

5-FU'nun intraperitoneal kullanımında intestinal anastomoz üzerine olan olumsuz etkisinin çinko ile engellenmesi

Prevention of the inhibitory effect of intraperitoneal 5-FU on intestinal anastomosis by zinc

Dr. Ali Rıza Tümer¹, Dr. Nuri Aydın Kama¹, Dr. Sevda F. Müftüoğlu²,
Dr. Cenap Dener¹, Dr. Leyla Tümer³, Dr. Atilla Dağdeviren²

Ankara Numune Hastanesi 4. Cerrahi Servisi¹, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji² Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Metabolizma ve Beslenme³ Bilim Dalı, Ankara

ÖZET: Rezektabl kolon kanserli hastalarda lokal ve reyonel rekürrensleri önlemede bugün için kabul edilen en iyi adjuvan tedavi erken postoperatif dönemde intraperitoneal kemoterapidir. Bu amaçla en sık kullanılan ajanlardan 5-FU'nun yara iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinin, Zn'nun tedaviye eklenmesiyle; yara iyileşmesini nasıl etkilediğini araştırmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Çalışmada 32 adet Yeni Zellanda tavşanının postoperatif yedinci gün batin duvarları açılmış, patlama basınçları kaydedilmiş, histolojik incelemeler, dokuda hidroksiprolin ve Zn tayinleri için örnekler alınarak analizleri yapılmıştır. 5-FU grubunda kollajen sentezinin önemli ölçüde bozulduğu ortalama patlama basıncı (p:0.048) ve hidroksiprolin değerlerinin (p:0.015) istatistiksel olarak azaldığı gözlenmiştir. Zn grubunda ortalama patlama basınçları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuşken (p:0.02), hidroksiprolin düzeylerinde bu anlamlı ilişki saptanamamıştır (p:0.560). 5-FU + Zn grubunda ortalama patlama basınçları 5-FU grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p: 0.014). Hidroksiprolin düzeyleri Zn verilen grupta anlamlı derecede artmıştır (p: 0.054). Histolojik parametrelerde 5-FU'nun kolonik anastomoz iyileşmesini erken dönemde önemli ölçüde bozduğu ve geniş nekroz alanları oluşturduğu, 5-FU + Zn grubunda ise özellikle epitelizeasyonda ve fibroblast sayısında artış ve nekroz alanlarında azalma gözlenmiştir. Intraperitoneal 5-FU kullanımına Zn ilavesi ile patlama basıncında (p:0.014), hidroksiprolin miktarında (p:0.054) ve histolojik olarak epitelizeasyon (p:0.002), fibroblast (p:0.000) ve kollajen miktarındaki anlamlı artış Zn'nun 5-FU'nun yara iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkisini düzelttiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: **Kolon anastomozu, 5-Fluorourasil, çinko, histopatoloji**

CERRAHI, malign gastrointestinal tümörler için etkili bir tedavi yöntemidir. Bununla birlikte kolorektal kanserlerin küratif rezeksiyonlarından

SUMMARY: Today adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy, is particularly appropriate treatment to prevent the local and regional recurrence in resectable colon cancers. Intraperitoneal 5-Fluorouracil (5-FU) is the most preferable agent for this purpose. The aim of this study is to determine the effect of Zn against the inhibitory effect of 5-FU on the healing of colonic anastomosis. In 5-FU treated group, average bursting pressure (p:0.048) and hydroxyproline levels were significantly decreased (p:0.015). In only Zn treated group, average bursting pressure was significantly increased (p:0.02) whereas hydroxyproline levels showed no correlation with the control group (p:0.560). In both 5-FU and Zn treated groups average bursting pressure had statistically significant correlation only with the 5-FU treated group (p:0.014). In this group hydroxyproline levels were increased as well (p:0.014). The histological observations showed that 5-FU impaired the healing of colonic anastomosis with the appearance of necrotic tissue at the anastomosis region. However the 5-FU and Zn groups appeared to be nearly completely epithelialized and also the number of fibroblasts were increased while necrotic tissue was not as much as in the 5-FU treated group. We conclude that Zn addition modulates healing of colonic anastomosis by counteracting the negative effect of 5-FU.

Key words: **Colon anastomosis, 5-Fluorouracil, zinc, histopathology**

sonra özellikle yüksek lokal rekürrens oranlarına rastlanması, araştırmaları cerrahiye destek olarak kemoterapi kullanma yönünde artırmıştır (1). Kemoterapotik ilaçların sistemik yolla verilmesi ile elde edilen sonuçlar çok başarılı değildir. Lokal ve reyonel rekürrensleri önlemede bugün için kabul edilen en iyi yol erken postoperatif dönemde intraperitoneal kemoterapidir (IPK) (2). Abdominal kavite içinde yayılan tümör hücreleri fibrin ile kaplandıkları için sistemik tedaviden et-

kilenmezler bu nedenle İPK ile hem rezeksiyon yeri, hem de peritoneal yüzeyler tamamen kemoterapotik ajanla temas haline geçerler. Ayrıca İPK yolu ile sistemik toksisite dozunu aşmadan daha yüksek lokal ilaç konsantrasyonu sağlanabilir (3). Kemoterapotik ajanlar yalnızca malign hücrelere etki etmekle kalmaz ayrıca cerrahi yaraların iyileşmesi üzerine de negatif etki gösterirler (4). Bu nedenle bu tedavi şeklinde anastomoz kaçığının gelişme şansı yüksektir. İPK yolu ile en çok uygulanan ilaçlardan biri 5-FU'dur. 5-FU'nun yara iyileşmesi üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir (1,3).

Eser elementlerden biri olan Zn'nin hem birçok metalloenzimin yapısına katılması, hem de nükleik asit ve protein sentezinde görev alması nedeni ile kollajen sentezindeki rolü bilinmektedir. Yara iyileşmesindeki en önemli aşamalardan biri de kollajen sentezidir. Daha önce yapılan çalışmalarda Zn eksikliğinin yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği, Zn verildiği zaman iyileşmenin hızlandığı gösterilmiştir (5).

Ancak hastalara intraperitoneal (İP) yolla Zn ilavesi yapıldığında, 5-FU'nun yara iyileşmesi üzerine olan negatif etkisini ne yönde değiştirdiğine dair bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu deneysel çalışmada İP 5-FU tedavisi ile birlikte Zn verilmesinin, kolon anastomozlarında cerrahi sonrası erken dönemde yara iyileşmesini nasıl etkilediğini araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 2500-3500 gram arasında ve aynı yaşta olan Yeni Zellanda cinsi 32 adet tavşan kullanıldı. Hayvanlar 8'erli 4 gruba ayrıldı. Ancak çalışma süreci içerisinde kontrol ve Zn alan gruplardan birer adet, 5-FU ve 5-FU+Zn alan gruplardan ikişer adet tavşan öldü, bu nedenle çalışmadan çıkarıldı. Tüm tavşanlarda Desendan kolonda peritoneal refleksiyonun 10 cm. proximalinden 1 cm'lik kolon segmenti çıkarıldıktan sonra serbest iki uç 5/0 prolen ile tek kat ucuca anastomoz edildi. Çıkarılan 1cm.lik sigmoid kolon parçası preoperatif doku Zn seviyesinin ölçülmesi amacı ile saklandı. İntraperitoneal tedavide kullanılmak üzere cut-down kateteri, bir ucu cilt altı ile rektus kası arasında, diğer ucu da periton içerisinde serbest olacak şekilde yerleşti-

rildi. Karın duvarı 2/0 atravmatik ipek sütür kullanılarak, tek kat halinde kapatıldı. Postoperatif 0. gün küvözde takip edilen tavşanlara, 1. gün su, 3. gün pelet gıda başlandı. Postoperatif 0. günden itibaren intraperitoneal olarak yerleştirilen kateterden 5 gün süre ile, 24 saatte tek doz halinde aşağıdaki enjeksiyonlar yapıldı.

1. Gruba 10 ml. Serum Fizyolojik
2. Gruba 10 mg/kg 5-FU
3. Gruba 2 mg/kg Zn
4. Gruba 10 mg/kg+2mg/kg 5-FU+Zn

7.gün hayvanlara intraperitoneal yüksek doz sodyum pentobarbital verilerek öldürüldükten sonra karın duvarı açıldı. Sol kolon adezyonlardan dikkatli bir şekilde temizlendikten sonra distalde peritoneal refleksiyonun hemen üzerinden, proksimalde anastomozun yaklaşık 10cm yukarısından kesilerek anastomoz segmenti çıkarıldı. Sonra mezenterik sınırdan disseke edilerek segment yalın bir hale getirildi.

Anastomoz hattının patlama basıncı aşağıda anlatılan teknikle ölçüldü. Daha sonra anastomoz mezenterik kenardan açılarak anastomoz hattını da içine alacak şekilde uzunlamasına şerit halinde 4 adet doku örneği alındı. Alınan doku örnekleri ışık ve elektron mikroskobu için rutin takibe alındı. Geri kalan doku örnekleri ise sırasıyla doku Zn tayini ve doku hidroksiprolin tayini için -20 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

1. Patlama basıncı (bursting pressure): Çıkarılan kolon parçasının, bir tarafına havalı tansiyon aletinin skala kısmı, diğer tarafına pompa kısmı adapte edilerek ipekler ile sıkıca bağlandı. İçi su dolu kaba, anastomozlu barsak segmentini içeren sistem bastırılarak yavaş yavaş şişirildi. Hava kabarcığının çıktığı andaki sfingomanometredeki mmHg basıncı patlama basıncı olarak ölçülüp kaydedildi.

2. Dokuda hidroksiprolin ölçümü: Anastomoz hattındaki hidroksiprolin düzeyi Wossner F. tarafından belirtilen yöntem ile ölçüldü (6). Bu yöntem göre solüsyonların abzorbanası spektrofotometrik olarak 557 nm'de tayin edildi. Hidroksiprolin değerleri direkt olarak standart eğriden mgr/mg değerinden ölçüldü.

3. Dokuda çinko ölçümü: Cam tüplerdeki yaş doku 110 °C'de etüvde 40 dakika süreyle bekletti-

lerek tartıldı. Son ölçümdeki değer bir önceki değerle aynı oluncaya kadar bu işleme devam edildi ve bu şekilde kuru doku ağırlığı elde edilmiş oldu.

Zn ölçümü için en az 1 gr. kuru doku gerektiğinden 1 gr.'ın altındaki bir örnek ölçüm dışı bırakıldı. Diğer örneklerdeki doku Zn düzeyleri "Differansiyel Puls Polarografisi" yöntemi ile ölçüldü.

4. Histolojik inceleme:

a-Işık Mikroskobu: Alınan doku örneği %10 luk formaldehitte fikse edildikten sonra alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve parafine gömüldü. Hematoksilen eozin ve acide fucsin-anilin blue boyası ile kollajen fibrilleri gösterildi. Işık mikroskobu ile, anastomoz hattı ve yara kenarlarının incelenmesi sonucu bu bölgenin morfolojik özellikleri Zuidewijn R. ve ark. tarafından oluşturulan skorlama sistemi ile değerlendirildi (7).

b- Elektron Mikroskobu: Sörenson fosfat tamponunda %2.5 gluteraldehide solüsyonu içerisinde dokular fixe edildi. Daha sonra % 0.1 OsO₄ ile post-fikasasyondan sonra dehidratasyon için alkol serilerinden geçirildi ve Araldit' e gömüldü. Alınan ince kesitler uranyl acetat - kurşun sitrat ile boyandı. Zeis EM 9S elektron mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları alındı. Bu yöntem ile fibroblast aktivitesi ve kollajen dağılımı incelendi.

Çalışma grupları arasındaki istatistiksel değerlendirmeler, SPSS for Windows ile yapıldı ve p<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasındaki ikişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ve Students t testi ile yapıldı (8).

BULGULAR

Patlama basıncı ölçümleri (mm Hg)

Gruplardaki patlama basıncı (PB) değerleri Tablo 1' de ve şekil 1'de gösterilmiştir.

5-FU grubunun PB değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak bulundu (p:0.048). Zn grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (p:0.002). 5-FU + Zn grubu ile 5-FU grubu arasında da istatistiksel bir anlamlılık bulundu (p:0.0142). Hidroksiprolin ölçümleri (mg/mg).

Grupların hidroksiprolin değerleri Tablo 2'de ve Şekil 1'de verilmiştir. 5-FU grubunda, kontrol grubuna göre hidroksiprolin düzeyi anlamlı olarak düşük bulunurken (p:0.015), Zn grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir istatistiksel fark saptanmamıştır (p:0.56). 5-FU+Zn grubundaki değerlerle 5-FU grubu arasında ise istatistiksel bir anlamlılık saptanmıştır (p: 0.054).

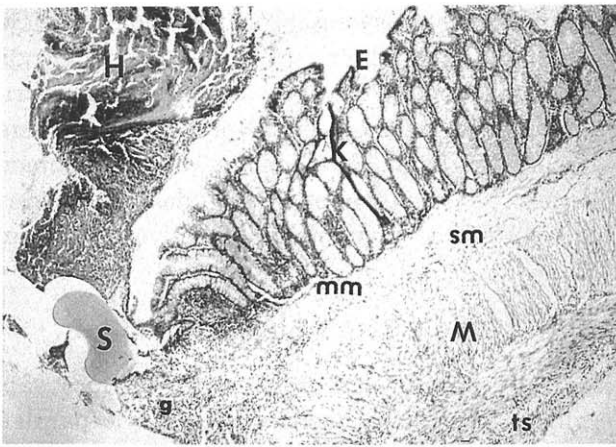
İŞIK MİKROSKOBU BULGULARI

Kontrol grubundan anastomoz bölgesinden alınan kesitlerde Goblet hücrelerinden zengin prizmatik örtü epiteli ve altında çok sayıda Liberkühn kriptaları gözlemlendi, Liberkühn kriptalarını çevreleyen ince bir lamina propria ve belirgin bir muskularis mukoza ile hemen altında yer alan, gevşek bağ dokusu yapısındaki submukoza tüm özellikleriyle normal kolon duvarı yapısını gösteriyordu. Defekt hattının komşuluğunda operasyona bağlı olduğu düşünülen hematoma alanları çoğu kesitte izlendi. Bunların yanı sıra yine aynı bölgede lamina proprianın iltihabi hücre infiltras-

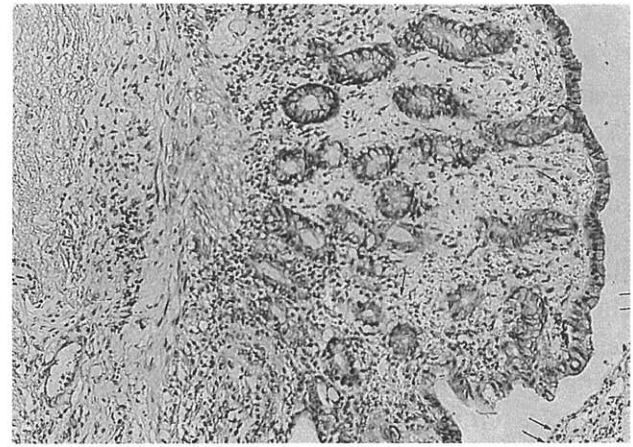
Tablo 1. Her denek için patlama basıncı ölçümleri ve gruplara göre ortalama değerler (mm Hg)

Denek No	Kontrol (n:7)	5-FU (n:6)	Zn (n:7)	5-FU + Zn (n:6)
1	6	8	10	8
2	5	5	11	6
3	9	4	9	8
4	6	5	11	12
5	7	6	13	10
6	8	4	10	8
7	8	-	10	-
Ortalama değerler	7 (±1.4)	5.3 (±1.5)	10.5 (±1.2)	8.6 (±2.0)

Kontrol- 5-FU p: 0.048
 Kontrol- Zn p: 0.002
 5-FU -5-FU+Zn p: 0.014



Resim 1. Kontrol grubundan alınan kesitte kolon duvarına ait normal yapı ve düzende örtü epiteli (E) ve Liberkuhn kriptaları (k), muskularis mukoza (mm), submukoza (sm), ve tunica muskularis (M) ile tunika seroza (ts) seçilmektedir. Cerrahi girişimin yapıldığı bölgeyi gösteren sutür materyali (S) ve her iki yanında iltihabi granülasyon dokusu (g) seçilmektedir. Sutürün solunda granülasyon dokusunun yakın komşuluğunda operasyona bağlı hematoma (H) oluşumu izlenmektedir. Epitel örtü sadece sağlam dokunun üzerindedir defekt bölgesinde yoktur (H.E., X40).



Resim 2. 5-FU grubunun yüzey epiteli altında lamina propriasında yaygın eritrosit ekstrevasyonu(ok) ve eksudatif bağ dokusu görüntüsü izlenmektedir. Defekt bölgesinde ise epiteli-zasyonun gerçekleşmediği gözlenmektedir (çift ok)(H.E., X10).

yonu ve artmış damarları ile tanımlanan genç-olgunlaşmakta olan granülasyon dokusu niteliklerini taşıdığı gözlemlendi. Tunika muskularis tabakasını oluşturan sirküler ve longitudinal kas katmanlarının, sutürlerin her iki tarafında da bölgenin yakınına kadar geldiği ancak operasyondan bir hafta sonra alınmış olan tüm doku örneklerinin tümünde de henüz devamlılık kazanmadığı dikkati çekti (Resim 1).

5-FU grubunu oluşturan tavşanların kolon örneklerinde ise oldukça dejeneratif bir görünüm hakimdi. Anastomoz bölgesinden alınan kesitlerde sutür materyalinin komşuluğunda oldukça yaygın, nekroza giden alanlar saptandı. Bu alanlarda

piknotik çekirdekli dejenere ölü hücrelerin yanı sıra kan göllenmesi nedeniyle küçük çaplı damarlarda oldukça yaygın konjesyon izlendi. Venüllerde daha belirgin olmak üzere damarlardaki konjesyon bölgedeki tüm damar türlerinde yaygın olarak gözlemlendi. Özellikle lamina propriada belirgin olan konjesyonun yanı sıra dokunun eksudasyona bağlı olarak ileri derecede ödemli olduğu ve çok sayıda damar dışına sızmış eritrositlerin bulunduğu dikkati çekti. Gevşek bağ dokusunda izlenen iltihabi hücre infiltrasyonunun özellikle nötrofillerden zengin olduğu saptandı (Resim2).

Zn grubunu oluşturan tavşanların kolonlarında, anastomoz bölgesindeki örtü epiteli restorasyonunun hayvanların çoğunluğunda tamamen, bazılarında ise kısmen tamamlandığı gözlemlendi. Yüzey epiteli, genelde tek katlı prizmatik epitel olup aralarında bol goblet hücreleri içeriyordu ancak

Tablo 2. Her denek için post operatif 7. gündeki gruplara göre ortalama değerler ($\mu\text{gr}/\text{mg}$)

Denek No	Kontrol (n:7)	5-FU (n:6)	Zn (n:7)	5-FU + Zn (n:6)
1	8.10	6.90	13.30	8.10
2	10.00	6.00	11.20	9.60
3	9.40	6.60	7.90	8.00
4	7.50	8.20	8.30	7.10
5	8.40	8.30	9.10	9.60
6	12.10	7.00	6.90	8.50
7	8.40	-	5.10	-
Ortalama değerler	9.1 (± 1.5)	7.1 (± 0.9)	8.8 (± 2.7)	8.4 (± 0.9)

Kontrol- 5-FU p: 0.015
 Kontrol- Zn p: 0.560
 5-FU -5-FU+Zn p: 0.054

epitelizasyonun yeni olduğu bölgelerde henüz tek katlı kübik ya da tek katlı alçak kübik epitel şeklinde olduğu ve goblet hücresi içermediği dik-kati çektir. Operasyon bölgesinde yüzey epitel örtüsü altında yer alan kriptaların derinlik yönünden birbirinden farklı ve sayıca az oldukları gözlemlendi. Bazı yeni kriptalar lümen çaplarının diğerlerine oranla çok daha büyük olduğu açıkça görülmüyordu. Bunların yanı sıra epitel altı bağ dokusunun oldukça gevşek örgülü, damardan çok zengin ve mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu gösteren olgunlaşmakta olan granülasyon dokusu özelliği gösterdiği saptandı. Tunika muskularisi oluşturan sirküler ve longitudinal kas tabakaları kontrol grubunda olduğu gibi defekt yerinin iki tarafında da kesintiye uğramakta ve devamlılık göstermemekte idi. Tunika seroza ise yine kollajen lifler ve bağ dokusu hücrelerinden zengin bir yapıya sahipti (Resim 3).

5-FU + Zn grubunun kesitleri dejeneratif doku örnekleri ile birlikte rejenerasyon bulguları da göstermekteydi. Tam defekt bölgesinde yüzey epitel

örtüsünün restorasyonu çoğu hayvanda neredeyse tümüyle tamamlanmıştı. Epitelin derinlerinde uygulanan cerrahi tekniğe bağlı olarak içe kıvrılarak sıkışan dejenere epitel örtüsü ve dejenere kriptalar gözlemlendi. Bu dejenere yapıların hemen iki yanında ise aktif granülasyon dokusunun varlığı tüm özellikleriyle birlikte izleniyordu (Resim 4).

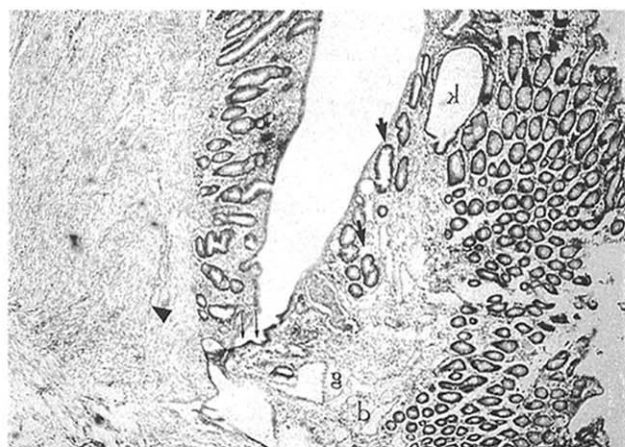
ELEKTRON MİKROSKOPU BULGULARI

Kontrol grubunu oluşturan örneklerin ince yapı özellikleri ışık mikroskobu gözlemleriyle paralellik gösteriyordu. Gevşek bağ dokusu yapısındaki lamina propriada mononükleer hücreler ve fibroblastlar görüldü. Hücrelerin arasında yer yer kollajen fibril demetleri ve kapillerler izleniyordu.

5-FU grubunda gevşek bağ dokusunda yer alan çoğu hücrede ileri derecede yozlaşmayı sergileyen ince yapı değişimleri gözlemlendi. Bu hücrelerde çekirdek yapısının bozulduğu, kromatinin çözülme-yeye gittiği yer yer bölgesel olarak kaba kümeler halinde toplandığı izlendi. Bu hücrelerin arasında

Tablo 3. Zuidewijn skorlama sistemi ile grupların histolojik olarak değerlendirilmesi ve istatistiksel olarak karşılaştırılması

Morfolojik Özellikleri	Kontrol (n:7)	5-FU (n:6)	Zn (n:7)	5-FU + Zn
Yara kenarı iyi (n)	1	-	3	1
Orta (n)	4	1	4	5
Kötü (n)	2	5	-	-
Yara kenarı iyi (n)	-	-	-	-
Orta (n)	4	-	5	3
Kötü (n)	3	6	2	3
Epitel (Ort. Puan)	0.85	0	5.14	3.83
Kontrol-5-FU p:0.035		Kontrol-Zn p:0.001		5-FU -5-FU +Zn p:0.002
Nekroz (n)	1/7	3/7	0/7	1/7
Eksuda (Ort. Puan)	0.14	2.1	0.28	0.33
Kontrol-5-FU p:0.016		Kontrol-Zn p:0.053		5-FU -5-FU +Zn p:0.074
Granülasyon (Ort. Puan)	2.57	1.5	2.57	2.50
Kontrol-5-FU p:0.011		Kontrol-Zn p:1.00		5-FU -5-FU +Zn p:0.019
Ödem (Ort. Puan)	0.25	1.5	0.75	0.66
Kontrol-5-FU p:0.006		Kontrol-Zn p:0.122		5-FU -5-FU +Zn p:0.030
Histiosit (Ort. Puan)	2.25	1.25	2.0	2.0
Kontrol-5-FU p:0.004		Kontrol-Zn p:0.141		5-FU -5-FU +Zn p:0.005
Fibroblast (Ort. Puan)	2.42	1.0	3.0	3.0
Kontrol-5-FU p:0.001		Kontrol-Zn p:0.022		5-FU -5-FU +Zn p:0.000
İnflamatuar Hücre (Ort. Puan)	2.57	0.83	2.57	2.50
Kontrol-5-FU p:0.001		Kontrol-Zn p:1		5-FU -5-FU +Zn p:0.002
Kan Damarları (Ort. Puan)	2.42	1.66	2.57	2.50
Kontrol-5-FU p:0.032		Kontrol-Zn p:0.60		5-FU -5-FU +Zn p:0.030

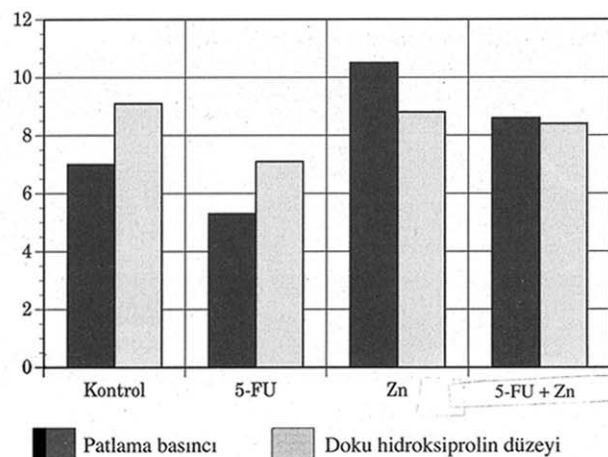


Resim 3. Zn grubunun anastomoz bölgesinin sol tarafında epitel ve kriptalar normal yapı ve düzende görülmekle birlikte tam defekt bölgesinde, restorasyonunun tümüyle tamamlandığı yeni yüzey epitel örtüsü (çift ok), ile hemen altında derinlikleri ve sayıları az, gelişmekte olan kriptalar izlenmektedir (ok). Arada normalden daha büyük lümeni olan kriptalar (k) dikkati çekmektedir. Aynı bölgeye uyan lamina proprianın bağ dokusunun olgunlaşma sürecindeki bir granülasyon dokusu (g) özelliği gösterdiği dikkati çekmektedir. Özellikle kan damarlarından (d) ve hücreden zengin bir görünümündedir. Ancak tunika muskularis tabakasında doku bütünlüğünün defekt bölgesinde sağlanmamış olduğu ve kesinti gösterdiği (ok başı) seçilmektedir (H.E.X4).

bol sayıda nötrofillere de rastlanıldı. Kollajen demetler daha önceki gruba göre daha az yoğun idi.

Zn grubunun lamina propriasında yer alan bol infiltratif hücrelerin arasında çok sayıda aktif fibroblastlar ve yoğun kollajen fibril demetleri göz-

Grafik 1. Gruplarda patlama basınçları ve doku hidroksiprolin düzeyleri



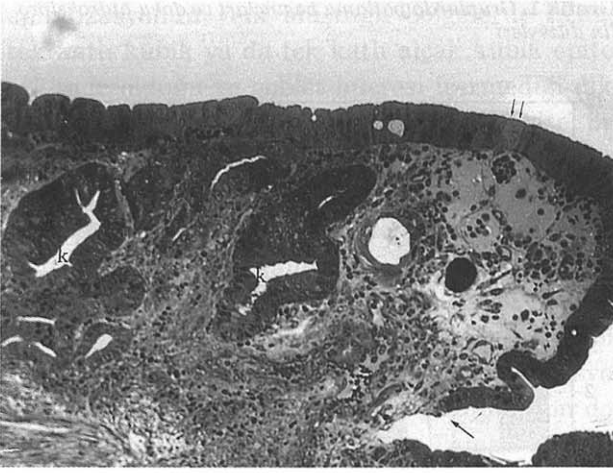
lendi. Hücre aktivasyonunu gösterir biçimde belirgin ökromatinden zengin iri çekirdeği ve hücre sitoplazmalarında genişlemiş sisternaları ile bol granüllü endoplazma retikulumları dikkati çekti (Resim 5).

5-FU+Zn grubunda ince yapı özellikleri aynı gruba ait ışık mikroskopik gözlemleri destekler özellikte idi. Gevşek bağ dokusundaki mononükleer hücrelerin arasında bol kollajen fibril demetler ve hemen yakın komşuluğunda aktif fibroblastlar gözlemlendi.

Tablo 4. Grupların preoperatif ve postoperatif doku Zn düzeylerinin karşılaştırılması (MZn / 100 mgr)

Denek sıra no:	Kontrol grubu		5-FU grubu		Zn grubu		5-FU+Zn grubu	
	Preop. Zn	Postop. Zn	Preop. Zn	Postop. Zn	Preop. Zn	Postop. Zn	Preop. Zn	Postop. Zn
1	3.95.10 ⁻⁷	6.90.10 ⁻⁷	5.34.10 ⁻⁷	3.00.10 ⁻⁷	6.36.10 ⁻⁷	2.76.10 ⁻⁶	4.52.10 ⁻⁷	1.10.10 ⁻⁶
2	3.90.10 ⁻⁷	7.00.10 ⁻⁷	6.00.10 ⁻⁷	3.20.10 ⁻⁷	6.40.10 ⁻⁷	3.00.10 ⁻⁶	5.00.10 ⁻⁷	1.00.10 ⁻⁶
3	3.70.10 ⁻⁷	7.10.10 ⁻⁷	5.50.10 ⁻⁷	3.70.10 ⁻⁷	7.00.10 ⁻⁷	4.00.10 ⁻⁶	3.00.10 ⁻⁷	2.00.10 ⁻⁶
4	3.85.10 ⁻⁷	6.95.10 ⁻⁷	5.60.10 ⁻⁷	2.95.10 ⁻⁷	6.50.10 ⁻⁷	3.84.10 ⁻⁶	4.84.10 ⁻⁷	1.05.10 ⁻⁶
5	3.80.10 ⁻⁷	7.30.10 ⁻⁷	5.80.10 ⁻⁷	3.50.10 ⁻⁷	6.80.10 ⁻⁷	5.00.10 ⁻⁶	5.40.10 ⁻⁷	2.44.10 ⁻⁶
6	4.00.10 ⁻⁷	7.50.10 ⁻⁷	5.30.10 ⁻⁷	3.90.10 ⁻⁷	7.15.10 ⁻⁷	3.80.10 ⁻⁶	4.44.10 ⁻⁷	1.50.10 ⁻⁶
7	3.95.10 ⁻⁷	7.00.10 ⁻⁷	-	-	7.30.10 ⁻⁷	-	-	-
Ortalama değer	3.90±0.10 10 ⁻⁷	7.00±0.12 10 ⁻⁷	5.55±0.27 10 ⁻⁷	3.35±0.38 10 ⁻⁷	6.80±0.37 10 ⁻⁷	3.84±0.73 10 ⁻⁶	4.68±0.82 10 ⁻⁷	1.35±0.57 10 ⁻⁶

Kontrol grubu Preoperatif Zn - Postoperatif Zn p: 0.0006
 5-FU grubu Preoperatif Zn - Postoperatif Zn p: 0.0022
 Zn grubu Preoperatif Zn - Postoperatif Zn p: 0.0006
 5-FU+Zn grubu Preoperatif Zn - Postoperatif Zn p: 0.0022



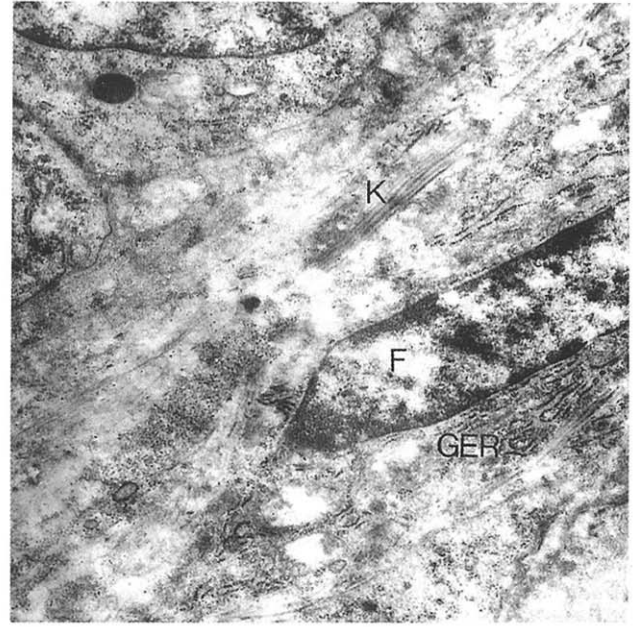
Resim 4. 5-FU + Zn grubunda yer yer goblet hücrelerinin arasına yerleştiği normal yapı ve düzende görülen tek katlı prizmatik epitel (çift ok) ve neredeyse kapanmak üzere olan ve henüz tek katlı kübik epitel görünümündeki yeni oluşan epitel hücreleri (ok) seçilmektedir. Yine yeni oluşmuş izlenimi veren değişik derinlik ve genişlikteki kriptaların (k) yanı sıra hücre infiltrasyonu ve vaskülarizasyon gözlenmektedir. (Metilen blue-azur II, X10).

HİSTOPATOLOJİK PUANLAMA

Işık mikroskobu bulguları Zuidewjin R. ve ark. tarafından oluşturulan skorlama sistemi ile her grup ve her denek için ayrı ayrı puanlandı (Tablo 3-6). Grupların ortalama sonuçları Tablo 7' de verilmiştir.

5-FU grubunda kontrol grubuna göre nekroz, ek-suda ve ödemin ön planda olduğu dikkati çekti. Epitel (p: 0.035), granülasyon (p: 0.011), fibroblast (p: 0.001), inflamatuvar hücre (p:0.001), kan damarları (p: 0.032) gibi histolojik parametrelerde de kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık saptandı. Zn kullanılan gruplarda özellikle epiteli-zasyonun ve fibroblast hücrelerinin artmış olduğu görüldü. Kontrol grubu ile Zn grubu karşılaştırıldığında epiteli-zasyon (p: 0.001) ve fibroblast miktarında (p: 0.022) istatistiksel bir anlamlılık bulundu. 5-FU ile 5-FU + Zn grubu arasında epitel (p:0.002), fibroblast (p:0.013), granülasyon (p:0.019), histiyosit (p:0.005), inflamatuvar hücre (p:0.002), kan damarları (p:0.030), ödem (p:0.030) gibi histolojik parametrelerde istatistiksel anlamlılık mevcutken, nekrozda (p:0.241) anlamlı bir değişiklik saptanamadı.

Dokudaki Zn Ölçümleri (Mol Zn/100 mgr) Grupların operasyon sırasında ve postoperatif 7. günde alınan barsak örneklerindeki Zn değerleri Tablo 8'de verilmiştir. Kontrol grubunda preoperatif do-



Resim 5. Zn grubundan alınan elektronmikrografda lamina propriadaki kollajen liflerin hemen komşuluğunda yer alan aktif bir fibroblast görülmektedir. Ökromatik çekirdeği ve sitoplazmasında geniş sisternaları ile bol sayıda granüllü endoplazma retikülümü seçilmektedir. GER: Granüllü endoplazma retikülümü, F: aktif fibroblast, K: kollajen (üranil asetat - kurşun sitrat, x 2500).

kudaki ortalama Zn düzeyi $3.90.10^{-7}$ Mol Zn/ 100 mg iken, 7. günde alınan kolon parçasında $7.00.10^{-7}$ Mol Zn/ 100 mg olduğu saptandı (p: 0.006). Bu yükselme Zn verilen gruplarda da gözlemlendi. Zn ve 5-FU + Zn gruplarında 7. gün alınan kolon parçasında toplanan Zn miktarı operasyon öncesine göre 10 kat fazla idi. 5-FU grubunda ise ameliyat sonrası alınan doku parçasında Zn miktarının istatistiksel olarak anlamlı azaldığı (p: 0.0022) saptandı.

TARTIŞMA

Malign kolorektal tümörlerin tedavisinde cerrahi sonrası sistemik 5-FU kullanımı bugün için vazgeçilmez bir tedavi yöntemidir. Ancak kolorektal kanserde lokal nüksün sıklığı adjuvan kemoterapiye değişik yöntemlerin aranmasına yol açmıştır. Bunun sonucu intraperitoneal (İP) kemoterapi uygulama alanına girmiş ve beraberinde çeşitli tartışmaları da getirmiştir. Bu yolla en sık kullanılan kemoterapotik ajan tek başına veya kombine olarak 5-FU dur. 5-FU'nun çoğalma özelliği gösteren hücreler üzerine hem DNA hem de RNA sentezini bozarak sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir (9). Bu etkiden dolayı 5-FU'nun yara

iyileşmesini geciktirdiği ve kolon anastomozunu kötü yönde etkilediğini gösteren (2,10-14) deneysel çalışmalar yanında, aksini savunan yayınlar da (15,16-19) vardır. İP 5-FU'nun yara iyileşmesi üzerine etkisi ile ilgili çelişkili sonuçların elde edilmesinin 5-FU'nun kümülatif dozundaki değişikliklere veya deney dizaynındaki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmektedir (11). Klinik çalışmaların bir kısmında 5-FU'nun yara iyileşmesini geciktireceği, yara ile ilgili komplikasyonları artıracığı bu nedenle tedaviye postoperatif 15.günden sonra başlanması gerektiği bildirilmiştir (20). Öte yandan klinik uygulamalarda gerek peroperatuar gerekse de erken postoperatuar 5-FU'nun sistemik olarak verilmesinin veya barsak lümenine verilmek suretiyle kullanılmasının ameliyat sonrası insizyon ve anastomoz iyileşmesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı savunulmaktadır (21).

Çalışmamızda ortalama patlama basıncının 5-FU alan deneklerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (p:0.048). Patlama basınçlarında elde edilen bulguları destekleyen bir diğer ölçü ise ışık mikroskobu görüntüleri olmuştur. 5-FU alan deney hayvanlarının hiçbirinde anastomoz bölgesi üzerinde epitel bulunmadığı ve epitel dokusunun devamlılığının sağlanamadığı, hepsinde nekroza giden alanlar olduğu, lamina propriada da belirgin bir konjesyon ve ödemin varlığı saptanmıştır. Gevşek bağ dokusu içerisinde izlenen iltihabi hücre infiltrasyonunun kontrol grubundaki kadar yoğun olmaması ve özellikle nötrofil ağırlıklı olması izlenen granülasyon dokusunun kontrol grubuna oranla daha genç bir devrede olduğunu göstermiştir. Bu bulguların Zuidewjin R. ve arkadaşları (7) tarafından oluşturulan skorlama sistemi ile değerlendirilmesinde; 5-FU grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında epitelizasyon (p:0.035), granülasyon (p:0.011), histiyosit (p:0.004), fibroblast (p: 0.001), inflamatuvar hücre (p:0.001) ve kan damarları (p:0.032) gibi parametrelerde belirgin azalma saptanmıştır. Elektron mikroskobik incelemede ise kollajen demetlerin daha az yoğun olduğu, gevşek bağ dokusunda yer alan hücrelerde bozulma olduğu gözlenmiştir.

Yara iyileşmesini gösteren biokimyasal parametrelerden biri olan hidroksiprolin düzeylerinin 5-FU grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak (p:0.015) düşük bulunması da kollajen yapı-

mının az olduğunu ve yara iyileşmesinin zayıf olduğunu göstermektedir. Tüm bu bulgular antime-tabolit grubu ilaçlardan 5-FU'nun yara onarımını olumsuz yönde etkilediği hipotezini doğrulamaktadır.

Zn'nun yara iyileşmesi üzerine etkisi ilk olarak Strain H. ve arkadaşları tarafından 1950'li yılların ortasında tanımlanmıştır (22). Yapılan deneysel çalışmalarda deri (23), kemik (24), jinja ve gastrik mukoza (25) gibi bir çok yaralı dokunun iyileşmesinde Zn'nun etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda yaralı dokudaki Zn düzeyinin özellikle yaralanmanın ilk birkaç günü içerisinde arttığı ortaya konmuştur (26-28). Bizim çalışmamızda da kontrol grubunda 7. günde alınan anastomoz parçasında Zn düzeyi yaklaşık 2 katı yüksek saptanmıştır (p:0.0006). Zn ve 5-FU+Zn gruplarından alınan kolon parçalarında ise bu artış 10 katı olmuştur. Bu yükselmenin yalnızca 5-FU alan grupta olmaması 5-FU'nun olumsuz etkilerine bağlı olabileceğini düşündürdü.

Zn düzeyi normal hayvanlarda ilave verilen Zn'nun yara iyileşmesini hızlandırmadığı (24) ancak Zn'dan fakir diyetle beslenen kontrol hayvanlarında iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (29,30). Bu çalışmada deneysel olarak Zn eksikliği oluşturmayarak, Zn düzeyi normal olan ve beslenme bozukluğu olmayan hayvanlarda İP Zn ilavesi ile meydana gelebilecek değişiklikler saptanmaya çalışılmıştır.

Zn verilen grupta; ortalama patlama basıncı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır (p:0.002). Dokular ışık mikroskobu ile incelendiğinde epitelizasyonun hayvanların çoğunda tamamlandığı, epitel altı bağ dokusunun damardan çok zengin ve mononukleer hücre infiltrasyonu gösteren granülasyon dokusu özelliğinde olduğu, tunica seroza'nın ise kollajen liflerden ve bağ dokusu hücrelerinden zengin bir yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Ancak yara kenarındaki kaslar tabakanın anastomozun iki tarafında da kesintiye uğraması kaslar rejenerasyonun 100.günde tamamlanması nedeni ile normal kabul edilmiştir. Bu bulgular histopatolojik skorlama sistemi ile değerlendirildiğinde epitelizasyon (p:0.001) ve fibroblast sayısında (p:0.022) belirgin bir artış gözlenmiştir. Diğer parametrelerde kontrol grubu ile Zn grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar Hallmans G. ve arkadaşları'nın çalışması (31) ile ben-

zer olarak Zn'nun, Zn düzeyi normal olan hayvanlarda yara iyileşmesinin yalnızca epitelizeasyon aşamasında etkili olduğunu göstermiştir. Patlama basıncının anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen hidroksiprolin düzeylerinin bunu desteklememesi (p:0.560) yara iyileşmesinin kollajen birikimi aşamasının etkilenmediğini düşündürmektedir.

5-FU+Zn grubunda ise, 5-FU'nun yara iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkilerinin Zn ile ortadan kalktığı saptandı. Yalnızca 5-FU verilen grupta ortalama patlama basıncı Zn ilave edilen gruba göre anlamlı olarak düşük idi (p:0.014). Histolojik olarak 5-FU grubunda gözlenmeyen yüzey epitel örtüsü, Zn ilave edilen grupta gözlenmekte ve nerede ise çoğu hayvanda tümü ile tamamlanmaktaydı. Dokuda ödem 5-FU alan gruba oranla daha az idi. Lamina propria, submukoza ve seroza bağ dokularında kollajen demetlerde belirgin bir artış olduğu açıkça gözlemlendi. Histolojik bulgular skorla-

ma sistemine göre değerlendirildiğinde 5-FU+Zn alan grupta epitelizeasyon (p:0.002), granülasyon (p:0.019), histiyosit (p:0.005), fibroblast (p:0.000), inflammatuar hücre (p:0.002) ve kan damarlarında (p:0.030) 5-FU alan gruba göre anlamlı derecede artma mevcut idi. Nekroz ve ödemin belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. Elektron mikroskobu bulguları da ışık mikroskobunu desteklemekteydi. Hidroksiprolin düzeyleri karşılaştırıldığında ise 5-FU+Zn grubunda daha yüksek bir ortalama değer saptandı (p:0.054). Bu bulgularla 5-FU ile birlikte IP Zn tedavisinin anastomoz iyileşmesini olumlu yönde etkileyeceği sonucuna varıldı.

Zn'nun 5-FU'nun olumsuz etkilerini hangi aşamada kaldırdığını saptamak amacı ile yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır. Diğer taraftan IP kullanımında Zn'nun belirgin yan etkisi saptanmamıştır. Bu yüzden klinik olarak IP kemoterapi uygulamalarında Zn'nun birlikte kullanılmasının faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- De Vita V, Heliman S, Rosenberg S. Cancer, 1993; 929-951.
- Martens M, Hendriks T, Wobbes T. Intraperitoneal cytostatics impair early post-operative collagen synthesis in experimental intestinal anastomoses. Br J Cancer 1992; 65: 649-654.
- Dedrick R, Myers C, Bungay P, et al. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarium cancer. 1978; 62:1-10.
- Ferguson M. The effect of antineoplastic agents on wound healing. Surgery. 1982; 154:421-429.
- Thomas JC, Austin IM, Kelman C. Biology of Wound Healing. Surg Clin N Am 1984; 64:721-733.
- Woessner J., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. Arch Biochem Biophys 1961; 93:440-447.
- Zuidewijn R, Schillings P, Wobbes TH, et al. Histologic evaluation of wound healing in experimental intestinal anastomoses: effects of antineoplastic agents. Int J Exp Path 1992; 73:465-484.
- Haykan M, Özdemir Ö. Bilgisayarlı istatistik ve Tıp. 1995; 227-272.
- Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Cilt 1: 900-946.
- Welber S, Graf W, Glimelius B, et al. The effect of 5-Fluorouracil on wound healing and collagen synthesis in the left colon anastomoses. Eur Surg Res 1994; 26:173-178.
- Graf W, Welber S, Glimelius B, et al. Influence of 5-FU and folic acid on colonic healing: an experimental study in the rat. Br J Surg 1992; 79:825-828.
- Wilhelm G, Ivarsson M, Gerdin B, et al. The influence of early postoperative intraperitoneal chemotherapy on human wound healing. J Surg Res 1994; 57:394-400.
- Wilhelm G, Welber S, Jiboran H, et al. The roles of nutritional depletion and drug concentration in 5-FU induced inhibition of colonic healing. J Surg Res 1994; 56:452-456.
- Weiber S, Graf W, Glimelius B, et al. Experimental colonic healing in relation to timing of 5-FU therapy. British Journal of Surgery 1994; 81:1677-1680.
- Aszodi A, Ponsky J. Effects of 5-fluorouracil on the healing of bowel anastomosis in rats. The American Surgeon 1985; 52:671-674.
- Hillan K, Nordlinger B, Ballet F. The healing of colonic anastomoses after early intraperitoneal chemotherapy: An experimental study in rats. J Surg Res 1988; 44:166-171.
- Berberoglu U, Ereku S, Akbay C. ve ark. Antimetabolit grubu kemoterapötiklerin yara iyileşmesine etkileri. Ulusal Cerrahi Derneği 1989; 3:11-14.
- Klausner J, Lelcuk S, Inbar M. The affects of perioperative Fluorouracil administration on convalescence and wound healing. Arch Surg 1986; 121:239-242.
- Waard JW, Wobbes T, Hendriks T. Early post operative 5-fluorouracil does not affect the healing of experimental intestinal anastomoses. Int J Col Dis 1993; 8:175-178.
- Falcone E, Nappi F. Chemotherapy and wound healing. Surg Clin N Am 1984; 64:779-794.
- Klausner M. The effects of perioperative fluorouracil administration on convalescence and wound healing. Arch Surg 1986; 136:239-242.
- Strain W, Dutton A, Heyer H. Experimental studies on the acceleration of burn and wound healing. Univ. of rochester report. 1953:16.
- Harold H., Verne C., Glenn H., et al; Effects of zinc deficiency and zinc supplementation. The Am J Clin Nutr 1970; 23:514-519.
- Karacioğlu Z, Sarper R. Zinc and copper in medicine. 1981; 535-577.
- Ogle C., Cho C.; Studies on the action of zinc on the gastric effects of starvation or reserpine in rats with increased stomach mast cell populations. Parm Res Comm 1978; 10:597.

26. Savlov E.d., Strain W.h., Huegin F.; Radozinc studies in experimental wound healing. JSR 1962, 11:209-212.
27. Henzel H. Zinc concentrations. Arch Surg 1970; 100:350-357.
28. Fraser WD, Taggart DP, Fell GS, et al. Changes in Iron, Zinc and copper concentration in serum and in their binding to transport proteins after colecystectomy and cardiac surgery. Clin Chem 1989; 35:2243-2247.
29. Carole J, Gary E. Absorption of trace metals in the zinc deficient rat. Am J Physiol 1975; 228:1020-1023.
30. Storey M, Greger J. Iron Zinc and Copper interactions: Chronic versus acute responses of rats. Am Inst Nutr 1986; 17:1434-1442.
31. Hallmans G, Hanström L, Lundgren E. The effect of zinc tape upon wound healing. Scand J Plast Reconstr Surg. 1979; 13:251-259