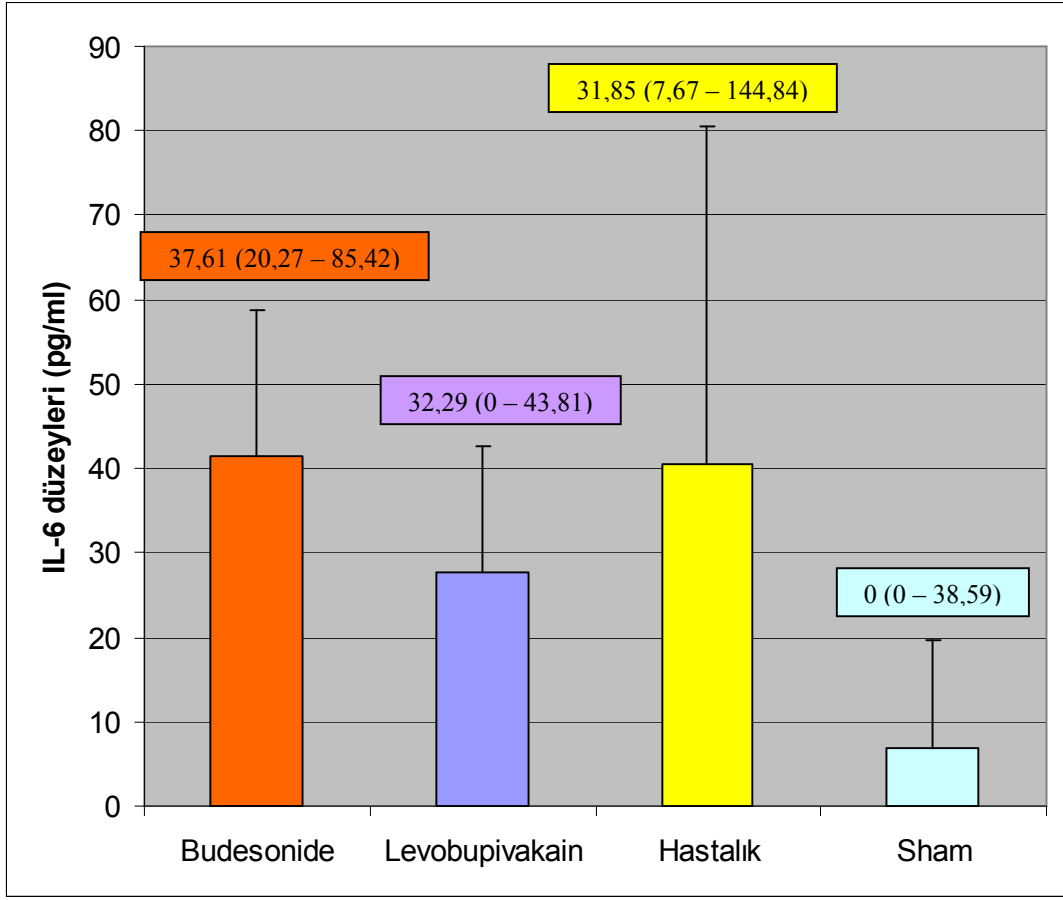
Şekil-8: Gruplara göre histopatolojik değerlendirme skorları dağılımı.

TNF- α ölçümleri gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermezken ($p=0,152$) (Tablo-3) budesonide, levobupivacaine ve hastalık gruplarında sham grubuna göre IL-6 düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ($p=0,04$). Levobupivacaine grubunda IL-6 seviyeleri budesonide ve hastalık gruplarına göre düşük olmakla beraber istatistiksel olarak fark gözlenmedi (Levobupivacaine vs. Hastalık grubu: $p=0,853$; Levobupivacaine vs. Budesonide grubu: $p=0,247$) (Şekil-9).

Tablo-3: Parametrelerin gruplara göre median (minimum–maksimum) değerleri.

	Budesonide	Levobupivakain	Hastalık	Sham	p
Ağırlık değişimi	10 (-10-25)	10 (0-20)	0 (-30-10)	10 (0-20)	0,016*
Makroskopi skorları	1 (0-4)	2 (0-5)	4,5 (2-9)	0 (0-1)	0,001**
Mikroskopi skorları	1,33 (0-3,33)	0 (0-5,66)	1,66 (0-4,33)	0 (0-0,66)	0,014***
IL-6 düzeyleri	37,61 (20,27-85,42)	32,29 (0-43,81)	31,85 (7,67-144,84)	0 (0-38,59)	0,004****
TNF-α düzeyleri	0,53 (0,17-45,71)	0,22 (0,17-312,04)	0,46 (0,16-255,91)	0,14 (0-3,7)	0,152

*: Budesonide, levobupivakain ve sham grupları ile hastalık grubu arasındaki ağırlık değişimi farkı anlamlıdır (p=0,016). **: Budesonide ve levobupivakain gruplarında makroskopi skorları hastalık grubuna göre anlamlı derecede düşüktür (p=0,001). ***: Kolit oluşturulmuş üç grupta mikroskopi skorları sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,014). ****: Budesonide, levobupivakain ve hastalık gruplarında sham grubuna göre IL-6 düzeyleri anlamlı olarak yüksektir (p=0,004). TNF- α düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık mevcut değildir (p=0,152).



Şekil-9: Gruplara göre serum IL-6 düzeyleri dağılımı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda kimyasal indüksiyon yolu ile oluşturulmuş kolit modelinde topikal levobupivakain uygulaması sonrası çeşitli parametreler ile antiinflamatuvar etkinliğin olup olmadığını araştırdık. Deney sonunda gerek ağırlık değişimleri gerekse makroskopik değerlendirme skorlarındaki iyileşme lehine olan anlamlı sonuçlar bize levobupivakainin deneysel kolit modelinde topikal antiinflamatuvar etkinliği olabileceğini düşündürmekle birlikte histopatolojik veriler, ağırlık değişimi ile makroskopi verilerini desteklememektedir. Sistemik inflamatuvar yanıt göstergesi olarak kullandığımız IL-6 düzeyleri kolit indüksiyonuna sekonder olarak artmış bulunmasına rağmen levobupivakain uygulaması ile anlamlı düzeyde düşme göstermemiştir. TNF- α düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Lokal anesteziğin immun regulatuar etkileri nedeniyle yapılan çalışmalarda ropivakain, bupivakain gibi daha uzun etkili ajanlar da denenmiş ve çeşitli düzeylerde antiinflamatuvar etkinlik gözlenmiştir (19,20). Lidokaine göre daha uzun etkili olan bupivakain ile ilgili ciddi sistemik toksik yan etkiler gözlenmesi üzerine levobupivakain daha düşük sistemik yan etki potansiyeli ile lokal anestezi olarak klinik kullanıma girmiştir (21). Levobupivakainin topikal antiinflamatuvar etkinliğine dair yapılmış bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle levobupivakainin klinik kullanımdaki diğer lokal anestezi ajanlara benzer şekilde deneysel bir kolit modelinde topikal antiinflamatuvar etkinliğinin olup olmadığını araştırmak istedik.

IBH oluşumunda mukozal hasar sonrası antijenik uyarının mukozal bariyeri geçerek yarattığı humoral ve hücrel immun cevabın tetiklediği olaylar dizisi deneysel modeller içerisinde TNBS ve etanol karışımı ile indüklenen kolit modelinde taklit edilebilmektedir (22,23). TNBS etki gösterebilmek için etanol tarafından mukozal bariyerin kırılmasına gerek duyar ki takiben hapten olarak dokuda etki gösterir. Ancak etanol tarafından mukozal bariyerin yıkılması sırasında etanol derişiminin yoğunluğu

deneklerde mortaliteyi etkileyebilmektedir. Bu nedenle farklı oranlarda TNBS ve etanol karışımları ile yaptığımız gözlemlerde TNBS miktarı sabit tutularak karışımdaki etanol yoğunluğu artırıldıkça deneklerde aşırı diare ve dehidratasyon sonrası süreç mortal seyretmektedir. Sonuç olarak deney öncesi gözlemler ile en ideal karışımın 0,6 ml TNBS ve 0,25 ml %50 yoğunlukta etanol ile elde edildiğini ve bu karışımın minimum komplikasyon olasılığı ile ideal inflamatuvar değişiklikleri oluşturduğunu gördük.

Martinsson ve arkadaşları tarafından TNBS indüksiyonu ile kolit oluşturulmuş sıçanlarda ropivakainin budesonide ve 5-ASA karşısında etkinliği araştırılmıştır. Gruplarda ağırlık değişimleri her ne kadar tedavi almayan grupta sınırlı düzeyde kalmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir (24). Çalışmamızda levobupivakain ve budesonide gruplarındaki ağırlık değişimi sham grubuna göre farklılık göstermemesine rağmen hastalık grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulundu. Hastalık grubu ile levobupivakain ve budesonide tedavisi alan gruplar arasında görülen bu farklılık tedavisiz olan hastalık grubunda standart beslenmeye rağmen inflamatuvar sürecin daha şiddetli seyredebileceğini; bunun da deney sürecinde ağırlık kaybına yol açabileceğini düşündürmektedir.

Topikal levobupivakain uygulaması ile makroskopi verilerine baktığımızda; hastalık grubuna göre gerek budesonide gerekse levobupivakain gruplarında makroskopi skorlarında belirgin gerileme mevcuttu ancak sham grubuna göre ise anlamlı derecede skorlar yüksekti. Uygulanan tedavi süreci levobupivakain ve budesonide gruplarında makroskopik olarak etkin görülmektedir ancak inflamasyon tam olarak gerilemediği gibi sham grubuna göre ise anlamlı düzeyde belirgindir.

Çalışmamızda levobupivakain grubunda daha belirgin olmak üzere histopatolojik değerlendirme skorları levobupivakain ve budesonide gruplarında geriledi. Ancak histopatoloji verilerimiz makroskopi verilerimize benzer olmakla birlikte istatistiksel olarak levobupivakain ile budesonide ve hastalık grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Budesonide vs. Levobupivacaine grubu: $p=0,436$; Hastalık vs. Levobupivakain grubu:

p=0,105). Levobupivakain, budesonide ve hastalık gruplarında histopatoloji skorlarının sham grubuna göre yüksek oluşu (p=0,014) tedavi gruplarında yeterli antiinflamatuvar etkinliğin olmadığını göstermektedir. Mevcut makroskopi verileri histopatolojik olarak desteklenmemektedir ancak morfolojik değerlendirmede farklı çalışmalarda farklı veriler mevcuttur ve makroskopi skorları ile mikroskopi sonrası histopatolojik değerlendirme skorları arasında aynı çalışma içerisinde de farklılıklar gözlenebilmektedir. Kolit indüksiyonu sonrası topikal lidokain uygulaması ile makroskopik hasar anlamlı olarak azalmaktadır. Benzer bulgulara topikal ropivakain uygulaması ile de ulaşılmıştır. Topikal ropivakain uygulaması ile makroskopi skorları anlamlı derecede gerileme gösterirken aynı çalışmada tedavi gruplarında minimal histopatolojik iyileşme görülmüş ve mukozal bütünlüğün bozuk kaldığı bildirilmiştir (24–26).

IBH'nda IL-6 ve TNF- α proinflamatuvar sitokinler olarak davranırlar ve seviyeleri genellikle hastalığın şiddeti ile ilişkilidir (27). İnflamatuvar sürecin sistemik belirteci olarak serum IL-6 ve TNF- α seviyelerini değerlendirdik. TNF- α düzeylerinin IBH'nda farklılıklar gösterebileceği hatta bazen tespit dahi edilemeyeceği bildirilmiştir (27). TNF- α için elde ettiğimiz bireysel farklılıklar literatür verileri ile uyumludur.

Çalışmamızda IL-6 seviyeleri ise sham grubuna göre levobupivakain, budesonide ve hastalık gruplarında anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,04). Bu bulgular IBH'nda sitokin seviyelerinin yükseldiğine dair bilgiler ile uyumludur (27). Levobupivakain grubunda IL-6 seviyeleri budesonide ve hastalık gruplarına göre düşük tespit edilmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük değildi (Levobupivakain vs. Hastalık grubu: p=0,853; Levobupivakain vs. Budesonide grubu: p=0,247).

Lidokain ve ilişkili preparatların proinflamatuvar medyatörlerin salınımını azalttığı görülmüş; bu etkisilerini epitelyal hücreler üzerinde membran depolarizasyonuna neden olarak sağladıkları ve antiinflamatuvar medyatör artışına neden oldukları bildirilmiştir (28). Epitelyal bariyerin bozulması antijenlere karşı geçirgenliği ve inflamatuvar şiddeti artırır. Lidokain tüm kolon segmentlerinde epitelyal bariyer bütünlüğüne zarar veren polidendritik hücre

sayısında azalma sağlar. Morfolojik olarak epitalyal bariyer intakt bile olsa fonksiyonel bozukluk devam edebilir (29). IL-6 seviyelerinin levobupivakain grubunda daha düşük olması; levobupivakainin diğer lokal anesteziikler gibi sitokin salınımı üzerine direk ve indirek etkileri olabileceğini düşündürebilir ancak IL-6 düzeylerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Sonuç olarak histopatolojik değerlendirme skorlarında ortalama değerlerin gerilemesi ve IL-6 seviyesinin düşüklüğü bize levobupivakainin topikal uygulamada deneysel kolit modelinde antiinflamatuvar etki potansiyelinin olabileceğini düşündürmekle birlikte istatistiksel analizler anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Ancak IBH'nda immün yanıtın düzeyi bireysel farklılıklar gösterebilmektedir (30). Gruplardaki örnek sayıları bireysel olarak deneklerde görülebilen farklı sayısal değerlerin grup ortalamalarını belirgin şekilde etkilemesine neden olmuş olabilir. Daha geniş örnek havuzu ile yapılacak çalışmalarda bu etkileşim azaltılabilir. Ayrıca, TNBS ile indüklenen kolit modelinde inflamasyonun 6-8 hafta devam ettiği bilinmektedir (31). Çalışmamızda tedavi gruplarında gözlenen makroskopik iyileşme eğilimi mikroskopik veriler ile desteklenmese de tedavi sürelerinin 7 günden daha uzun tutulması halinde daha iyi sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Guindi M, Riddell RH. Indeterminate colitis. *J Clin Pathol* 2004; 57:1233–44.
2. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional Ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932; 99:1323–9.
3. Lockhart–Mummary HE, Morson BC. Crohn’s disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut* 1960; 1:87–105.
4. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A. Epidemiology of Crohn’s disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: A population–based study. *Am J Epidemiol* 1999; 149:916–24.
5. Probert CSJ, Jayanthi V, Rampton DS, Mayberry JF. Epidemiology of inflammatory bowel disease in different ethnic and religious groups: Limitations and aetiological clues. *Int J Colorect Dis* 1996; 11:25–8.
6. Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberts ECAM, Greenstein RJ. On the etiology of Crohn disease. *PNAS* 1996; 93:9816–20.
7. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001; 7:175–84.
8. De Dombal FT. Ulcerative colitis. Epidemiology and aetiology, course and prognosis. *Br Med J* 1971; 1:649–50.
9. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present and future. *J Gastroenterol* 2007; 42:16–25.
10. Diethelm AG. Surgical management of complications of steroid therapy. *Ann Surg* 1977; 185:251–63.
11. Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet* 2002; 359:331–40.
12. Björck S, Dahlström A, Ahlman H. Topical treatment of ulcerative proctitis with lidocaine. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24:1061–72.
13. Björck S, Dahlström A, Ahlman H. Treatment of distal colitis with local anaesthetic agents. *Pharmacol Toxicol* 2002; 90:173–80.
14. Calkins BM. A meta–analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989; 34:1841–54.
15. Azuma Y, Shinohara M, Wang P. Comparison of inhibitory effects of local anesthetics on immune functions of neutrophils. *Int J Pharmacol.* 2000; 22:789–96.
16. Dickstein R, Kiremidjian–Schumacher L, Stotzky G. Effect of lidocaine on the function of immunocompetent cells. II. Chronic in vivo exposure and its effects on Mouse lymphocyte activation and expression of immunity. *Immunopharmacology* 1985; 9: 127–39.
17. Lahat A, Horin SB, Lang A. Lidocaine down–regulates nuclear factor– κ B signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol.* 2008; 152: 320–7.
18. Björck S, Dahlström A, Johansson L. Treatment of the mucosa with local anaesthetics in ulcerative colitis. *Agents Actions* 1992; Spec No:C60–72.
19. McClure JH. Ropivacaine. *Br J Anaesth* 1996; 76:300–7.

20. Martinsson T, Takaharu O, Fernvik E. Ropivacaine inhibits leukocyte Rolling, adhesion and CD11b/CD18 expression. *JPET* 1997; 283:59–65.
21. Casati A, Putzu M. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: Are they clinically different? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2005; 19:247–68.
22. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; 50:81–92.
23. Wang H, Ouyang Q, Hu RW. Establishment of a trinitrobenzene sulfonic acid–induced rat colitis model. *Chin J Gastroenterol* 2001; 6:7–10.
24. Martinsson T, Ljung T, Rubio C, Hellstrom PM. Beneficial effects of ropivacaine in rat experimental colitis. *JPET* 1999; 291:642–7.
25. Wallace JL, McCafferty DM, Sharkey KA. Lack of beneficial effect of a tachykinin receptor antagonist in experimental colitis. *Regul Pept* 1998; 73:95–101.
26. Chevalier E, Petoux F, Chovet M, Langlois A. Beneficial effect of trimebutine and N–monodesmethyl trimebutine on trinitrobenzene sulfonic acid–induced colitis in rats. *Life Sci* 2004; 76:319–29.
27. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382–9.
28. Barshack I, Levite M, Lang A, Fudim E, Picard O, Ben–Horin S, Chowers Y. Functional voltage–gated sodium channels are expressed in human intestinal epithelial cells. *Digestion* 2008; 77:108–17.
29. Björck S, Jennische E, Dahlström A, Ahlman H. Influence of topical rectal application of drugs on dextran sulfate–induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42:824–32.
30. MacDonald TT, Montelone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51:2–9.
31. Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000; 6:150–2.

EKLER

Ek-1: Kısaltmalar

IBH: İnflamatuvar barsak hastalığı

TNBS: Trinitrobenzen Sulfonik Asit

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

IL-6: İnterlökin-6

5-ASA: 5-Aminosalisilat

HE: Hematoksilen Eozin

IM: İntramuskuler

TEŞEKKÜR

Tıp alanındaki birçok ihtisas alanından farklı olarak cerrahi ihtisas süreci gerçek bir usta – çırak ilişkisi gerektirmektedir. Öğrencilik yıllarımda benim için Genel Cerrahi'nin bir tutku haline gelmesini sağlayan ve geçirdiğim 5 yıllık ihtisas sürecimde sahip oldukları bilgi birikimi, cerrahi beceri ve şüphesiz ki tecrübeleri ile bana “el veren” ustalarım; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerine bir çırak olarak bana kazandırdıkları altın bilezik için teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitim sürecinde bana kazandırdıkları dışında tez danışmanım olarak bu tezin hazırlık sürecinde maddi ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tuncay Yılmazlar'a olan minnettarlığımı ifade etmek için kelimeler yetersiz kalır; çok teşekkür ederim hocam.

Binlerce kilometre uzakta dahi olsa bile klinikte bir “ağabey” olarak biz araştırma görevlilerini aydınlatan ve çalışkanlığı ile bizlere örnek olan Uzm. Dr. Ersin Öztürk'e teşekkür ederim.

Tezimin hazırlık aşamasında değerli fikirleri ve güler yüzü ile bana yol gösteren sayın hocam Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD öğretim üyesi Prof. Dr. Aysun Yılmazlar'a çok teşekkür ediyorum.

Patolojik incelemeler sırasında yardım ve görüşlerini esirgemeyen Patoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Ömer Yerci'ye; mikroskopi çalışmalarını yürüten Uzm. Dr. Sibel Aker'e ve patoloji araştırma laboratuvarı sorumlusu Uzm. Dr. Özlem Saraydaroğlu'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Biyokimya laboratuvarı çalışmaları ve yorumları için Biyokimya AD öğretim üyesi Doç. Dr. Emre Sarandöl'e teşekkür ediyorum.

Ailemden daha fazla bir arada olduğum ve birlikte mücadele ettiğim tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Genel Cerrahi Kliniği yardımcı sağlık personelleri ve idari personellerine sahip olduğumuz güzel anılar için teşekkür ederim.

Son olarak bu 5 yıllık zorlu süreçte bana katlanabilmeyi başaran sevgili eşim Dr. Gül Menekşe Duman'a teşekkür etmek istiyorum.

ÖZGEÇMİŞ

19.Kasım.1976 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Ordu 19 Eylül İlkokulu'nda gerçekleştirdim. Ordu Anadolu Lisesi'nde başladığım ortaöğrenim sürecimi İstanbul Burak Bora Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1994 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde başladığım lisans eğitimimi 2001 yılında mezun olarak tamamladım. 2002 – 2003 yıllarında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı bünyesinde araştırma görevlisi olarak yer aldım. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım ve halen bu görevime devam etmekteyim.