

Sepsis Oluşturulan Ratlarda Kan Glukoz Düzeyinin Mortaliteye Etkisi

Mehmet Akif YAŞAR^{a1}, Ramazan ÖDEŞ¹, Ahmet KİZİRGİL², Bilal ÜSTÜNDAĞ³, Demet YAŞAR¹,
Yasemin BULUT², İsmail DEMİREL¹

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı,

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ELAZIĞ

ÖZET

Giriş: Son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde yapılan çok merkezli çalışmalarda mortalitenin önemli belirleyicilerinden birisinin de kan glukoz düzeyi olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada sepsis oluşturulan ratlarda sadece kan glukoz düzeyi değişken tutulup bunun mortaliteye etkileri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: 60 adet wistard türü rat çalışmaya alındı. Tüm hayvanlarda bakteriyel translokasyonu tespit edebilmek amacıyla; E. Coli lipopolisakkarit'i (LPS) 5 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanarak sepsis modeli oluşturuldu. Denekler kontrol grubunda kan glukoz düzeyi 85-110 mg/dl olanlar ve diabetik grupta ise 180-215 mg/dl arasında olanlar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Şok belirtileri saptandıktan sonra ölen ratlardan, doku örnekleri (Mezenter lenf nodu, karaciğer, dalak) alındı. Polymerase Chain Reaction (PCR) ve kültür yöntemi ile bakteriyel translokasyon araştırıldı.

Bulgular: Diyabetik gruptaki ratlara LPS uyguladıktan sonra 5 gün içinde tamamı, kontrol grubunda ise 12 gün içinde tamamı kaybedildi. Mortalite hızı diabetik grupta, kontrol grubuna göre yüksek olarak bulundu (p<0.05).

Sonuç: Bu çalışmada sepsis oluşturulan ratlarda sadece kan glukoz düzeyi değişken tutulup mortaliteye bakıldı. Sonuç olarak, sepsis oluşturulan ratlarda kan glukoz düzeyinin 80-110 mg/dl aralığında tutulduğunda mortalite hızının düştüğü kanısına vardık. ©2007, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Anahtar kelimeler: Kan, glukoz düzeyi

ABSTRACT

The effect of blood glucose level in experimental of sepsis rats on mortality

Objectives: The recent multitask studies made in the intensive care unites, it is detected that blood glucose level is one of the most determining factors for mortality. In this study the blood glucose level in experimental of sepsis in rats is altered and the effect of blood glucose level alterations on mortality is studied.

Material and Methods: 60 wistard rats are included into the study. An artificial sepsis model is designed in all subjects by matching an intraperitoneal injection of 5 mg/kg E.Coli LPS in order to determine the bacterial translocation. The subjects are divided into two groups which include the group coith blood glucose level between 85-110 and the diabetic group with blood glucose level between 180-215. Tissue samples (mesenteric lymph node, liver, spleen) are taken from the subjects which died after shocoing symptoms of shock. Bacterial translocation is studied by using PCR and blood culture methods.

Results: All the subjects in the diabetic group died in the first five day and all the subjects in the control group died in the first twelve days after LPS application. The mortality rate in the diabetic group is detected as statistically significant higher than the mortality rate in the control group (p<0.05)

Conculation: In this study mortality of experimental sepsis in rats with only alterations in blood glucose level is studied. We come to the conclusion that mortality rate is decreasing experimental sepsis in rats by keeping the blood glucose level between 80-110 mg/dl. ©2007, Fırat University, Medical Faculty

Key words: Sepsis, blood glucose level

Sepsis insidansı yaşlı popülasyonun giderek artmasına, daha sık invaziv girişimler uygulanmasına ve immünsupresif tedavilere, bağlı olarak artmıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık 750.000 sepsis olgusu ortaya çıkmakta ve bunların en az 225.000'i ölümcül seyretmektedir (1). Antimikrobiyal ajanların kullanımına, ileri yaşam desteğindeki ve bakımdaki gelişmelere rağmen sepsisli hastaların mortalitesi hala % 30-40 dolayındadır.

Son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde yapılan çok merkezli çalışmalarda mortalitenin önemli belirleyicilerinden birisinin de kan glukoz düzeyi olduğu ve yoğun bakım ünitelerinde kan glukoz düzeylerinin yüksek olduğu hasta grubunda mortalitede önemli artışlar olduğu bildirilmiştir (2). Strese bağlı hiperglisemi ve insülin direnci sepsisli hastaların büyük bölümünde görülmektedir. Bu metabolik değişikliklerin gelişmesinden birçok mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Ancak asıl rolü, pro-inflamatuvar sitokinlerin ve kontr-regülötör

^a Yazışma Adresi: Dr. Mehmet Akif Yaşar, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Elazığ
Tel: +90 424 2333555 /2159 e-mail: mayyasar@yahoo.com

hormonların aşırı salınımının oynadığı sanılmaktadır. Hiperglisemi pro-inflamatuar, insülin ise anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Ayrıca kan glukoz düzeyindeki artışlar gastrointestinal sistemde hareketin azalmasına neden olduğu bildirilmiş ve bu yolla translokasyonun arttığı gözlenmiştir (3). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda hastalar, yoğun bakım ünitesinde farklı nedenlerle yatan standardize edilme zorluğu olan hasta grubundan oluşmaktadır. Bu çalışmada ise sepsis oluşturulan ratlarda sadece kan glukoz düzeyi değişken tutularak translokasyona etkileri PCR ile tespit edilip bunun mortaliteye etkileri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza ağırlıkları 150-200 gr olan 60 adet wistar türü dişi rat alındı. Ratlar ısı kontrollü odada (22-25 °C), 12 saat aydınlatma ve 12 saat karanlıkta tutuldular. Her gün su ve Elazığ yem fabrikasından temin edilen özel rat yemi verildi ve kafesleri temizlendi. Ratlar, biri çalışma (diyabetik yapılacak grup) diğeri kontrol grubu (diyabetik yapılmayacak grup) olacak şekilde otuzarlık iki gruba ayrıldı.

Çalışma grubu olarak ayrılan toplam 30 ratta, intraperitoneal olarak 50 mg/kg streptozosin (STZ) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) 0.1 M sitrat tampon çözümüyle çözünmüş halde (pH=4.5) verilerek diyabet mellitus oluşturuldu. Çalışma grubundaki ratlar STZ uygulandıktan 3 gün sonra 8 saat aç bırakıldı. Kuyruk veninden alınan kandan, Medisense Optimum (Abbott Laboratories, USA) glukometri cihazı ile glukoz düzeyine bakıldı. Kan glukoz konsantrasyonu 250 mg/dl'nin üzerinde olanlarda diyabet olduğu kabul edildi. Kan glukoz konsantrasyonu 250 mg/dl'nin altında olanlarda ise diyabet oluşmadığı kabul edilerek, diyabet oluşmayan iki rat çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubundaki tüm ratların 8 saatlik açlık sonrası alınan kan örneklerinde glukoz seviyesi normal sınırlarda saptandı.

Çalışma ve kontrol grubundaki toplam 58 rat, intramüsküler uygulanan 30 mg/kg ketamin ile anestezize edildikten sonra karın ciltleri traş edildi ve iyot ile temizlendi. Tüm hayvanlarda bakteriyel translokasyonu tespit edebilmek amacıyla; E. Coli lipopolisakkarit'i (LPS) (Sigma) 5 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanarak sepsis modeli oluşturuldu. Yaklaşık iki saat sonra tüm ratların kan glukoz düzeyleri ölçüldü ve bu işlem üçer saat süreyle toplam 4 kez tekrarlandı. Kontrol grubunda kan glukoz düzeyi 110 mg/dl; çalışma grubunda ise 215 mg/dl değerlerini aştığı saptandığında bu ratlara kan glukoz düzeyleri kontrol grubunda 80-110, çalışma grubunda 180-215 aralığına olacak şekilde NPH insülin tedavisi uygulandı. Bu esnada çalışma grubundan 4 ve kontrol grubundan 1 rat hayatını kaybetti.

Sepsis gelişimi sonrası ölen ratların karaciğer ve dalakları çıkarılarak; bu dokulardaki enjekte edilen E. Coli suşuna bağlı bakteriyel translokasyon hem kültür ve hem de PCR yöntemi ile araştırıldı.

Karaciğer ve dalak örnekleri steril bir bistüri ile iki eşit parçaya bölündü. İlk parça kanlı agar ve Eosine-Methylene Blue agar besiyerlerine ekilerek 36 °C derecede 18-24 saatlik aerobik kültürde alındı. Bu süre sonunda üreyen Gram negatif çomak morfolojisindeki bakteriler, klasik bakteriyolojik yöntemler ve API ID 32E (Bio Mérieux) kitleri ile tanımlandı. Karaciğer ve dalak dokularının ikinci parçası çalışma süresine kadar -40 °C'de steril SF çözümü içinde saklandı.

DNA Ekstraksiyonu ve PCR: Örneklerden DNA ekstraksiyonu ticari bir kit ile (Wizard Genomic DNA

Purification kiti, Promega) gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lar 50 ml. steril distile su ile sulandırıldı. Bu örnekler, PCR'da kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı (4).

Elde edilen DNA'lar ile sadece E. Coli'nin β-galaktosidaz (Lac Z geni) gen bölgesine spesifik olan ve diğer gram negatif bakteriler için spesifik olmayan, BG-1 ve BG-4 primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi (5,6). PCR aşamasında her örnek için; 10X PCR buffer, 25mM MgCl₂, her birinden 100 mM olan dNTP'ler, 20 pmol/μl BG-1 (5'- CTT TGC CTG GTT TCC GGC ACC AGA A - 3'), 20 pmol/μl BG-4 (5'- ACC CAC CGC ACG ATA GAG ATT CGG G - 3'), 23.5 μl dH₂O ve 0.5 μl 1U'lık Taq DNA polimeraz (Promega/ABD) enzimi içeren karışım hazırlandı. Mikrosantrifüj tüplerine 40 μl PCR karışımı ve 10 μl örnek DNA'sı bırakıldı. Daha sonra örnekler, 1 döngü 94 °C'de 2 dk. ön ısıtmayı takiben, 94 °C'de 1 dak. denatürasyon, 56 °C'de 1 dk. birleşme ile 72 °C'de 1 dk. uzatma basamaklarından oluşan toplam 35 döngü ve 1 döngü de son uzatma 72 °C'de 10 dk. olacak şekilde PCR cihazında çoğaltıldı. (4, 5, 6).

Elde edilen PCR ürünleri 0.5 mg/ml. etidyum bromid içeren % 2'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Elektroforez sonrası, PCR ürünleri görüntüleme sisteminde ultraviyole ışınları ile incelendi ve yaklaşık olarak 760 baz çifti (bp) büyüklüğündeki bantlar pozitif olarak değerlendirildi (Şekil-1).

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak, geleneksel yöntemler ile kültürde E. Coli olduğu belirlenen bakteriden elde edilen DNA ve negatif kontrol olarak ise steril dH₂O kullanıldı. PCR'ın duyarlılığı, pozitif kontrol olarak kullanılan E. Coli DNA'sının 10 katlık dilüsyonlarından hazırlanan örneklerin PCR'ının yapılmasıyla belirlendi. Yanlış pozitiflik ve negatifliği önlemek için, deneyin her aşamasında pozitif ve negatif kontroller kesinlikle kullanılarak, steril kabinlerde çalışıldı.



Şekil-1; PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel göç motifleri. M; 100 bp'lik DNA ladder ağırlık markeri (Bio Basic Inc., Canada), **hat 1;** pozitif kontrole ait 760 bp'lik bant (standart E. Coli kültüründen elde edilen DNA), **hat 2;** DNA ekstraksiyonu için negatif kontrol (steril dH₂O), **hat 3,4,6;** rat dokularından yapılan PCR sonucu 760 bp'lik bant yönünden pozitif bulunan örnekler ve **hat 5;** rat dokularından yapılan PCR sonucu 760 bp'lik bant yönünden negatif bulunan örnek.

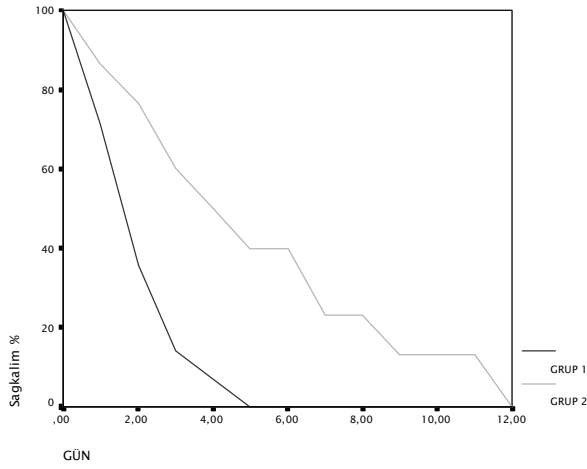
İstatiksel analiz; sağ kalımı göstermek için Cox-Regresyonu kullanıldı. Bakteriyel translokasyonu göstermek için Chi-square testi kullanıldı.

BULGULAR

Diyabetik gruptaki ratlara LPS uyguladıktan sonra 5 gün içinde tamamı, kontrol grubunda ise 12 gün içinde tamamı kaybedildi. Mortalite hızı diyabetik grupta, kontrol grubuna göre yüksek olarak bulundu ($p < 0.05$).

PCR ile değerlendirilmede, diyabetik grupta sepsis gelişen 26 ratın, 23'ünde (%88,5) doku örneklerinde E.Coli gösterildi. Kontrol; grubunda ise sepsis gelişen 28 rat, 20'inde (%71,4) doku örneklerinde E.Coli gösterildi ($p=0,023$)

Şekil 2. Sağkalım-Zaman grafiği



TARTIŞMA

Yoğun bakım hastalarının çoğunda diyabet hikayesi olmasa bile hormonlar ve karbonhidrat metabolizmasındaki değişikliklerden (periferik glukoz talebinde artma, karaciğer glukoz üretiminde artma, insülin direnci, göreceli olarak insülin eksikliği) dolayı hiperglisemi meydana gelmektedir (2,7). Ayrıca kortikosteroidler, vazopressörler ve enteral veya parenteral beslenmede kan glukoz düzeyini arttırmaktadır (8).

Stres hiperglisemi, konak savunma mekanizmasını azaltır, endotelial disfonksiyona neden olur, inflamatuvar sitokinleri artırır ve miyokardiyal metabolizma değişikliklerine yol açar (9,10). Özellikle insülin MIF, TNF- α , IL-1, IL-6 ve serbest radikal üretimini baskılar, endotelial NO ve IL-10, IL-4 gibi anti-inflamatuvar sitokin üretimini artırır. Ek olarak insülin stres hiperglisemiyi miyokard fonksiyonlarını düzeltir (11).

KAYNAKLAR

1. Angus DC, Linde WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310.
2. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in critically ill. *N Engl J Med* 2001 345: 1359-1367.
3. Baker WJ, Edwin AD, Berg RD, et al. Hemorrhagic Shock Induces Bacterial Translocation from the Gut. *The Journal of Trauma* 1988; 28; 896-904.
4. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.
5. Kane TD, Johnson SR, Alexander JW, et al. Detection of intestinal bacterial translocation using PCR. *J Surg Res* 1996; 63: 59-63.
6. Kazez A, Sağlam M, Doymaz MZ, et al. Detection of bacterial translocation during intestinal distension in rats using the polymerase chain reaction. *Pediatr Surg Int* 2001; 17: 624-627.

Yoğun bakım ünitelerinde yoğun insülin tedavisi sonucu kan glukoz düzeyinin 110 mg/dl'nin altında tutulması ile mortalite ve morbidite önemli derecede düşmüştür. Kemirici hayvanlarda hiperglisemi, endotoksik şoku artırır ve insülin tedavisi ile mortalite azalır (12,13). Hiperglisemi insanlarda, cerrahiden veya yanıklardan sonra morbidite ve mortaliteyi arttırabilir (14,15). Bundan dolayı Diabetes Mellituslu veya stres hiperglisemili sepsisli hastalarda, hiperglisemi tedavi edilmediğinde veya yetersiz tedavi edildiğinde inflamasyon, travma veya iskemi-reperfüzyondan sonra organ fonksiyonları üzerine zıt etkiye sahiptir ve mortalite ve morbiditeyi artırır.

Septik şokta insülin direnci gelişmektedir. Sepsis ve septik şokta önce hiperglisemik faz sonra hipoglisemik faz meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada ekzojen insülin infüzyonu ile kontrol grubunda glukoz tüketimi önemli derecede artarken sepsisli hastalarda artmadığı gösterilmiştir (16). Septik şokun başlangıç döneminde üretimin azalmasından değil de yıkımın artmasından dolayı düşük insülin düzeyi görülmektedir (17). Sepsisli hastalarda insülin salınımı değişmemesine rağmen özellikle karaciğer ve iskelet kasında insüline direnç gelişmektedir.

Sepsis ve septik şokta insülin direnci geliştiğinden dolayı, insülin tam etkili olamamaktadır (18). Bu durumu bir miktar sürekli insülin infüzyonu ile düzeltmek mümkündür. Sepsis ve septik şokun erken döneminde hiperglisemi görülür ve sonraki dönemlerde ise hipoglisemi olur (19).

Van den Berghe ve arkadaşlarının 1548 hastayı kapsayan prospektif randomize ve kontrollü yaptığı bir çalışmada, yoğun insülin tedavisinin cerrahi yoğun bakım ünitesine kabul edilen hastalarda mortalite ve morbiditeyi azalttığı göstermişlerdir. Bu çalışmada kan glukoz düzeyi bir grupta yoğun insülin tedavisi ile 80-110 mg dl⁻¹ arasında tutulurken, geleneksel yöntemin uygulandığı diğer grupta insülin infüzyonuna yalnızca glukoz düzeyi 215 mg dl⁻¹'yi aşınca başlanmış ve 180-200 mg dl⁻¹ arasında tutulması hedeflenmiştir. Geleneksel tedavi grubunda mortalite % 8.0 iken sıkı glukoz kontrolü ile % 4.6'ya düşmüştür.

Bu çalışmada sepsis oluşturulan ratlarda, kan glukoz düzeyi, değişken tutulup mortalite bakteriyel translokasyona etkisine bakıldı. Kan glukoz düzeyi arttıkça mortalite ve bakteriyel translokasyonun arttığı bulundu.

Sonuç olarak kan glukoz düzeyi, 80-110 mg/dl aralığında yoğun insülin tedavisi ile tutulduğunda mortalite, bakteriyel translokasyon ve sepsis gelişiminin azalmıştır. Bu azalmanın glukoz düzeyinin düşüşüne mi? Yoksa verilen insüline mi? Bağlı olduğunu araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. Mizrock BA: Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *Am J Med*, 1995; 98:75-107
8. Inzucchi SE, Goldberg PA, Dziura JD, et al. Risk factors for poor glycemic control in a medical intensive care unit (ICU) (Abstract). *Diabetes* 52 (Suppl. 1):A96, 2003
9. Preiser J-C, Devos P, Van den Berghe G. Tight control of glycaemia in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 533-537.
10. Oliver MF, Opie LH. Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias. *Lancet* 1994; 343:155-158
11. Undurti ND. Current advances in sepsis and septic shock with particular emphasis on the role of insulin. *Med Sci Monit* 2003; 9:181-192.
12. Losser MR, Bernard C, Beaudoux JL, et al. Glucose modulates hemodynamic, metabolic, and inflammatory responses to lipopolysaccharide in rabbits. *J Appl Physiol* 1997; 83: 1566-1574.
13. Ling PR, Lydon E, Frederich RC, et al. Metabolic effects of insulin and insulin-like growth factor-1 in endotoxemic rats during total parenteral nutrition feeding. *Metabolism* 2000; 49: 611-615.
14. Ljungqvist O, Nygren J, Thorell A. Insulin resistance and elective surgery. *Surgery* 2000; 128: 757-760.
15. Gore DC, Chinkes D, Hegggers J, et al. Association of hyperglycemia with increased mortality after severe burn injury. *J Trauma* 2001; 51: 540-544.
16. Chambrier C, Laville M, Rhzioual Berrada K, et al: Insulin sensitivity of glucose and fat metabolism in severe sepsis. *Clin Sci (Colch)* 2000; 99: 321-328.
17. Dahn MS, Lange MP, Mitchell RA, et al: Insulin production following injury and sepsis. *J Trauma* 1987; 27: 1031-1038.
18. Raymond RM, Harkema JM, Emerson TE. In vivo skeletal muscle insulin resistance during E Coli endotoxin shock in the dog. *Circ Shock* 1981; 8: 425-433.
19. Maitra SR, Wang S, Baithwaite CE, et al. Alterations in glucose-6-phosphatase gene expression in sepsis. *J Trauma* 2000; 49: 38-42.

Kabul Tarihi: 08.09.2006