



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ
DİYAFRAM KASI VE FRENİK SİNİR ÜZERİNE ETKİSİ
VE N-ACETYL CYSTEİNE'in ROLÜ

Dr. Hakan TAŞKINLAR
UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. Ali NAYCI
DANIŞMAN

MERSİN – 2006



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ
DİYAFRAM KASI VE FRENİK SİNİR ÜZERİNE ETKİSİ
VE N-ACETYL CYSTEİNE'in ROLÜ

Dr. Hakan TAŞKINLAR
UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. Ali NAYCI
DANIŞMAN

MERSİN – 2006

Bu tez, BAP-TF CTB (HT)-2006-1 TU kodlu proje olarak
MeÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Üniversitemiz'de Atatürk ilkelerine uygun, çağdaş, bilimsel gelişmelere açık akademik bir ortamda çalışmamız için desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Rektörümüz Sayın Prof. Dr. Uğur Oral'a ve Dekanımız Prof. Dr. Esat Yılgör'e, çocuk cerrahisi eğitimimde büyük emeği bulunan başta Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Selim Aksöyek'e ve tez danışmanım Doç. Dr. Ali Naycı'ya, Doç Dr. Dinçer Avlan'a, ve Yrd. Doç. Dr. Gökhan Gündoğdu'ya, tezimin başlangıç aşamasından son aşamasına kadar bana yardımcı olan hocalarım Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Doç Dr. Ülkü Çömelekoğlu'na, Biyofizik Anabilim Dalı'nda görevli arkadaşlarıma, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç Dr. Gürbüz Polat'a ve Dr. Özlem Görüroğlu'na, Nöroloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Aynur Özge'ye, Histoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Tülin Baykal'a, Doç Dr. Banu Coşkun'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Doç Dr. Arzu Kanık'a, Arş. Görevlisi İlder Helvacı'ya, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Suzan Zorludemir'e, bana sonsuz desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiren, benim için her şeyi olur kılan babama ve anneme, kardeşlerime, tüm sevdiklerime, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma, sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Hakan Taşkınlar

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	9
1. İskemi ve Reperfüzyon	9
1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarlanmasında Rol Oynayan Faktörler	11
1.2. İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Savunma Mekanizmaları	18
1.3. İskemi Reperfüzyonun Uzak Organ Hasarı	19
2. N-acetyl cystein	20
3. Diyafram Kası ve Frenik Sinir Anatomisi	22
4. Kas Kasılma Mekanîği	24
5. Solunum Mekanîği	25
6. Elektromiyografi ve Sinir İletim Hızı Çalışmaları	26
GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
1. İskemi Reperfüzyon Modeli	28
2. Deney Grupları	29
3. Oksidatif Stres Belirteçleri ve Sitokin Düzeylerinin Ölçümleri	29
4. Histopatolojik Değerlendirme	33
5. Elektrofizyoloji ve Mekanik Kas Aktivasyon Ölçümleri	33
6. İstatistiksel Değerlendirme	35
BULGULAR	36
1. Genel Değerlendirme	36
2. Histopatolojik Bulgular	45
TARTIŞMA	49
SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	66
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	67
TABLolar DİZİNİ	68
EKLER	69

ÖZET

Amacımız bir deneysel hayvan modelinde intestinal iskemi reperfüzyon (IR) hasarının diyafram kası ve frenik sinir üzerine etkisini incelemek ve N-acetyl cysteine (NAC)'in olası hasara etkisini araştırmak. 40 adet Wistar yenidoğan sıçan kullanıldı: 1. Kontrol; 2. IR 1. sa; 3. IR 24. sa; 4. IR + NAC. IR için barsak mezosu ipek halkayla 1 sa sıkıştırıldı. NAC 150 mg/kg/gün periton içine verildi. Diyafram dokusunda malondialdehid (MDA), miyeloperoksidaz (MPO), interleükin-1 β (IL-1 β), tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α), elektrofizyoloji, mekanik kas aktivasyonu ve histopatoloji değerlendirildi. MPO 9.1 \pm 6.1'den 1. sa 21.5 \pm 7.6'ya yükseldi (p=0.01), sonra 24. sa 11.3 \pm 9.3'e geriledi. NAC verilenlerde 11.4 \pm 2.1 idi. MDA 17.3 \pm 6.7'den 1. sa 23.7 \pm 11.8'e yükseldi, sonra 24. sa 14.3 \pm 4.6'ya geriledi. NAC verilenlerde 24.3 \pm 9.3 idi. IL-1 β 92.4 \pm 63.9'dan 1. sa 295.5 \pm 275.6'ya (p=0.06) ve 24. sa 404.2 \pm 300.8'e (p=0.002) yükseldi. NAC verilenlerde 347.1 \pm 299.6 idi. TNF- α 108 \pm 78.3'den 1. sa 712.9 \pm 314.1 (p=0.004) ve 24. sa 626.1 \pm 114.5'e (p=0.0001) yükseldi. NAC verilenlerde 573.9 \pm 548.3 idi. Diyafram mekanik kas aktivasyonu 37.2 \pm 1.2'den 1. sa 11.3 \pm 2.0'ye (p=0.004) ve 24. sa 16.2 \pm 1.6'ya (p=0.02) geriledi; süre 340 \pm 7.3'den 1. sa 181.3 \pm 15.7'ye (p=0.0001) ve 24. sa 186.2 \pm 19.3'e (p=0.0001) yükseldi. NAC verilenlerde 42.1 \pm 6.4 ve 338.2 \pm 8.5 idi. Diyafram kası motor ünit aksiyon potansiyeli (MUAP) genlik 3.1 \pm 0.8'den 1. sa 4.0 \pm 0.8 ve 24. sa 3.6 \pm 1.2'ye yükseldi; süre 21.7 \pm 4.8'den 1. sa 22.1 \pm 3.9'a ve 24. sa 27.8 \pm 9.3'e (p=0.05) yükseldi; frekans 41.6 \pm 10.6'dan 1. sa 34.6 \pm 6.9'a ve 24. sa 36.7 \pm 8.4'e yükseldi. NAC verilenlerde 3.2 \pm 0.8, 19.9 \pm 5.9 ve 42.0 \pm 7.8 idi. Frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) genlik 6.5 \pm 1.5'den 1. sa 2.1 \pm 1.8'e (p=0.0001) ve 24. sa 3.0 \pm 0.9'a geriledi; süre 2.3 \pm 0.7'den 1. sa 2.9 \pm 0.5'e ve 24. sa 3.6 \pm 0.5'e (p=0.0001) yükseldi. NAC verilenlerde 7.6 \pm 2.3 ve 2.8 \pm 0.6 idi. Bu veriler aksonal dejenerasyon ve demiyelinizan frenik sinir nöropatisini göstermektedir. Histopatolojik incelemede aksonal ve miyelin kılıfında dejenerasyon bulunurken, NAC verilenlerde daha az hasar görüldü. Bu çalışma intestinal IR hasarının 1) diyaframda kasılma bozukluğuna neden olduğunu 2) bu etkinin primer olarak frenik sinir nöropatisine bağlı geliştiğini ve 3) NAC'ın bu hasarı önlediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon, diyafram, frenik sinir, nöropati

ABSTRACT

To study in an animal model the effect of intestinal ischemia reperfusion (IR) injury on the diaphragm muscle and phrenic nerve, and inquire whether N-acetyl cysteine (NAC) may counteract the possible detrimental effects. 40 Wistar newborn rats: 1. Control; 2. IR 1st hr; 3. IR 24th hr; 4. IR + NAC. To ensure IR, intestinal mesenteria was constricted 1 hr with a silk loop. NAC was given 150 mg/kg/day intraperitoneally. Malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), interleukine-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), mechanic activity, electrophysiology and histopathology of diaphragm tissue were examined. MPO increased from 9.1 ± 6.1 at 1st hr to 21.5 ± 7.6 ($p=0.01$), decreased at 24th hr to 11.3 ± 9.3 . In NAC, 11.4 ± 2.1 . MDA increased from 17.3 ± 6.7 at 1st hr to 23.7 ± 11.8 , decreased at 24th hr to 14.3 ± 4.6 . In NAC group, 24.3 ± 9.3 . IL-1 β increased from 92.4 ± 63.9 at 1st hr to 295.5 ± 275.6 ($p=0.06$) and at 24th hr to 404.2 ± 300.8 ($p=0.002$). In NAC, 347.1 ± 299.6 . TNF- α increased from 108 ± 78.3 at 1st hr to 712.9 ± 314.1 ($p=0.004$) and at 24th hr to 626.1 ± 114.5 ($p=0.0001$). In NAC, 573.9 ± 548.3 . Diaphragm mechanic activation force decreased from 37.2 ± 1.2 at 1st hr to 11.3 ± 2.0 ($p=0.004$) and at 24th hr to 16.2 ± 1.6 ($p=0.02$); duration increased from 340 ± 7.3 at 1st hr to 181.3 ± 15.7 ($p=0.0001$) and at 24th hr to 186.2 ± 19.3 ($p=0.0001$). In NAC group, 42.1 ± 6.4 and 338.2 ± 8.5 . Diaphragm motor unit action potential (MUAP) latency increased from 3.1 ± 0.8 at 1st hr to 4.0 ± 0.8 and at 24th hr to 3.6 ± 1.2 ; duration increased from 21.7 ± 4.8 at 1st hr to 22.1 ± 3.9 and at 24th hr to 27.8 ± 9.3 ($p=0.05$); amplitude decreased from 41.6 ± 10.6 at 1st hr to 34.6 ± 6.9 and at 24th hr to 36.7 ± 8.4 . In NAC group, 3.2 ± 0.8 , 19.9 ± 5.9 and 42.0 ± 7.8 . Phrenic nerve compound action potential (CMAP) latency decreased from 6.5 ± 1.5 at 1st hr to 2.1 ± 1.8 ($p=0.0001$) and at 24th hr to 3.0 ± 0.9 ; duration increased from 2.3 ± 0.7 at 1st hr to 2.9 ± 0.5 and 24th hr to 3.6 ± 0.5 ($p=0.0001$). In NAC group, 7.6 ± 2.3 and 2.8 ± 0.6 . All indicating axonal and demyelinating phrenic nerve neuropathy. Histopathology revealed axonal and myelin degeneration, yet less injury in NAC group. The study shows that intestinal IR injury 1) induce diaphragm dysfunction 2) that this effect is primary caused by phrenic nerve neuropathy and 3) that NAC prevents this injury.

Key Words: Ischemia reperfusion, diaphragm, phrenic nerve, neuropathy

GİRİŞ VE AMAÇ

Klinik gözlemlerimize göre yenidoğan döneminde midgut volvulus, doğumsal band anomalisi, internal herniyasyon ve nekrotizan enterokolit gibi yaygın barsak iskemisi ile seyreden bazı intestinal obstrüksiyon olgularında solunum sıkıntısı gelişmekte hatta mekanik solunum desteği gerekmektedir. Bu gelişimin hayati önem taşıması ve fizyopatolojisine ilişkin literatürde yeterli bilgi birikiminin bulunmaması bizi bu konuda çalışmaya teşvik etmiştir. Bu tip olguların temelinde bir iskemi reperfüzyon (IR) hasarı olduğundan kuramsal olarak kan akımının yeniden sağlanmasıyla açığa çıkan serbest radikallerin solunumun major kası olan diyaframı ve/veya frenik siniri etkileyerek solunum sıkıntısına neden olabileceğini düşündük.

Dokuların metabolik işlevlerini sürdürebilmek için oksijene gereksinimi vardır. Dokulara oksijen sunumu azaldığında, ATP üretimi azalır ve ATP depoları hızla tükenmeye başlar. ATP tüketimi hücre işlevinin bozulmasına ve hücrelerin nekrozuna neden olur. İntestinal iskemide ATP'nin yıkım ürünü olan hipoksantin dokularda birikmeye başlar. Ayrıca barsak mukozasında yoğun miktarda bulunan ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür. İntestinal reperfüzyonda ise dokulara oksijen sunumu artar ve ksantin oksidaz oksijeni hızla serbest radikallere dönüştürür. Serbest radikaller hücre içerisinde çok düşük miktarlarda bile yüksek derecede toksiktirler. Serbest radikaller hücrelerin DNA, enzim, reseptör ve zar yapısına zarar vererek iskemik dokulardaki hasarın artışına neden olurlar. Sindirim sisteminde meydana gelen IR hasarı barsaklar ile sınırlı kalmayıp nötrofillerin aktivasyonu interlökinler (IL) ve tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin salınması ile sistemik bir yanıtla dönüşür ve uzak organ hasarını oluşturur. Serbest radikallerin yarılanma ömürleri çok kısa olduğu için tespit etmek zordur. Bu nedenle çalışmamızda IR hasarının uzak organ etkisini göstermek için diyafram dokusunda malondialdehid (MDA), miyeloperoksidaz (MPO), IL-1 β ve TNF- α düzeylerini inceledik. MDA lipid peroksidasyonunu, MPO nötrofil aktivasyonunu, IL-1 β ve TNF- α sitokin yanıtını göstermektedir. Serbest radikaller, radikal yakalayıcı ve antioksidan mekanizmalar ile etkisizleştirilirler. N-acetyl

cysteine (NAC) bir glutatyon prekürsörü olup hücre içinde oksidan-antioksidan dengenin sağlanmasında önemli bir role sahiptir. NAC serbest radikal giderici özelliği ile de birçok çalışmada kullanılmaya başlanmış ve çeşitli dokularda IR hasarını önlediği gösterilmiştir ^{1,2}. Bu nedenle çalışmamızda IR hasarının diyafram kası ve frenik sinir üzerine etkisinin, antioksidan verildiğinde değişip-değişmediğini incelemek için NAC kullandık.

IR hasarının sadece iskemiye maruz kalmış dokuda sınırlı kalmayıp diğer uzak organların da sistemik dolaşıma katılmış serbest radikaller, sitokinler, nötrofiller, komplemanlar, prostoglandinler ve tromboksan gibi birtakım mediyatörlerden ve toksik ürünlerden etkilenmiş olduğunu birçok çalışma göstermiştir. IR uzak organ hasarından en fazla etkilenen organlardan biri akciğerlerdir. Akciğer hasarı hafif düzeyli disfonksiyondan akut respiratuvar distrese kadar değişmektedir ³. Literatürdeki çalışmalar solunum yetmezliğinin genellikle akciğer doku hasarına ve gaz değişiminin bozulmasına bağlı geliştiğini göstermektedir ^{4,5}. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar solunum yetmezliğinin solunum sisteminin motor kası olan diyafram kasındaki patolojilere bağlı olabileceğine dikkat çekmiştir ⁶. Çalışmalar IR hasarının diyafram kasının kasılma işlevinde bozulmaya neden olduğunu göstermekle beraber, bunun diyafram kasının kendisinden mi yoksa bu kasın motor ve duysal siniri olan frenik sinirden mi kaynaklandığı konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda hem diyaframın mekanik kas aktivasyonu hem de diyafram kasının iğne elektromiyografisi ve frenik sinir ileti hızı gibi elektrofizyolojik incelemeler yapıldı. Mekanik kas aktivasyonu diyafram kasının kasılma kuvvetini gösterir. Elektrofizyolojik çalışmalar özellikle nöropatik ve miyopatik hasarın ayrımını yapmak için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada hipotezimizi doğrulamak için bir deneysel intestinal IR modeli oluşturduk. Amacımız: 1) intestinal IR hasarının diyafram kası ve frenik sinir üzerine etkisini erken ve geç dönemde incelemek; ve 2) antioksidan özelliği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiş olan NAC'ın intestinal IR hasarının diyafram kası ve frenik sinir üzerine etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

1. İskemi ve Reperfüzyon

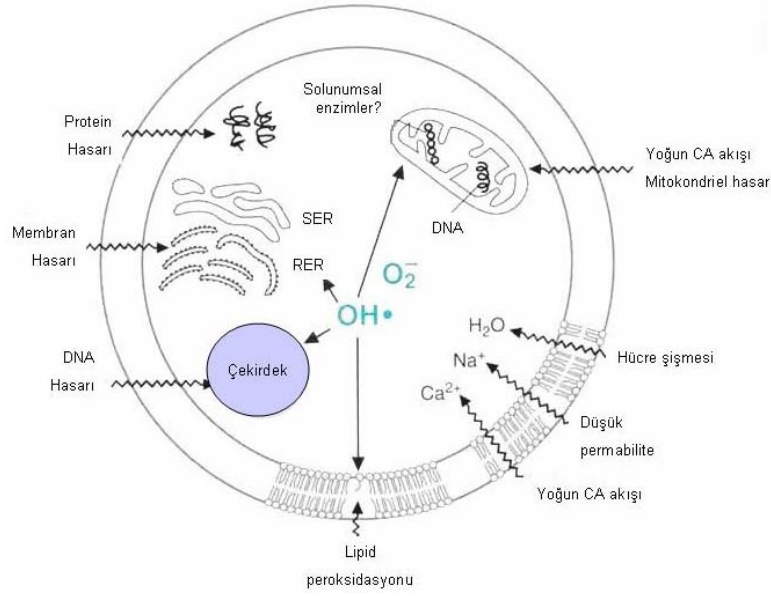
İskemi; dokulara giden kan akımının hücrenin temel fonksiyonlarını karşılamak için gerekli olan düzeyin altında olması durumudur. Oksijen hücresel fonksiyonların temel yakıtıdır. İskemi sonrası hücresel oksijenizasyon azlığı, oksidatif fosforilasyonun yapılamamasına ve hücrenin yaşamsal fonksiyonları için gerekli adenozin trifosfat (ATP) yetersizliğine neden olur. Aerobik metabolizma ile normal hücre fonksiyonu için gerekli yüksek enerjili fosfat bağları oksidatif fosforilasyon ile sağlanırken, iskemi süresince dokulara gerekli oksijen taşınmadığından bu süre boyunca oksidatif fosforilasyon yapılamaz ve ATP anaerobik metabolizma ile elde edilmeye çalışılır. Anaerobik metabolizma ile elde edilen enerji çok azdır ve dokularda laktik asitin birikimine yol açarak asidoza neden olur. Hücre enerji depolarının tükenmesi ve asidoz, normal enzim kinetiğini değiştirir ve hücre membranının her iki tarafındaki iyon gradientinin korunamamasına, iyonik homeostazın ve hücrenin metabolik fonksiyonlarının bozulmasına neden olur⁷.

Hücresel homeostazın bozulup hücresel nekroz ve hücre ölümünün gerçekleşmesi patolojik bir süreçtir. Bu süreç tek bir etyolojik faktöre bağlanmamakla birlikte değişik faktörler suçlanmaktadır. İskemik hasarın derecesini belirleyen faktörler iskeminin süresi, iskeminin genişliği ve dokunun iskemiye duyarlılığıdır. Farklı dokuların iskemiye duyarlılıkları farklıdır. Kas hücreleri iskemiye uzun süre dayanabildikleri halde sinir hücrelerinde geri dönüşümsüz hasarlar dakikalar içerisinde meydana gelebilir⁸.

İskemi sırasında oksijen yokluğuna bağlı olarak, mitokondriyel elektron transportu azalmakta ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi giderek düşmektedir. ATP sentezinin durmasına karşın ATP kullanımı sürmekte ve ATP hidrolizi sonucunda oluşan adenozin difosfat (ADP) konsantrasyonu artmaktadır. Yapılan bir çalışmada, iki saat süre ile kısmi iskemi uygulanmış intestinal dokuda, iskemi sonrası ATP konsantrasyonunun iskemi öncesi konsantrasyona göre %40 azaldığı ve hipoksantin miktarının da 7,6 kat arttığı bulunmuştur⁹. Blum ve ark. tam iskemi

uygulanmış intestinal dokuda, iskemiden yirmi dakika sonra ATP'nin tamamen tükendiğini ve iskemiden otuz dakika sonra da intestinal dokuda geri dönüşümsüz hasarların oluştuğunu yaptıkları çalışmada tespit etmişlerdir ¹⁰.

İskemi süresince enzimlerin kinetiği için gerekli olan enerji sağlanamadığından hücre membranındaki iyon kapılarının dengesi bozulur. Hücre içine sodyum (Na⁺) iyonu ve su girerken, potasyum (K⁺) iyonu intertisyuma çıkar. Hücre içinde artan kalsiyum (Ca⁺²) iyonu mitokondri membranının fonksiyonunu bozar. Mitokondrilerde şişme ve destrüksiyon meydana gelir. Ayrıca endoplazmik retikulumun veziküllenmesi, lizozomların şişerek patlaması, enzim ve proteinlerin kaybı, doymamış yağ asitleri ile reaksiyon sonucu lipid peroksidasyonu, selüler kompartmanların dağılması ve hücre zarının bütünlüğünün bozulması ile hücre ölümü gerçekleşir ^{7,11}. Reperfüzyon ise kanlanması bozulmuş dokulara yeniden kan akımının sağlanmasıdır. Böylelikle iskemik dokulara oksijen sunularak enerji akışı yeniden sağlanır ve ortamda biriken toksik maddeler uzaklaştırılır. İskemik dokulara yeniden kan akımının sağlanması dokunun yaşaması için gerekli iken iskemi sonrası ortaya çıkan süperoksit anyonlar, reperfüze edilen dokularda oksijen ile reaksiyona girerek, genel bir elektron alıcısı olan süperoksit radikallerini oluşturur. Serbest radikaller, hücrede protein karbonhidrat ve lipid yapısındaki DNA'da, enzimlerde ve membran yapısında yaptıkları değişikliklerle, demir bağımlı lipid peroksidasyonuna, nötrofil aktivasyonuna neden olurlar. Hücreye hızlı Ca⁺² akışı ile fosfolipaz A₂ aktivasyonu tetiklenir ve araşidonik asit metabolitleri artar. Mezenterik iskemi boyunca azalmış oksijen sunumu intestinal mukozada yüksek oranda bulunan ksantin dehidrogenazın kalsiyum aracılı proteolitik bir işlem ile ksantin oksidaza dönüşmesine neden olur. Ksantin oksidaz sistemi, lipid peroksidasyonu, aktive olan nötrofiller, dolaşıma katılan toksik ürünler lokal doku hasarını artırır veya sistemik hasarlara neden olabilirler. ^{7,11,12}. Reperfüzyon sonrası olan hasarın iskemiden daha fazla olduğu ilk kez 1986 yılında Parks ve ark.'nın yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada, dört saatlik intestinal iskeminin, üç saat iskemi ve bir saat reperfüzyon hasarından daha az olduğu, bunun nedeninin reperfüzyon sonrası gelişen serbest oksijen radikalleri olduğu ortaya konulmuştur ¹³.



Şekil 1. İskemi-reperfüzyon hasarı.

1.1 İskemi Reperfüzyon Hasarında Rol Oynayan Faktörler

IR hasarında, doğrudan ya da dolaylı yollardan katkıda bulunan birçok kimyasal olay ve madde sonuç olarak serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olarak hasara katkıda bulunurlar^{14,15}. Bu faktörler:

- Ksantin oksidaz yolu ile oluşan serbest oksijen radikalleri
- Nötrofillerin aktivasyonu ile oluşan serbest oksijen radikalleri
- Endotelial faktörler
 - Araşidonik asit metabolitleri
 - Prostaglandin (PGI₂)
 - Tromboksan A₂
 - Lökotrien B₄
 - Nitrik oksit (NO⁻)
 - Endotelin
- Platelet aktivite edici faktör (PAF)
- Komplemanlar
- Sitokinler
- Prostaglandinler
- Katekolamin oksidasyonu

Serbest Oksijen Radikalleri: Serbest radikal, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunduran bir atom veya moleküldür. Dış orbitalde iki ile bölünmeyen elektron varlığı, atom veya molekülü reaktif kılar. Serbest radikaller kısa ömürlü, kararsız ve ileri derecede reaktiftirler. Aerobik canlılarda temel serbest radikal kaynağının oksijen türevi radikaller olduğu kabul edilmektedir ¹⁶. Mitokondrinin, endoplazmik retikulumun ve nükleer membranın elektron transport olaylarında, oksidatif fosforilasyon sırasında normal hücre metabolizmalarında serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest oksijen radikalleri hücre içerisinde çok düşük miktarlarda bile yüksek derecede toksiktir ancak fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller, radikal yakalayıcı ve antioksidan mekanizmalar ile nötralize edilirler.

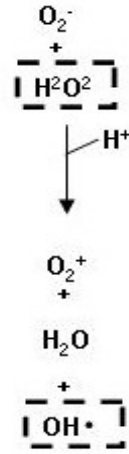
Süperoksit Radikalleri: Moleküler oksijene bir elektron eklenmesi ile oluşan ilk serbest radikaldir ve normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkar. Hiperoksi, enflamasyon ve iskemi-reperfüzyon gibi patolojik süreçlerde süperoksit üretimi artar. Reaktivitesi oldukça sınırlı olmasına rağmen daha ciddi hasarlara neden olan oksijen radikallerinin prekürsörü olduğu için önemlidir.

Hidrojen Peroksit: Gerçek bir serbest radikal olmamakla beraber, özellikle hidrofobik hücre membranlarından geçebilen, oldukça hareketli bir oksidan ajandır. Katalaz enzimi ile suya ve oksijene yığılır. Hidrojen peroksitin tamamı zayıf oksijen bağı ile bir araya gelmiş bağlardan oluştuğu için iskemi sırasında birikmiş olan süperoksit radikali ile kolaylıkla reaksiyona girip hidroksil radikallerine dönüşür. Hidroksil radikallerinin bir elektron vermesi ile hidroksil iyonu (OH^-) ve bir hidroksil radikali (OH^\cdot) oluşur. Reaksiyonlar için gerekli elektronlar, katalizör olarak bulunan indirgenmiş demirden sağlanır. Demir serbest radikal reaksiyonlarının birçoğunda yer alır ve güçlü bir prooksidandır.

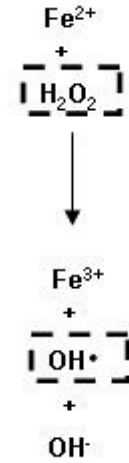
Hidroksil Radikali: Bilinen serbest radikallerin en güçlüsü olan bu hidroksil radikali son derece reaktif ve doku hasarından sorumlu ana radikal olarak kabul edilir. Serbest radikallerin yol açtığı hasarın büyük kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir.



Hidroksil radikalleri, Haber-Weiss reaksiyonu ve demirin katalize ettiği Fenton reaksiyonu olmak üzere iki ana yoldan oluşur.



Haber-Weiss reaksiyonu



Fenton reaksiyonu

Ksantin Oksidaz Reaksiyonu: Sağlıklı hücrelerde ksantin dehidrogenaz formunda bulunan enzim, iskemi ile birlikte hızla ksantin oksidaza dönüşür. Ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümü intestinal dokularda en hızlıdır ve intestinal sistemde en yüksek oranda bulunur. Ksantin oksidaz; iskemi-reperfüzyon hasarının oluşumunda anahtar olarak kabul edilmektedir. İskemik dokularda ATP üretiminin aerobik yollarla yapılamaması ve bu sürede ATP tüketiminin devam etmesi hücrede enerji açlığına neden olmaktadır. ATP'nin enerjiden zengin fosfat bağları sırası ile ADP-AMP-Adenozin'e çevrilir. Adenozin ise inozin ve hipoksantine parçalanır. Normal dokularda hipoksantin ürik aside çevrilirken, hipokside daha fazla metabolize edilemediğinden hücrede birikmeye başlar. Hipoksantin'in ksantin oksidaz ve oksijen ile reaksiyonu sonucu süperoksit

ve hidrojen peroksit meydana gelir¹⁷. İskemi süresince salınan demir, reperfüzyon aşamasında oksijen ile reaksiyona girerek hidrojen peroksidin son derece reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline dönüşmesini sağlayan Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarında katalizör olarak görev yapar. Ortaya çıkan hidroksil radikalleri çok reaktif ve kısa ömürlüdürler. Protein, polisakkarid, nükleik asit gibi birçok biyolojik madde ile reaksiyona girse de en temel özelliği hidrojen atomlarını poliansatüre yağ asitlerinden ayırmasıdır. Lipidlerin non-enzimatik yollarla parçalanmasına ve malondialdehidin (MDA) ortaya çıkmasına neden olur. MDA, iskemi-reperfüzyon çalışmalarında lipoperoksidatif stresi göstermek için kullanılan biyolojik üründür. Hücre membranının temel yapısını oluşturan yağ asitlerinin parçalanması hücre zar bütünlüğünün bozulmasına ve hücrede ödem ile karakterize hücre ölüm sürecini başlatır. Serbest radikaller ayrıca hasarlanmış dokulardaki nötrofil birikimini arttırarak enflamasyonu tetikler^{12,26}.

Nötrofil Aktivasyonu: İskemik bölgeye nötrofil göçünün arttığından anlaşılmasından sonra IR hasarının oluşumunun anlaşılmasında serbest radikallerin etkilerinin yanı sıra nötrofiller üzerine yapılan çalışmalar da artmıştır. Aktive olan nötrofiller:

- Nikotinamid difosfonükleotid (NADPH) oksidaz sisteminden solunumsal patlama sonrası salınan serbest radikallerin salınımı
- Proteolitik enzimlerin salınımı
- Lokal hücrelerden sitokinlerin salınımı ve bu sitokinlerin daha fazla nötrofili sahaya çekmesi
- Kapiller tıkaç oluşturup “no-flow” fenomeni ile iskemi-reperfüzyon hasarına katkıda bulunur.

Serbest oksijen radikallerinin dokularda artışı ve fosfalipaz A₂'nin uyarılması sonucu araşidonik asit ürünlerinden olan lökotrien B₄'ün, nötrofillerin kemotaksisinde ve adezyonunda belirgin artışa neden olduğu gösterilmiştir. İskemik dokuda aktive olan nötrofillerin vizkoziteleri artar ve nötrofiller şekil değiştirirler. Prekapiller sfinkterlerden geçemezler ve kapiller tıkaç oluştururlar. Bu tıkaçlar reperfüzyon aşamasında kan akımının tekrar gerçekleşmemesine neden olur. Bu olaya ‘no reflow’ fenomeni adı verilir. Aktive olmuş nötrofiller, iskemi-

reperfüzyon hasarına, postkapiller venüllerde birikip salgıladıkları proteolitik enzimler (kollajenaz, elastaz, katepsin G, jelatinaz) ile hücrenin yapısal matriks proteinlerinde yıkıma yol açarak endotel hücrelerinin devamlılığının bozulması ve vasküler endotel bütünlüğün hasarlanması yoluyla katkıda bulunurlar. Endotel bütünlüğünün bozulması ile ortaya çıkan sitotoksik mediyatörler, mikrovasküler geçirgenliği daha da arttırıp intertisyel alana sıvı birikimine ve dolayısı ile hemokonsantrasyonda artışa neden olmaktadır. Sonuç olarak gelişen hemokonsantrasyon da kapiller lümenin daha da daralarak perfüzyonun bozulmasına neden olmaktadır ^{18,19,20,21,22,23,24,25}.

Nötrofiller ayrıca içerdikleri NADPH oksidaz ve miyeloperoksidaz (MPO) enzim sistemleri ile iskemik dokularda oksijen radikal artışına neden olur. NADPH oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) enziminin katalizörlük yaptığı bir reaksiyonla moleküler oksijeni redükte edip süperoksit anyonunun oluşumuna neden olur. Oluşan süperoksit, süperoksit dismutaz ve MPO ile bir dizi reaksiyona girerek hidrojen peroksit, hidroksil radikali, hipoklorik asit ve N-kloramin gibi daha reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak doku hasarının ilerlemesine sebep olur. Dokuda nötrofil birikimi, dokunun miyeloperoksidaz aktivitesi ölçülerek indirekt olarak saptanabilmektedir. Miyeloperoksidaz enzimi dokuda polimorfonükleer lökositlere özgü bir enzimdir ve dokularda nötrofil düzeyinin tayininde kullanılır. Reperfüzyon hasarını göstermede kullanılan indirekt yöntemlerden biridir. Yapılan deneysel çalışmalarda IR yapılmış barsaklarda doku myeloperoksidaz düzeyinin 18 kat kadar arttığı saptanmıştır ²⁷.

Nillson ve ark. nötrofil adheziv glikoproteinleri olan CD11, CD18 glikoproteinlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar ile yaptıkları IR çalışmalarında, nötrofillerin mukozaya infiltrasyonu önlenmiş ve epitelyum geçirgenliği azaltılarak oluşmuş bulunan doku hasarında morfolojik ve biyokimyasal parametrelerde olumlu gelişmeler izlemişlerdir. Aktive nötrofillerin endotel hücrelerinin adhezyon molekülleri ile bağlanması sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ve proteolitik enzimler, lokal doku hasarını tetiklerken, sistemik dolaşıma geçen aktive nötrofiller akciğer, karaciğer, kalp gibi uzak organ doku hasarından sorumludurlar.

Araşidonik Asit Metabolitleri: İskemik süreçte hücre içine hızla kalsiyum akışının olması ya da endojen fosfolipazların inhibitörlerinin inaktivasyonu, fosfolipaz A₂'nin aktivasyonuna neden olup, oksijen radikallerinin de etkisi ile membran fosfolipidlerinden araşidonik asit metabolitlerini ortaya çıkarır. Bu ürünlerin çoğu iskemik dokuya toksiktir ve iskemi sonrası hücre membran geçirgenliğini artırır^{27,28}.

Serbest kalsiyumun iskemik süreçte hücre içindeki hızlı artışı, ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşmesinde ve fosfolipaz aktivasyonunda önemli bir basamaktır. Hidrolitik bir enzim olan fosfolipaz A₂ aktivitesinin artması prostoglandin ve lökotrien artışına ve dolayısı ile nötrofillerin bölgeye çekilip enflamasyonun daha fazla artışına neden olur. İskemi-reperfüzyon hasarını önlemek için kullanılan kalsiyum antagonistleri ile hücre içine kalsiyum akışı ve dolaylı olarak fosfolipaz A₂ aktivasyonu engellenmeye çalışılır. Araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi ile prostoglandin endoperoksit (PGH₂), PGH₂ lipooksijenaz enzimi ile lökotrienler oluşur. PGH₂'den prostosiklinler ve tromboksanlar oluşmaktadır. Araşidonik asit metabolitlerinin ilki olan prostoglandin I₂, fosfolipaz aktivasyonu ile endotelde, kaslarda, böbreklerde, mukozal epitelyum hücrelerinde ve lökositlerde üretilir. Tüm vasküler yataklarda vazodilatasyon yapar. Trombosit kümelenmesini ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonunu engeller ayrıca oluşmuş trombüslerin lizisine neden olur. Esas olarak trombositlerde endojen araşidonik asitten sentezlenen tromboksan A₂, trombosit kümelenmesini artırır ve vasküler yatakta vazokonstrüksiyona neden olur. Prostaglandin I₂ ile birlikte fizyolojik şartlarda korele salınan tromboksan düzeylerindeki değişiklikler nötrofillerin kemotaksisine ilerleyen mikrosirkülasyonun bozulmasına neden olur. Araşidonik asitten lipooksijenaz yolağı üzerinden oluşturulan lökotrien B₄, nötrofil yüzeyindeki reseptörlere bağlanıp CD18 gibi adezyon moleküllerini aktive ederek, nötrofil adezyonunu ve nötrofillerin kemotaktik etkilerini artırır. Serbest oksijen radikalleri, TNF- α , IL-1 β gibi sitokinlerin ve proteazların üretimini artırır. Yapılan çalışmalarda IR sonrası nötrofil göçünün ve hasarın lipooksijenaz inhibitörleri ile azaltılabileceğı gösterilmiştir.

Platelet Aktive Edici Faktör: Enflamatuvar kaskattan salınan mediyatörler arasında reperfüzyon hasarında önemli rolü olan mediyatörlerdendir^{29,30}. Endotel hücreleri vasıtasıyla membran fosfolipidlerinin fosfalipaz A₂ tarafından yıkılması sonucu meydana gelir. Ayrıca, nötrofiller, makrofajlar, monositler ve mast hücrelerinin de platelet aktive edici faktör (PAF) salgıladıkları gösterilmiştir. TNF- α salınımı arttırır, trombositlerin degranulasyonuna, aktivasyonuna ve kümelenmesine neden olur. Ayrıca, vasküler endotelin geçirgenliğini arttırıp, lökositlerin vasküler endotele yapışmasını ve diapedezini arttırır. Araşidonik asitten eikosanoidlerin salınımını arttırıp sistemik enflamatuvar yanıtın gelişmesine öncülük eder^{31,32}.

Nitrik Oksit : Temel olarak endotelial hücrelerdeki NO sentaz (NOS) enzimi ile kalsiyum bağımlı olarak L-arginin'den sentezlenir. Vazodilatatör etkisinin yanısıra, nötrofillerin aktivasyonunu, kemotaksisini, adezyonunu ve trombosit kümelenmesini azaltıcı etkisi vardır. Nitrik Oksit (NO)'nun üç izoformu tanımlanmıştır. Vasküler endotelden salınan endotelial NO sentaz (eNOS, tip 3 NOS), immünolojik uyarılar, bakteriyel toksinler, TNF- α ve interlökinler gibi sitokinlerce indüklenebilen damar düz kası, nötrofiller, monositler ve trombositlerce salınan indüklenebilir NO sentaz (iNOS, tip 2), sinir, akciğer, pankreas, mide, uterus gibi hücrelerde bulunan nöronal NO sentaz (nNOS, tip 1). Her üç formun aktivasyonu için kalsiyum ve kalmodulin eşleşmesi ve kosubstrat olarak moleküler oksijen ile nikotinamid difosfonükleotid (NADPH) gereklidir. NO, guanilat siklazı uyarıp trombositlerde ve damar düz kaslarında siklik GMP (cGMP)'nin artışına neden olur. Artmış cGMP düzeyleri de vasküler yatakta vazodilatasyona neden olurken, trombositlerin de adezyonunu ve kümelenmesini inhibe eder. Normal koşullarda bazal düzeylerde NO salınımı, damar cidarını, çeşitli uyarılara, vazokonstrüktör stimuluslara, nötrofil ve trombositlerin adezyonuna ve kümelenmesine karşı korur. IR gibi patolojik süreçlerde endotelden salınan NO inhibe olur, reperfüzyon sürecinde oluşan serbest radikaller ile birleşerek daha potent radikaller haline gelir.

Komplemanlar: Lokal doku hasarı sonrası plazma proteinlerinden kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda oluşurlar. Kompleman 3a (C3a) ve kompleman 5a (C5a) ile başlayıp, kompleman 6, 7, 8, 9 ile birleşerek oluşan

“membran atak kompleksi” tüm kapiller sistemde vazodilatasyon ve vasküler endotelde geçirgenlik artışına neden olur. Nötrofillerin kemotaksisini, degranülasyonunu ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu arttırırlar. İntestinal sistemde oluşturulan iskemi-reperfüzyonun akciğerde ödem oluşturmasında komplemanların rolünün gösterilmesi, komplemanların IR uzak organ hasarından da sorumlu olabileceğini göstermiştir.

Sitokinler: İskemi-reperfüzyon hasarının oluşumundan sitokinler ve adhezyon molekülleri de sorumlu tutulmaktadır. Bu karmaşık yapıların oluşumunda aktivitesi hidrojen peroksit ile indüklenebilen nükleer faktör kappa-B adı verilen transkripsiyon faktörünün rol aldığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda IR hasarının incelenmesinde daha çok TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10 üzerinde durulmuştur. TNF- α IR hasarından sonra erken dönemde salınan ve enflamasyonun hem lokal hem sistemik etkilerinden sorumlu olan mediyatördür. Nötrofillerin migrasyonunu ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu arttırır ^{33,34,35,36,37,38}. IL-1, TNF- α ile sinerjistik olarak salındığını gösteren çalışmalarda mevcuttur ^{68, 69,70}. Bununla birlikte, Souza ve arkadaşları anti IL-1 β antiserumu ve IL-1 β reseptör antagonisti kullanarak yaptıkları çalışmada IL-1 β 'nın güçlü bir IL-10 indükleyicisi olduğunu ve IL-10 üzerinden TNF- α artışını inhibe ettiğini göstermişlerdir ³⁵. IL-10, nötrofil akümüülasyonunu engelleyen, TNF- α ve IL-1 β salınımı üzerine inhibitör etki gösteren makrofaj ve lenfositlerden salınan anti-enflamatuvar bir mediyatördür. İntestinal IR hasarında, TNF- α ve IL-6 düzeylerini ve doku myeloperoksidaz aktivitesini düşürerek mukozal hasarı azalttığını gösteren yayınlar vardır ^{35,36,39,40}.

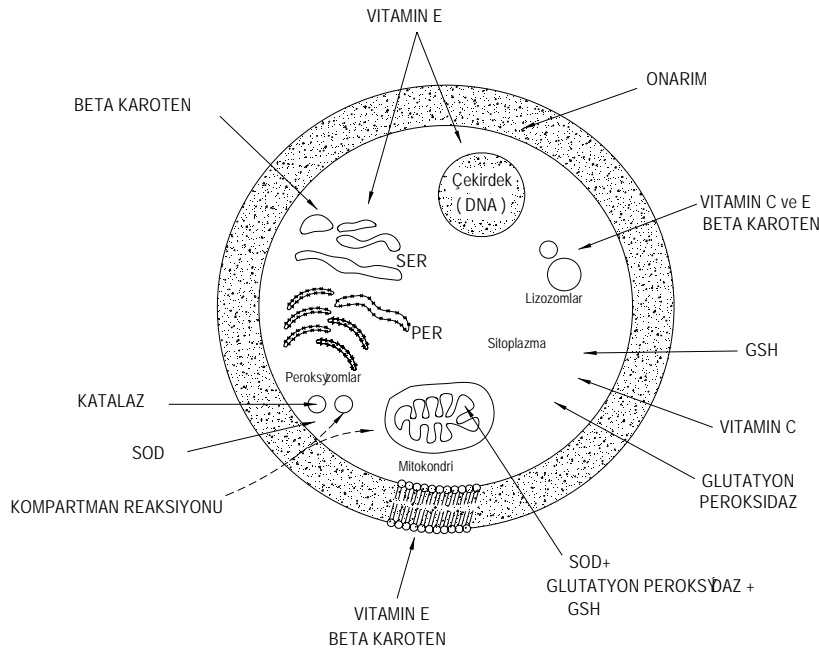
1.2 İskemi Reperfüzyon Hasarına Karşı Savunma Mekanizmaları

Serbest radikaller tüm biyolojik maddelerle özellikle proteinler, polisakkaridler, nükleik asitler ve çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerler. Özellikle hidroksil radikalleri hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak hücrenin yapısının bozulmasına sebep olurlar. Son ürünlerden olan MDA lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılır. Lipid radikallerin oluşması, zar lipid yapısında değişikliklere ve zar işlevinin bozulmasına neden olmaktadır. Hücre içi kalsiyumun artması ile başlayan ve radikallerin enzimler ve

diğer hücre elemanlarına etkisi ile oluşan sitotoksik ürünler hücreyi ölüme kadar götüren süreci başlatırlar. Hücrenin kendini korumak için geliştirdiği mekanizmalara antioksidan mekanizmalar adı verilir. Bunlar;

- Serbest radikallerin üretiminin inhibisyonu
- Nötrofillerin inhibisyonu
- Serbest radikallerin süpürülmesi
- Antioksidan enzimler
- İskemik ön koşullama
- Hipotermi

Vitamin E, vitamin C, beta karoten gibi vitaminler süperoksit, hidroksil ve lipid peroksit radikallerini tutma özelliğine sahiptirler. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler, allopürinol gibi metal bağlayan proteinler ve dimetil sülfoksit, desferroksamin gibi birçok ajan oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak, radikallerin yükseltgen olmalarını engellerler ya da DNA onarım mekanizmalarını artırarak antioksidan etki gösterirler.



Şekil 2 Antioksidan savunma mekanizmaları.

1.3 İskemi Reperfüzyonun Uzak Organ Hasarı:

Yapılan birçok çalışma IR hasarının sadece iskemiye maruz kalmış dokuda sınırlı kalmayıp diğer uzak organların da sistemik dolaşıma katılmış oksijen radikallerinden, sitokinlerden, kompleman proteinlerinden, prostoglandinlerden, tromboksan gibi birtakım mediyatörlerden ve toksik ürünlerden etkilenmiş olduğunu göstermiştir. Ekstremitelerde meydana gelen akut arteryel oklüzyon sonrası reperfüzyonun yeniden başlaması ile metabolik asidoz, hiperkalemi, myoglobinüri ve böbrek yetmezliğinin geliştiği bildirilmiştir ⁴¹. Ayrıca superior mezenterik arterin bir saatlik iskemi ve bir saatlik reperfüzyonu ile böbrek kan akımında, sodyum ve inülin klirensinde belirgin düşme kaydedilmiştir. Bu çalışmalar oluşan oksidatif etkinin antioksidan maddeler ile azaltılabileceğini göstermektedir ^{2,42}. IR uzak hasarından en fazla etkilenen organlardan biri de akciğerlerdir. Sekonder akciğer hasarı hafif düzeyli disfonksiyondan akut respiratuvar distrese kadar değişebilir. Hepatik IR sonrası akciğerlerdeki hasardan serbest oksijen radikallerinin, p-selektin regülasyonunun ve TNF- α 'nın sorumlu olduğu gösterilmiştir. Alt ekstremitede oluşturulan IR sonrası akciğer dokusunda belirgin nötrofil göçü ve kardiyak kökenli olmayan akciğer ödeminin geliştiği gösterilmiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada oluşturulan intestinal IR hasarında karaciğer kan akımında, safra üretiminde, ATP düzeylerinde belirgin düşme kaydetmişler ve intestinal iskemi ve reperfüzyonun karaciğer kanlanmasını ve fonksiyonlarını etkilediğini göstermişlerdir ⁴³.

2. N-Acetyl Cysteine:

İlk kez 1963 yılında Sheffner tarafından mukolitik tedavi amacı ile sistein derivelerinin klinikte kullanılmaya başlanması ile birlikte bir glutatyon prekürsörü olarak bilinen N-acetyl cysteine (NAC) serbest oksijen radikal giderici özelliği ile de birçok çalışmada kullanılmaya başlanmıştır ^{44,45}. NAC doğal ve antioksidan özelliği olan birkaç aminoasitten biri olan L-sistein'in sodyum tuzu olan N-asetillenmiş türevidir. NAC karaciğerde metabolize olur ve yarılanma ömrü 2-6 saattir. %20-30'u idrarla değişmeden atılır. NAC ihtiva ettiği protein bağlayan labil disülfid bağları sayesinde mukoproteinlerdeki sülfid-disülfid bağlarının yer değiştirip daha küçük parçalara ayrılmasını kolaylaştırır. Mukopürülan materyal lizise uğrayarak daha az visköz hale gelir ve klinikte de kullanılan mukokinetik etkisi ortaya çıkar.

Ayrıca, hücre içerisindeki sülfidril bağlarının korunmasını ve transportunu kolaylaştırır. Böylece glutatyon redüktaz aktivitesi artırılarak bir antioksidan olan glutatyon sentezi artırılır. Koroner IR öncesi başlatılmış NAC ve sistein tedavisinin hidroksil gruplarını giderici ve intrasellüler glutatyon düzeylerini artırıcı etkileri sayesinde reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir.

NAC koruyucu etkisini hidrojen peroksit ile reaksiyona girip hücre içindeki düzeylerini azaltarak, hidrojen peroksinin toksik radikalleri olan hidroksil radikallerinin ve hipoklorik asitin oluşmasını azaltarak gösterir. Karaciğerde sisteinden glutatyon oluşumunu destekleyip sistemik glutatyon düzeyini artırır. Parasetamole bağlı hepatotoksitide NAC birçok dokuda olduğu gibi deasetile olarak glutatyon prekürsörü olan sisteine dönüşerek koruyucu rol oynar⁴⁷. NAC'ın in vitro yapılan çalışmalarda endotel hücrelerde vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir⁴⁸. NAC'ın ayrıca diyafram kası hasarında çalışılmış ve yüksek inspiratuvar basınçta soluyan sağlıklı insanlarda diyafram güçsüzlüklerini giderebildiği gösterilmiştir⁴⁹. İntestinal sistemde IR oluşturulan sıçanlarda somatostatinin akciğerlerde MDA ve MPO artışını önlediği ancak karaciğerde glutatyon, ATP azalması ve MPO artışını önleyemediği gösterilmiştir⁴⁹. Yapılan çalışmada septik şokta NAC kullanılan grupta, kontrol grubuna göre IL-8 ve TNF reseptörlerinde azalma olur iken TNF, IL-6 ve IL-10 düzeylerinde herhangi bir azalma saptanmamıştır. İlacın ARDS'li hastalarda nötrofillerden kaynaklanan oksidan üretimini değiştirmedeği ancak intrasellüler glutatyon düzeylerini artırarak oksidan ajanları nötralize ettiği gösterilmiştir. Yapılan klinik ve farmakokinetik çalışmalar NAC'ın etkisinin doz, veriliş zamanı ve uygulama şeklinin önemli olduğunu göstermiştir⁵⁰. Sıçanlarda yapılan çalışmada NAC'ın redoks sensitif transkripsiyon faktörlerinden NF-kB'yi doza bağımlı olarak etkilediği ve ilginç olarak yüksek dozlarda prooksidan etki göstererek lipopolisakkarit toksisitesini arttırdığı gösterilmiştir. NAC'ın ilaç oksidasyonu süresince H₂O₂ çöçülüğü ve H₂O₂ üretimi üzerine bifazik etkisinin olduğunu göstermiştir. Bu etkiyi de NAC'ın yüksek konsantrasyonda demiri katalitik olarak aktif forma redüksiyonuna ve NAC'ın thiol ve glutatyon serbest radikalleri gibi ara metabolitlere dönüşmesine bağlamışlar. Yüksek doz NAC'ın glutatyon havuzlarını azaltıp okside glutatyon miktarını arttırdığı gösterilmiştir

47,51,52

3. Diyafram Kası ve Frenik Sinir Anatomisi

a. Diyafram Kası: Göğüs boşluğu ile karın boşluğunu birbirinden ayıran kubbe biçimli, kas ve fibröz zarlardan oluşmuş bir septumdur. Göğüs boşluğuna doğru konvektir. Diyafram genel olarak toraks alt açıklığının kenarlarına tutunur. Kas lifleri başlangıçlarına göre üç grup oluşturur:

- Sternal parça: İki demet halinde sternum ksifoid çıkıntısının arka yan yüzlerinden başlar.
- Kostal parça: En alttaki altı kotun iç yüzleri ve kırkıdaklarından başlar
- Lomber parça: Arkus lumbocostalis lateralis ve medialislerden sağ ve sol iki krus halinde başlarlar.
 - Arcus lumbocostalis lateralis: M. quadratus lumborum fasyasının, kasın üst kısmında kalınlaşmasıyla oluşmuştur. Birinci lomber vertebra transvers çıkıntısı ile arasında uzanır.
 - Arcus lumbocostalis medialis: M. psoas major fasyasının, kasın üst bölümünde kalınlaşmasıyla oluşmuştur. İkinci lomber vertebra cismi ile birinci lomber vertebranın transvers çıkıntısı arasında uzanır.

Bu iki arkusdan başlayan diyafram liflerine 'crus' adı verilir. Crus dextrem (sağ krus) soldan daha geniştir. 1., 2., 3. lomber vertebraların cisimleri ile sağ arkuslardan başlar. Sağ krusun en iç lifleri özefagusun geçtiği deliğin sol tarafını da sararlar. Crus sinistrum (sol krus) ise birinci, ikinci lomber vertebraların cisimleri ve sol arkuslardan başlar. Her iki krusun tendonumsu en iç kenarları orta hatta aortanın ön yüzünde birleşerek "ligamentum arcuatum mediana"yı oluştururlar. Kruslardan lifler yükseldikçe birbirlerinden ayrılıp, yelpaze gibi yayılırlar. Gerek kruslar, gerekse kotal ve sternal parçaların liflerinin hepsi kubbenin ortasına doğru giderler ve ortada centrum tendineum'a yapışırlar. Centrum tendineum sağlam fibröz yapıdadır. Orta hattından başlayan bazı kalınlaşmış fibröz lifler ortada gözle görülür bir çapraz yaparlar. Buna "St. Andrew Çaprazı" denir. Çaprazın sağ kolları arasında vena cava inferior'un geçtiği delik bulunur.

Diyaframda üç büyük ve birkaç küçük delik bulunur.

Hiatus vena cava inferior: En üsttedir. Sentral tendonun sağ yarısında yer alan en büyük deliktir. İçinden vena cava inferior, sağ frenik sinirin bazı dalları ve lenf kanalları geçer. Bu deliğin hemen biraz sağından sağ frenik sinir, sentral tendonu delerek alt yüze çıkar.

- Hiatus oesophageus: Vena cava deliğinin biraz alt ve solundadır. Sağ krusun en iç lifleriyle sarılmıştır. İçinden özefagus, vagus sinirleri ve sol gastrik damarların özefagus dalları geçer.
- Hiatus aorticus: Lig. arcuatum mediana ile omurga ön yüzü arasındadır. En alttaki deliktir. İçinden aorta ve ductus thoracicus geçer.

Hiatus vena cava inferior sekizinci torakal, hiatus oesophageus onuncu torakal ve hiatus aorticus onikinci torakal vertebraların seviyesindedir.

Diyaframın torakal yüzeyine aa. phrenica inferiores dağılırlar. Bunlar aorta dallarıdır. Ayrıca muskulofrenik ve perikardiyofrenik arterler diyaframı beslerler. Venleri aynı ismi alan yandaş venlerdir. Diyafram servikal pleksusun bir dalı olan 'nervus phrenicus' tarafından innerve edilir. Frenik sinir diyaframı çalıştıran tek motor sinirdir. Diyaframın duyuları frenik sinir ve torakoabdominal sinirler tarafından taşınır. Diyafram istemli olarak çalışan bir kastır. Ancak bu istemlilik belirli bir dereceye kadardır hiç kimse boğulma noktasını aşınca kadar soluğunu tutamaz.

b. Frenik Sinir: Pleksus servikalisin dalıdır. Servikal 3.-4.-5. sinirlerin ventral ramuslarının birleşmesiyle oluşur. Bu ramuslar m. scalenius anterior'u arkadan öne doğru dolanarak birleşip siniri oluştururlar. Frenik sinir boyunda m. scalenius anterior'un ön yüzüne dayalı olarak birinci kosta iç kenarına kadar iner. Burada içe döner a. subclavia ile brachiocephalicus arasından a. thoracica internayı önden çaprazlayıp mediastinumda girer. Sağ frenik sinir: Sağ a. subclavia ile v. brachiocephalica arasından geçer. Sırası ile sağ v. brachiocephalica, v. cava superior ve perikardiumun sağ kenarlarını çaprazlar. Bu oluşumlarla sağ mediastinal plevra arasında aşağı iner. Sol frenik: Sol a. subclavia ile v. brachiocephalica arasından geçer. Arcus aortanın sol yüzü ile perikardium sol kenarını çaprazlayarak iner. Bu oluşumlarla sol mediastinal plevra arasında seyreder. A. pericardiophrenica mediastinumda frenik sinirlerle yandaş

seyreder. Her iki sinir diyaframa ulaşınca ışınsal tarzda dallanarak kasın her iki yüzüne dağılır. Frenik sinir diyafram ve inspirasyonun motor siniridir. Frenik sinirde iki tip duyu lifi vardır: Proprioseptif lifler, diyaframın derin duyusunu taşırlar.

Genel duyu lifleri (ağrı), klinik yönden önemlidirler. Paryetal plevra, fibröz perikard ve karaciğerin üst yüzünü örten paryetal periton olmak üzere her üç seröz zardan da duyu taşırlar. Buralardan kalkan duyuların hepsi C4 segmenti tarafından innerve edilen deri alanlarına aksederler. Bu alan boynun alt kısımları ve omuzların üst kısımlarıdır. Frenik sinirin kesilmesi, o taraf diyafram yarısının felciyle sonuçlanır. Diyaframın iki yarısı ayrı ayrı innerve edilir. O bakımdan bir taraf frenik sinir kesisinde diğerk taraf çalışır. Ancak normalde iki taraf senkronize çalışır. Felçli yarı, inspirasyonda, karın içi basıncın artması nedeniyle, ineceğı yerde yükselir. Ekspirasyonda ters hareketi yapar. Felçli yarının hareketi sağlam tarafa göre tam terstir. İki taraflı felçte dispne ortaya çıkar⁵³.

4. Kas Kasılma Mekanığı

Vücudun tüm hücrelerinde membranın iki tarafı arasında bir elektriksel potansiyel bulunur. Ayrıca sinir ve kas gibi özelleşmiş hücreler membranlarında elektrokimyasal impulslar yaratarak uyarılabilir halde bulunurlar. Sinir sinyalleri membran potansiyellerindeki hızlı değışimlerden oluşan aksiyon potansiyelleri ile iletilirler. Nöronlar, sinir sisteminin hem işlevsel hem yapısal birimleridir. Tipik bir nöron hücre gövdesi (soma), akson ve dendritlerden oluşur. Nöron içerisinde mitokondri gibi bilinen organellerin yanı sıra nörotübül ve nörofibriller bulunur. Somanın akson boyunca uzanan zar kısmına aksolemma adı verilir. Merkezi sinir sisteminde aksonlar oligodendrositler adı verilen hücreler tarafından sarmalanmışlardır. Periferik aksonların çevresinde ise schwann hücreleri bulunur. Bazı nöronlarda schwann hücreleri aksonu halkalar halinde miyelin kılıf oluşturacak şekilde sarar. Bu kılıf iyon akımları için yalıtkan bir görev yaparak iletilerin daha hızlı olmasını sağlar. Bir nöronun aksonu ya da kollaterallerinden başka nöronun aksonuna, dendritine, somasına ya da kas veya salgı hücresine uyarının iletiildiğı bölgeye sinaps adı verilir. Memeli hücrelerinde sinapta gerçek anlamda bir temas yoktur. Sinyalin iletilebilmesi için presinaptik membrana ulaşan elektriksel impulsun kimyasal bir transduseri, nörotransmitteri sinaptik aralığa serbestlemesi gerekir. Transmitterler presinaptik veziküllerden egzozitozla sinaptik

aralığa boşalır ve postsinaptik membrana difüze olarak yeni bir elektrik sinyali oluştururlar. Kas kasılması için sırasıyla, motor sinir hücresinde oluşan aksiyon potansiyeli kas lifindeki sonlanmasına kadar yayıldıktan sonra presinaptik veziküllerden salınan asetilkolin kas lifinde asetilkolin kapılı kanalları açarak, kas lifi membranından çok miktarda sodyum iyonunun içeri girmesine neden olarak aksiyon potansiyelini başlatır. Oluşan aksiyon potansiyeli kas lifi membranı boyunca yayılır. Kas lifi membranı depolarize olur ve aksiyon potansiyeli kas lifi içine doğru yayılarak, sarkoplazmik retikulumda depolanmış olan kalsiyum iyonlarının serbestlenmesine neden olur. Hücre içinde artan kalsiyum kasılmanın esası olan filamentlerin kaymasını sağlayan aktin ve miyozin filamentleri arasında çekici gücü başlatır. Ardından kalsiyum iyonları hızla sarkoplazmik retikuluma pompalanarak yeni aksiyon potansiyeli oluşuncaya kadar burada depolanırlar.

5. Solunum Mekanikliği

Havadaki oksijenin solunum hareketleri ile akciğer alveolleri içine alınmasına ventilasyon adı verilir. Oksijen daha sonra alveollerden kana diffüze olur ve buradan dokulara ve hücre içine taşınır. Ventilasyonu sağlayan güç, atmosfer havasıyla alveoller içindeki intrapulmoner basınç arasındaki basınç farkıdır. İspirasyon sırasında pulmoner basıncın atmosferik basıncın altında düşmesi gereklidir. Ekspirasyon esnasında ise pulmoner basıncın atmosferik basınçtan yüksek olması gerekir. Bu basınç farkları göğüs kafesi ve diyaframın hareketleriyle inspirasyon sırasında akciğer hacminin artması, ekspirasyon esnasında azalmasıyla sağlanır. Akciğerler, göğüs boşluğunu dikine uzatan veya kısaltan diyaframın yukarı ve aşağı hareketi ve göğüs boşluğunun ön-arka çapını arttıran ve azaltan kaburgaların yukarı ve aşağı hareketi ile olmak üzere iki yolla genişleyebilir ve büzülebilirler. Memelilerde sakin solunumun %75'i diyafram tarafından gerçekleştirilirken, interkostal, abdominal, sternokleidomastoideus ve diğer boyun kasları kalan %25'lik kısımdan sorumludurlar^{54, 55}. İspirasyon sırasında diyaframın kasılması akciğerleri aşağı doğru çeker. Ekspirasyonda ise diyafram gevşer; akciğerlerin göğüs çeperinin ve karın dokularının elastik büzülme yeteneği akciğerleri sıkıştırır. Ancak, şiddetli solunum sırasında elastik kuvvetler yeterli olmayacağından, fazladan güç esas olarak kaburgaların kasılmasıyla karın organlarının diyaframı alttan yukarı doğru itmesi ile gerçekleşir.

6. Elektromiyografi ve Sinir İleti Hızı Çalışmaları

Dinlenme ve kasılma durumlarında kaslarda meydana gelen elektriksel aktiviteye elektromiyogram, bunu kaydeden sisteme elektromiyograf ve bu işleme de elektromiyografi (EMG) denir. EMG, kas kasılması sağlayan aktivitenin izlendiği ve yorumlandığı bir inceleme yöntemidir. Periferik sinir potansiyellerinin incelenmesine de Elektronörografi (ENG) denir. EMG'de incelenen motor ünitedir (MU). Medulla spinalis ön boynuz motor hücrelerinden çıkan aksonların motor sinirler içinde kasa ulaşarak inerve ettiği kas liflerine motor ünite (MU) (motor nöron, periferik uzantıları, inerve ettiği kas lifleri) denir. Bir kasta birçok motor ünite, bir motor ünite de birçok kas lifi vardır. Rutinde kullanılan iğne elektrod EMG'sinde motor ünite oluşmuş Motor Ünite Aksiyon Potansiyelleri (MUAP) adı verilen elektriksel aktivite ölçülür ve değerlendirilir. Kasların kasılması sinirler aracılığıyla beyinden iletilmiş olan uyarıcı potansiyellerin kaslarda oluşturduğu Motor Ünite Aksiyon Potansiyelleri (MUAP) olarak bilinen elektriksel potansiyeller sayesinde olur. Kasılmanın miktarı MUAP'ların sayısının ve sıklığının artması ile artar. Kasların kasılı olmadığı veya kasılı olduğu durumlarda MUAP'ların incelenmesi, şeklinin veya sıklığının normal sınırlar içerisinde olup olmaması veya normalde karşılaşılmayan elektriksel aktivitelere rastlanması kas veya sinirlerdeki patolojileri belirlemek için kullanılır. MUAP süresi kaslarda değişiklik olmakla birlikte 10 ms'yi geçmez. Sıklıkla bifazik veya trifaziktir, %12 oranında polifazik potansiyellere rastlanabilir. Genelde 5 mV'dan büyük amplitüdlere normal kabul edilmez (100 mV-2 mV). Normal kasta inceleme kas istirahat durumunda iken, iğnenin kasa girişi ile oluşan 'inersiyon aktivitesi' (IA) adı verilen mekanik etkiden, fibrilasyon, pozitif denervasyon, fasikülasyon olup olmadığı, yarı kası durumunda (MUAP nitelikleri) ve tam kası durumunda (MUAP kaybı, interferans örneği) iken yapılır. Normal çizgili kasın istihattan, yavaş yavaş aktif hale getirilmesi ve maksimal kasılmaya geçmesi esnasında daha çok MU'ın aktive olmasına "interferans" denir. Primer kas lifi lezyonlarına bağlı hastalıklardaki değişikliklere miyojenik, kasın dışındaki lezyonlara (ön boynuz, periferik uzantı) bağlı değişikliklere de nörojenik değişiklikler denir. Normal kas istirahat halinde spontan aktivite pek göstermez. Hafif veya yarı kası halinde MUAP çıkar (normal süre 2-15

msn). Periferik sinirlerin belirli noktalarının uyarımı, inerve ettiği kaslardan uyandırılmış potansiyellerin alınmasıyla mümkün olur ve motor ileti hızı ölçülebilir.

Sinir duyuşal liflerinin uyarılması ve belirli noktalardan sinir aksiyon potansiyelleri tesbit edilmesiyle duyuşal ileti hızını da ölçmek mümkündür. İleti sinir lifi miyelin kılıfının devamlılığı ile ilgilidir. Miyelin harabiyetiyle seyreden periferik sinir lezyonlarında ileti hızı azalır veya alınmaz. Aksonal dejenerasyon yapan hastalıklarda iletim hızı normal sınırlarda kalır. Her iki halde de motor ve duyuşal amplitüdü düşüktür. Normal motor iletim hızı üst ekstremitelerde 50-60 m/sn, alt ekstremitelerde 40-50 m/sn dir. Proksimal sinir ileti hızı da distale göre fazladır. Duyuşal ileti hızı motor iletim hızından biraz fazladır (%10–15), uyarılmış cevap amplitüdü düşüktür. EMG kas, periferik sinir, medulla spinalis ön boynuz, kas-sinir kavşığı hastalıklarında büyük ölçüde tanıda yardımcıdır. Kesin tanı için bunların çoğunda biyopsi gerektiği gibi klinikle bağdaşabilen EMG bulgularının tama yakın tanı koydurucu özelliği vardır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için ağırlıkları 15-20 gr arasında değişen 40 adet Wistar albino tipi 7 günlük sıçan kullanıldı. Deney protokolü Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nda onaylandı. Yenidoğan sıçanlar çalışma süresince Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında 24°C oda ısısında annelerinin yanında tutuldu ve anne sütü ile beslendiler.

1. İskemi Reperfüzyon Modeli

Anestezi sevofluran (Sevorane® likid, Abbott, İstanbul) inhalasyonu ile sağlandı. Deney sırasında yenidoğan sıçanların vücut ısılarını korumak için işlemler ısı kaybını önleyecek bir pad üzerinde yapıldı. Sıçanlar tespit tahtasına sırt üstü tespit edildi. %10 povidone-iodine ile boyama ve örtülemeyi takiben 2-cm'lik median kesiyle batına girildi. İnce barsaklar ve kolon batın dışına alındı ve mezenter kökü ortaya kondu. İskemi oluşturmak için 8 Fr beslenme sondası 4-cm kesildi ve içinden 2-0 ipek, halka oluşturacak şekilde hazırlandı. İpek halka barsak mezenterinden geçirildi ve klemp yardımıyla sıkıştırıldı. Bu işlemden sonra barsakların renk değiştirdiği ve kanlanmalarının bozulduğu görüldü. Barsaklar tekrar batın içine atıldı. Bir saatlik iskemiden sonra batın tekrar açıldı ve ipek halka çözülerek barsakların kanlanması sağlandı. Batın anatomik planda 5-0 ipekle devamlı ve 2 kat kapatıldı. Sıçanlar annelerinin yanına verildiler. Sıçanlara tekrar sevofluran anestezi uygulandı. 1. veya 24. saat ölçümleri için batın yeniden açıldı. Barsaklar batın dışına alındı ve diyafram ortaya kondu. Önce diyafram kası ve frenik sinir elektrofizyolojisi yapıldı sonra mekanik kas aktivasyonu değerlendirildi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirme için diyaframdan doku örnekleri alındı.

2. Deney Grupları

1. **Kontrol grubu (n=10):** Sevofluran anestezisini takiben standard laparotomi yapıldı.

2. **İskemi reperfüzyon grubu 1. saat (n=10):** Sevofluran anestezisini takiben standard laparotomi yapıldı. İpek halka tekniği ile IR yapıldı. Değerlendirmeler 1. saatte yapıldı.

3. **İskemi reperfüzyon grubu 24. saat (n=10):** Sevofluran anestezisini takiben standard laparotomi yapıldı. İpek halka tekniği ile IR yapıldı. Değerlendirmeler 24. saatte yapıldı.

4. **İskemi reperfüzyon + N-acetyl cysteine grubu (n=10):** Sevofluran anestezisini takiben standard laparotomi yapıldı. İpek halka tekniği ile IR yapıldı. Antioksidan tedavi için NAC 150 mg/kg/gün, 12 saat arayla periton içine verildi. Değerlendirmeler 24. saatte yapıldı.

3. Oksidatif Stres Belirteçleri ve Sitokin Düzeylerinin Ölçümleri

Diyafram doku örnekleri alındıktan sonra çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı. Çalışma için doku örnekleri çözöldü ve tartıldı. Dokular, 0,5-ml, 10-mM PBS (pH. 7) tamponunda 60 saniye süreyle homojenize edildi. Homojenat 20.000 rpm devirde 15 dakika ve +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant çalışma için alındı.

Doku Myeloperoksidaz Ölçümü

Nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınan mieloperoksidaz enzimi dokulardaki nötrofil aktivasyonunun dolaylı göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bunun için elde edilen dokular homojenize edildi. MPO ölçümü hidrojen peroksitin homojenat tarafından oksitlenerek o-dianosidini redüklemesi ve redükte o-dianosidin 410 nm.'de ölçülmesi prensibine dayanılarak yapıldı. Sonuçlar spesifik aktivite, ünite/gr doku olarak hesaplandı⁵⁶.

Doku Malondialdehid Ölçümü

Doku lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kullanılan MDA düzeyleri, "MDA chromosystems diagnostics kit; lot. no: 67003" kullanılarak yüksek

performans sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ile ölçüldü. Hazırlanma aşamasında, 100µ süpernatant üzerine 500µ presipitasyon reaktifi eklendi. 13000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. 500µ supernatant alınarak 100µ derivatizasyon reaktifi eklendi. 95°C'de 1 saat enkübe edildi. Nötralizasyon tamponu eklendikten sonra örnek kromatografik ayırım için cihaza verildi. Sonuçlar µmol/gr doku olarak hesaplandı.

Doku TNF-α Ölçümü

Dokuda TNF-α düzeyleri "Biosource Rat TNF-α kit; lot. no: KRC3011" ile solid faz sandöviç Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. Tabak içindeki kuyucuklar TNF-α için spesifik antikolar ile kaplandı. Standardlar, kontroller ve örnekler kuyucuklara eklendikten sonra üzerlerine biotinlenmiş ikinci bir antikor eklendi. Birinci inkübasyon sırasında TNF-α antijenleri, immobilize antikolarla ve biyotinlenmiş antikolarla bağlandı. Fazla antikoların yıkama ile uzaklaştırılmalarından sonra streptavidin-peroksidaz enzimi eklendi. İkinci inkübasyon ve yıkama sonrasında bağlanmayan enzimler ortamdan uzaklaştırıldı. Üzerlerine enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solusyonu eklendi. Sonuçlar standartlardan oluşturulan konsantrasyon-absorbans eğrisinden pg/ml olarak bulunduktan sonra pg/gr doku olarak hesaplandı.

Doku IL-1β Ölçümü

Dokuda IL-1β düzeyleri "Biosource Rat TNF-α kit; lot no: KRC0011" ile solid faz sandöviç Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. Tabak içindeki kuyucuklar IL-1β için spesifik antikolar ile kaplandı. Standardlar, kontroller ve örnekler kuyucuklara eklendikten sonra üzerlerine biotinlenmiş ikinci bir antikor eklenmiştir. Birinci inkübasyon sırasında IL-1β antijenleri, immobilize antikolarla ve biyotinlenmiş antikolarla bağlanmıştır. Ortamdaki fazla antikoların yıkama ile uzaklaştırılmalarından sonra streptavidin-peroksidaz enzimi eklenmiştir. İkinci inkübasyon ve yıkama sonrasında bağlanmayan enzim ortamdan uzaklaştırılmıştır. Üzerlerine enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solusyonu eklendi. Oluşan rengin absorbansı örnekte bulunan IL-1β konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Sonuçlar standartlardan oluşturulan konsantrasyon-absorbans eğrisinden pg/ml olarak bulunduktan sonra pg/gr doku olarak hesaplandı.



Resim 1. Hayvan laboratuvarı.



Resim 2. Yenidoğan rat.



Resim 3. Yeni doğan sıçanda normal barsak morfolojisi ve iskemi reperfüzyon modelinde ipek halka tekniği.



Resim 4. İskeminin geç dönemi (barsak kanlanması bozulduğu görülüyor).

4. Histopatolojik Değerlendirme

Elektron Mikroskopisi

Diyafraam kası %2,5'luk gluteraldehit ile fiksasyonu, %1'lik OsO₄ ile post fiksasyonu yapıldı. Dehidrasyon işlemi yükselen derecelerde alkol kullanılarak gerçekleştirildi. Propilen oksitle şeffaflandırma ve resine alıştırma aşamalarından sonra, dokular resine (Araldite, EMS) gömüldü. 24 saatlik polimerizasyon işleminden sonra, bloklardan Leica Ultracut UCT-125 ile öncelikle 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler, sonra da 50-70 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi ve hangi alandan ince kesit alınacağı belirlendi. İnce kesitler ise uranil asetat-kurşun sitrat ile kontrastlandılar. Kesitler JEOL-JEM 1011 elektron mikroskopunda incelendiler. Mikroskoba eklenmiş dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

5. Elektrofizyolojik ve Mekanik Kas Aktivasyon Ölçümleri

Frenik Sinir Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli

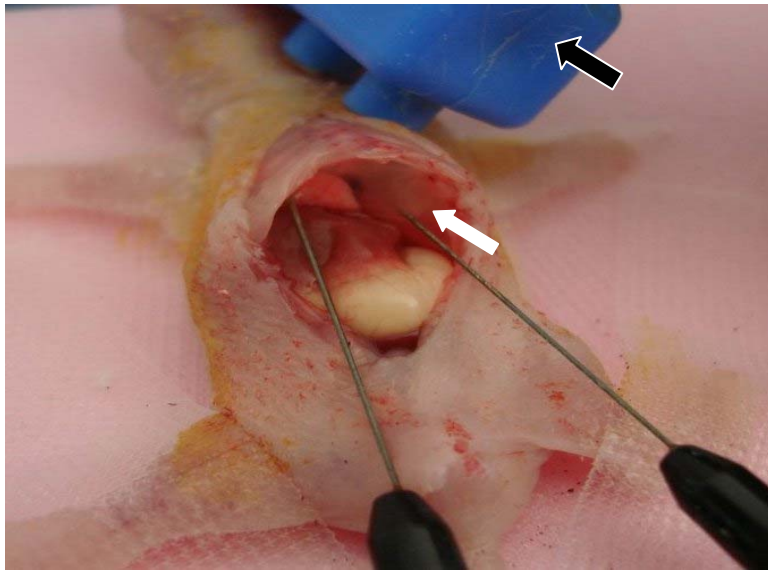
Tüm gruplarda bileşik motor sinir aksiyon potansiyelleri (BKAP) standard sinir iletim kayıt teknikleri kullanılarak yapıldı ⁵⁷. Kayıt için BIOPAC MP 100 veri toplama sistemi (Santa Barbara, USA) kullanıldı. Bileşik motor sinir aksiyon potansiyellerini kayıtlamak için aktif ve referans Ag/AgCl iğne elektrotlar ile disk biçiminde küçük yüzeyel toprak elektrodu kullanıldı. Kayıtlar modifiye edilmiş MacLean tekniği kullanılarak yapıldı. Aktif elektrot diyafraam kası içine, referans elektrot kostal bölge yakınına, toprak elektrodu ise sternum üzerine yerleştirildi. Frenik sinir standard bipolar yüzey elektrotu (MEDELEC disk elektrodu, referans no: 16894T, Oxford, GB) ile supramaksimal olarak uyarıldı. Uyarının şiddeti 1-V, süresi 0,5-msn idi. Kayıt sonunda motor sinir aksiyon potansiyelinin (MSAP) genliği ve süresi ölçüldü.



Resim 5. BIOPAC MP 100 veri toplama sistemi

Diyafram Kası İğne Elektromiyografisi

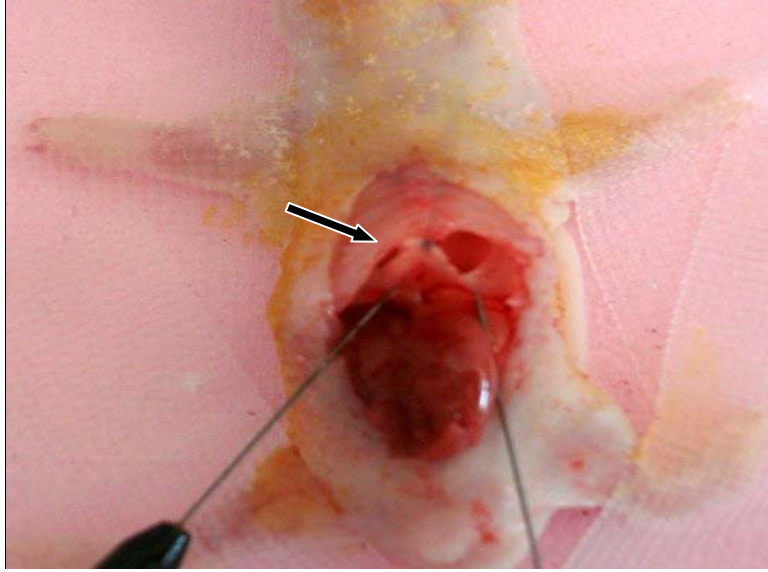
Diyafram iğne elektromiyografisi motor ünit aksiyon potansiyeli (MUAP) için modifiye Koepke tekniği uygulandı ⁵⁸. Bunun için monopolar iğne elektrodu (BIOPAC EL 400) diyaframa kası içine, yüzeysel toprak elektrodu ise sternum üzerine yerleştirildi. Elektromiyografik kayıtlardan motor birim aksiyon potansiyellerinin genliği, süresi ve frekansı değerlendirildi.



Resim 6. Elektrofizyolojik çalışma (kalın ok frenik sinir uyarımını, beyaz ok diyaframa yerleştirilen iğne elektrodu göstermektedir).

Diyafram Kasının Mekanik Aktivasyonu

Diyafram kasının kasılma işlevini değerlendirmek için orta hat kesisi yapıldı ve sol hemidiyaframdan yaklaşık 0.5 cm genişliğinde kas şeridi hazırlandı. Şeridin serbest ucu izometrik kuvvet transduserine bağlandı (MAY, FDT-10, TR). Kas şeridi Ag/AgCl iğne elektrotla uyarıldı ve kasılma eğrisi BIOPAC MP100 sistem kullanılarak kaydedildi. Bu eğriler maksimum kasılma kuvveti ve süresi açısından değerlendirildi.



Resim 7. Mekanik kas aktivasyonu (Ok diyafram şeridini göstermektedir).

6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı (SPSS 11.5 ve Statistica 6.0). Parametrelerin dağılımlarının değerlendirmek için Kolmogorov Smirnov testi kullanıldı. MDA, MPO ve TNF- α ve elektrofizyolojik çalışmalara ait değerler normal dağılım gösterdiğinden tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılığı değerlendirmek MDA, MPO ve TNF- α değerleri için Dunnet T3, elektrofizyolojik çalışmalara ait değerler için Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. IL-1 β değerleri normal dağılım göstermediği için Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılık ise Dunn çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

1. Genel Değerlendirme

Deney sırasında 2. gruptan 2 denek, 3. gruptan 1 denek ve 4. gruptan 2 denek eks oldu. Bu deneklerin genel durumlarının kötüleştiği, solunumlarının bozulduğu, cilt renklerinin soluklaştığı görüldü. Diyafram dokusu MDA, MPO, IL-1 β ve TNF- α bulguları tablo 1; diyafram kasının mekanik aktivasyon bulguları tablo 2'de; frenik sinir bileşik motor aksiyon potansiyeli bulguları tablo 3; ve diyafram kası motor ünit aksiyon potansiyeli bulguları tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Diyafram dokusu MDA, MPO, IL-1 β ve TNF- α düzeyleri

Değişken	Kontrol	IR 1. saat	IR 24. saat	IR + NAC	P
MPO (ünite/gr)	9.1 \pm 6.1	21.5 \pm 7.6 ^a	11.3 \pm 9.3	13.1 \pm 2.1 ^g	0.005
MDA (μ mol/gr)	17.3 \pm 17.3	23.7 \pm 11.8	14.3 \pm 4.6	24.3 \pm 9.3	0.054
TNF- α (pg/gr)	108.6 \pm 78.3	712.9 \pm 314.1 ^b	626.1 \pm 114.5 ^c	573.9 \pm 548.3	0.001
IL-1 β (pg/gr)	92.4 \pm 63.9	295.5 \pm 275.6 ^d	404.2 \pm 300.8 ^e	347.1 \pm 299.6 ^f	0.054

^ap=0.01, ^bp=0.004, ^cp=0.0001, ^dp=0.06, ^ep=0.002, ^fp=0.05 kontrol grubu; ^gp=0.03 IR 24. saat ile

Tablo 2: Diyafram kasının mekanik aktivasyon bulguları

Değişken	Kontrol	IR 1. saat	IR 24. saat	IR + NAC	P
Kuvvet (g/cm ²)	37.2 ± 1.2	11.3 ± 2.0 ^a	16.2 ± 1.6 ^b	42.1 ± 6.4 ^d	0.0001
Süre (msn)	340.2 ± 7.3	181.3 ± 15.7 ^c	186.2 ± 19.3 ^c	338.2 ± 8.5 ^e	0.0001

^ap=0.004, ^bp=0.02, ^cp=0.0001 kontrol grubu ile; ^dp=0.004, ^ep=0.0001 IR 24. saat grubu ile

Tablo 3: Frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli bulguları

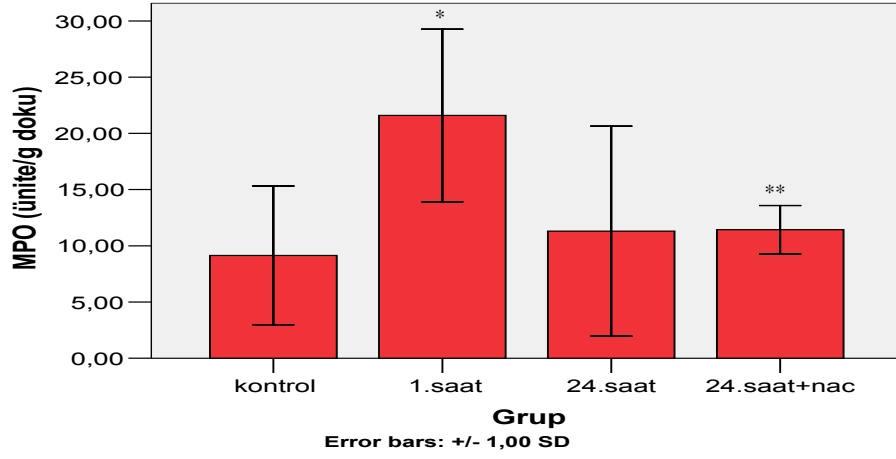
Değişken	Kontrol	IR 1. saat	IR 24. saat	IR + NAC	P
Genlik (mV)	6.5 ± 1.5	2.1 ± 1.8 ^a	3.0 ± 0.9	7.6 ± 2,3 ^b	0.0001
Süre (distal latans, msn)	2.3 ± 0.7	2.9 ± 0.5	3.6 ± 0.5 ^a	2.8 ± 0.6 ^c	0.0001

^ap=0.0001 kontrol grubu ile; ^bp=0.001 ve ^cp=0.05 IR 24. saat grubu ile

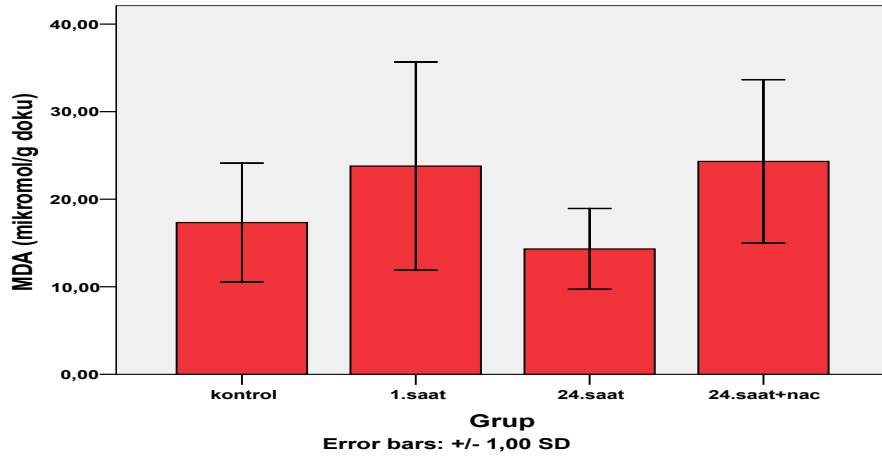
Tablo 4: Diyafram kası iğne elektromiyografisi bulguları

Değişken	Kontrol	IR 1. saat	IR 24. saat	IR + NAC	P
Genlik (mV)	3.1 ± 0.8	4.0 ± 0.8	3.6 ± 1.2	3.2 ± 0.8	0.45
Süre (msn)	21.7 ± 4.8	22.1 ± 3.9	27.8 ± 9.3 ^a	19.9 ± 5.9 ^b	0.0001
Frekans (10 sn)	41.6 ± 10.6	34.6 ± 6.9	36.7 ± 8.4	42.0 ± 7.8	0.11

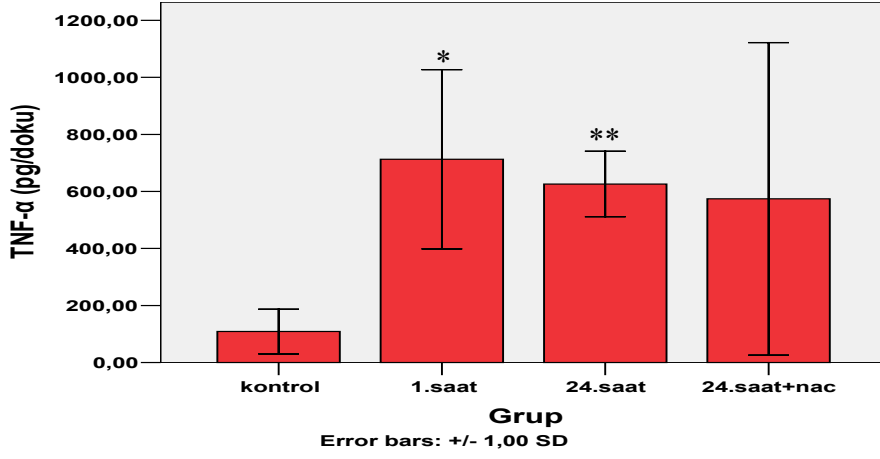
^ap=0.05 kontrol grubu ile; ^bp=0.005, IR 24. saat grubu ile



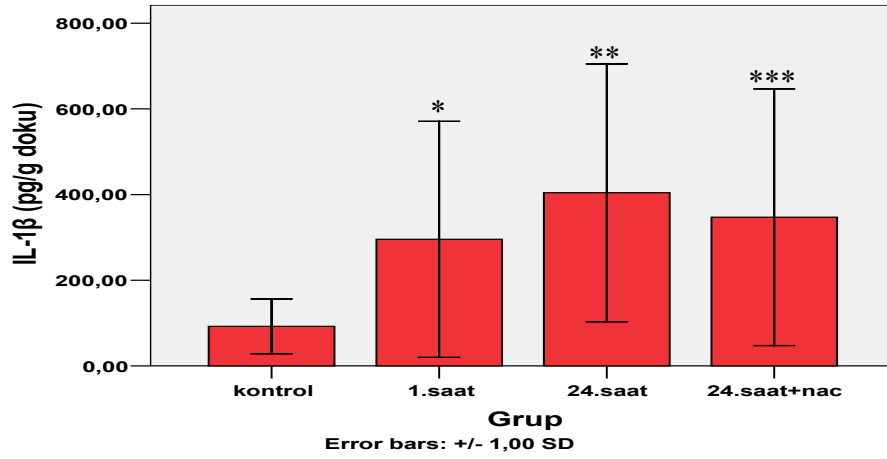
Şekil 3. Doku MPO düzeyleri. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir. [(varyans analizi, $p=0.005$, Dunnet çoklu karşılaştırma testleri; * $p=0.001$, kontrol grubu ile ** $p=0.03$ IR 24. saat grubu ile karşılaştırıldığında)].



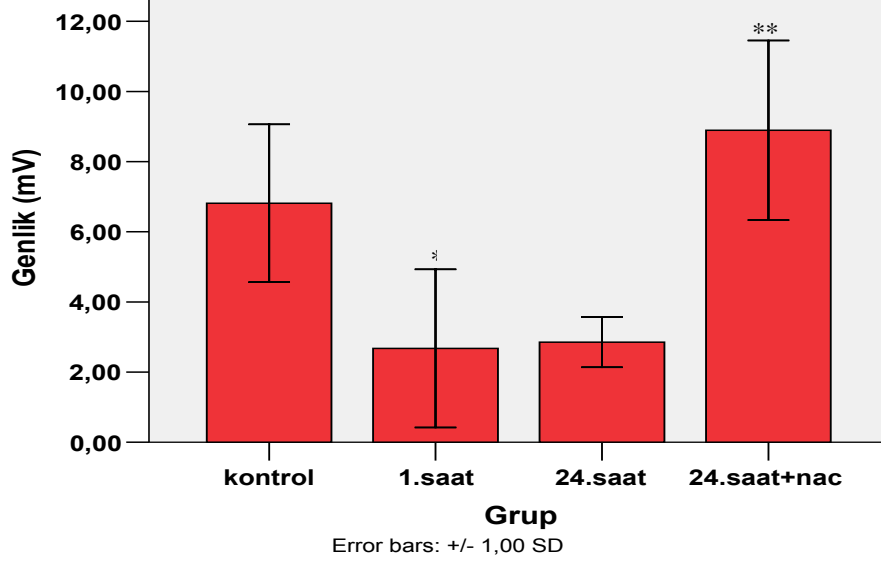
Şekil 4. Doku MDA düzeyleri. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir. Gruplar arasında MDA değerleri arasında istatistiksel farklılık saptanmamıştır (varyans analizi, $p=0.054$).



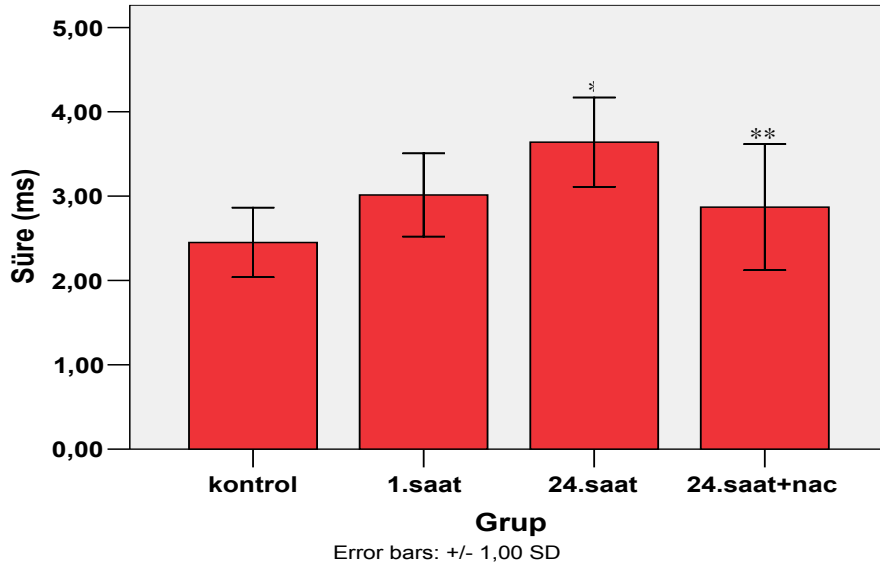
Şekil 5. Doku TNF- α düzeyleri. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir. [(varyans analiz, $p=0.001$; Dunnet çoklu karşılaştırma testleri; * $p=0.004$, ** $p=0.0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)].



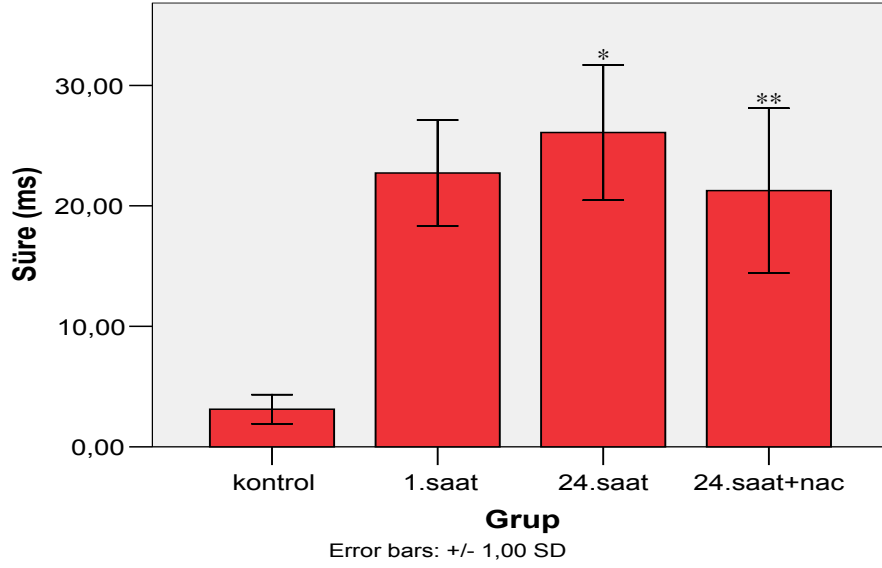
Şekil 6. Doku IL-1 β düzeyleri. Veriler ortalama \pm SS olarak verilmiştir. [(varyans analizi, $p=0.054$; Dunn çoklu karşılaştırma testleri; * $p=0.06$, ** $p=0.002$, *** $p=0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)].



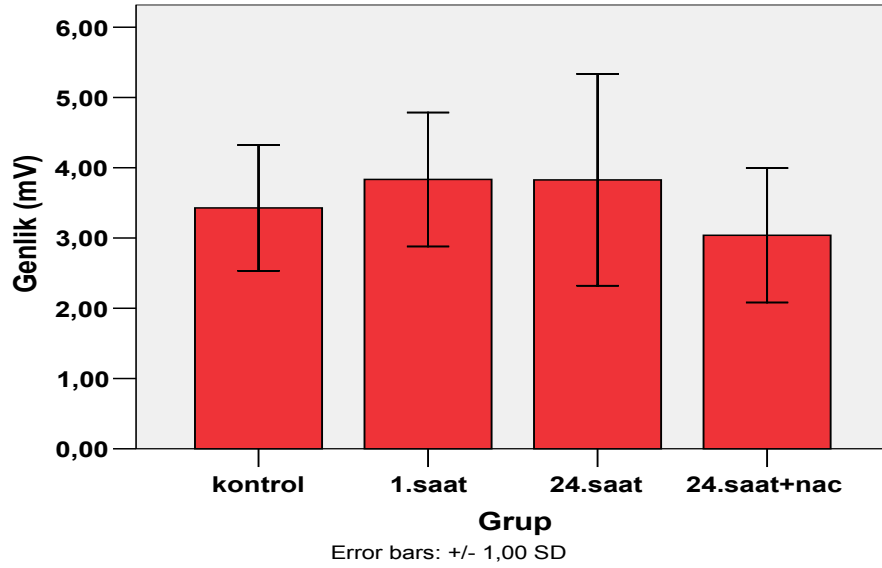
Şekil 7. Frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli genliği. Veriler ortalama \pm S.S olarak verilmiştir. [(varyans analizi, $p = 0.0001$; Tukey çoklu karşılaştırma testleri, $*p=0.0001$; kontrol grubu ile, $**p=0.001$ IR 24. saat ile karşılaştırıldığında)].



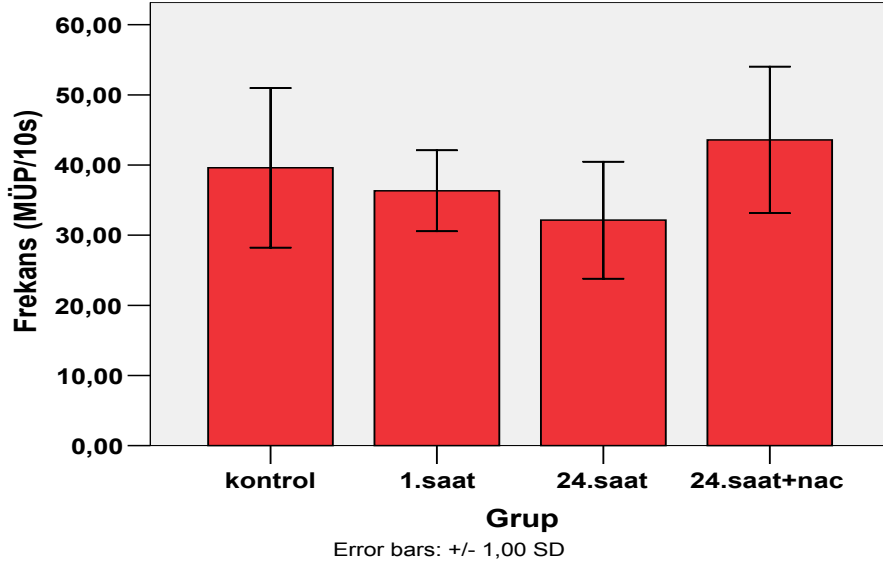
Şekil 8. Frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli süreleri. Veriler ortalama \pm S.S olarak verilmiştir [(varyans analizi, $p= 0.0001$; Tukey çoklu karşılaştırma testleri, $*p=0.0001$; kontrol grubu ile, $**p=0.05$ IR. 24. saat grubu ile karşılaştırıldığında)].



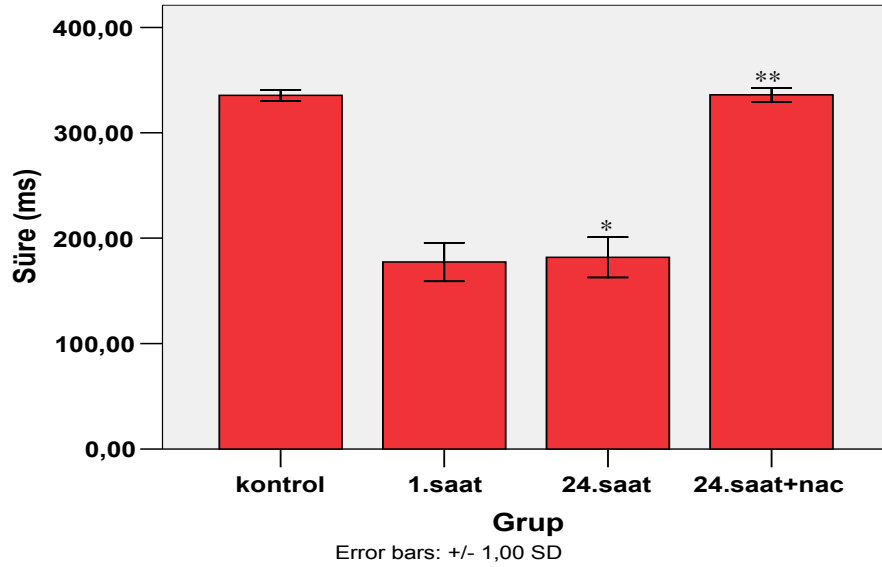
Şekil 9. Diyafram kası iğne elektromiyografi kaydı ile elde edilen motor ünite aksiyon potansiyeli süreleri. Veriler ortalama \pm S.S olarak verilmiştir. [(varyans analizi, $p= 0.0001$; Tukey çoklu karşılaştırma testleri, $*p=0.05$ kontrol grubu ile, $**p=0.005$ IR 24. saat grubu ile karşılaştırıldığında)].



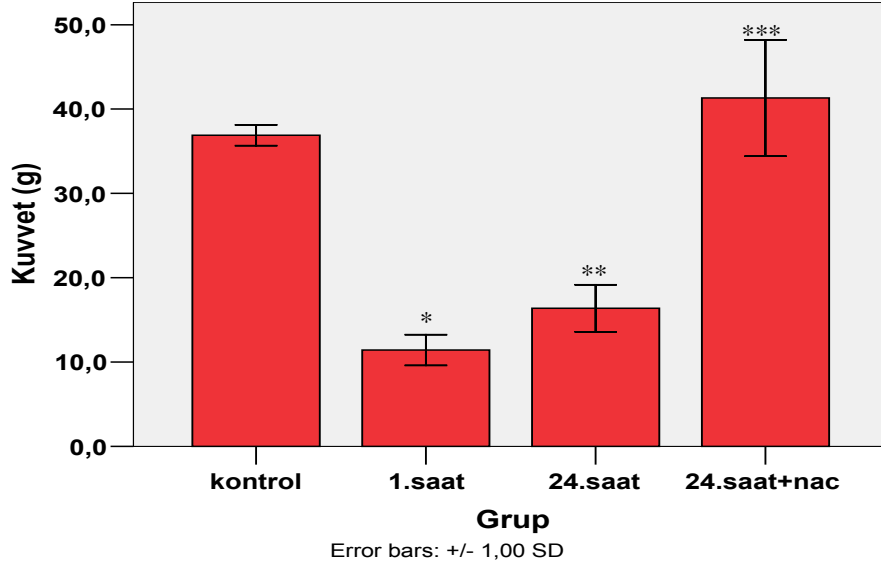
Şekil 10. Diyafram kası iğne elektromiyografi kaydı ile elde edilen motor ünite aksiyon potansiyeli genlikleri. Veriler ortalama \pm S.S olarak verilmiştir. (varyans analizi, $p= 0.04$).



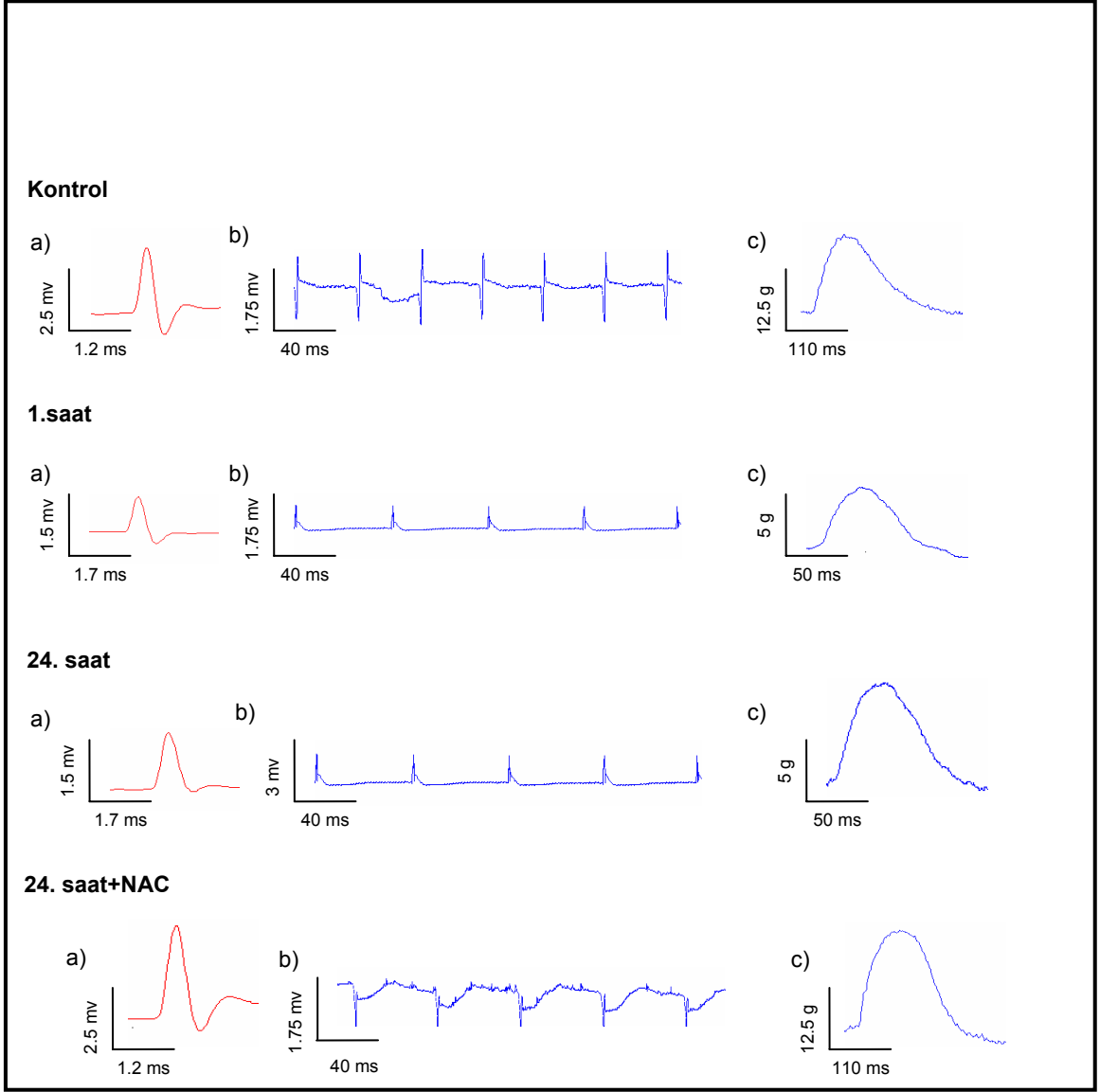
Şekil 11. Diyafram kası iğne elektromiyografi kaydı ile elde edilen motor ünite aksiyon potasyeli frekansları. Veriler ortalama \pm S.S olarak verilmiştir. (varyans analizi, $p= 0.011$).



Şekil 12. Diyafram kası mekanik aktivasyon süreleri. Veriler ortalama \pm S.S olarak verilmiştir. [(varyans analizi, $p= 0.0001$; Tukey çoklu karşılaştırma testleri testleri, * $p=0.0001$ kontrol grubu ile, ** $p=0.0001$ IR 24. saat grubu ile karşılaştırıldığında)].



Şekil 13. Diyafram kası mekanik aktivasyon kuvveti. Veriler ortalama \pm S.S olarak verilmiştir. [(varyans analizi; $p= 0.0001$, Tukey çoklu karşılaştırma testleri, * $p=0.004$, ** $p=0.02$. kontrol grubu ile, *** $p=0.004$ IR 24. saat ile karşılaştırıldığında)].

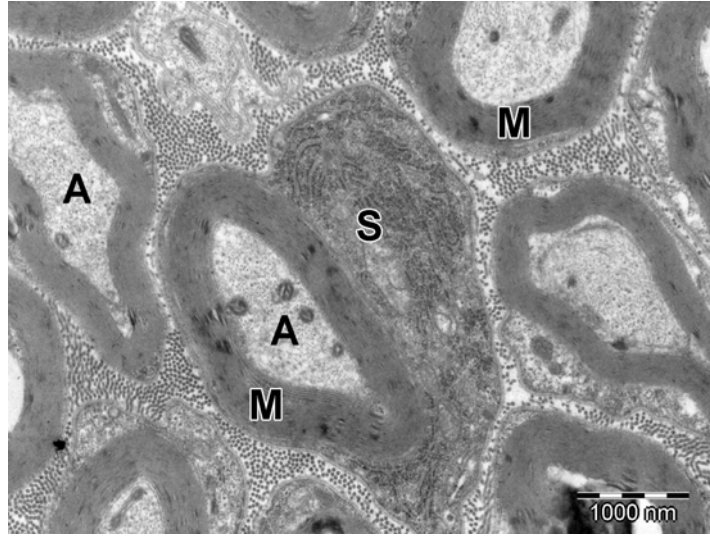


Şekil 14. Diyafram kası elektromiyografi ve frenik sinir ileti hızı kayıt bulguları. a) frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli b) diyafram kası elektromiyografisi c) diyafram kası kasılması.

2. Histopatolojik Bulgular

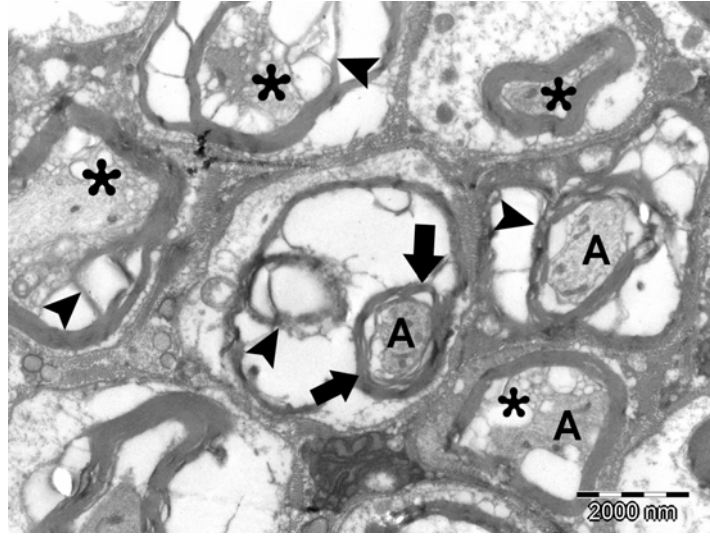
Elektron Mikroskopisi Bulguları

Kontrol Grubu: Elektron mikroskopik incelemelerinde normal yapının korunduğu görülmektedir. Düzenli konsantrik lameller yapıda miyelin kılıf (koyu siyah boyanma) ile sarılı korunmuş aksonal yapı (elektron lüsent: açık renk) izlenmektedir. Akson içinde nörotübül (akson uzunluğuna paralel), nöroflamanlar ve mitokondriyonlar görülmektedir. Sinir lifleri çevresinde Schwann hücrelerinin nukleusları, sitoplazmik uzantıları, sitoplazmik organeller ve serbest ribozomlar dikkati çekmektedir. Sinir lifleri arasında kapiller damarlar, endotel ve bazal laminalar doğal görünümündedir (Resim 12).



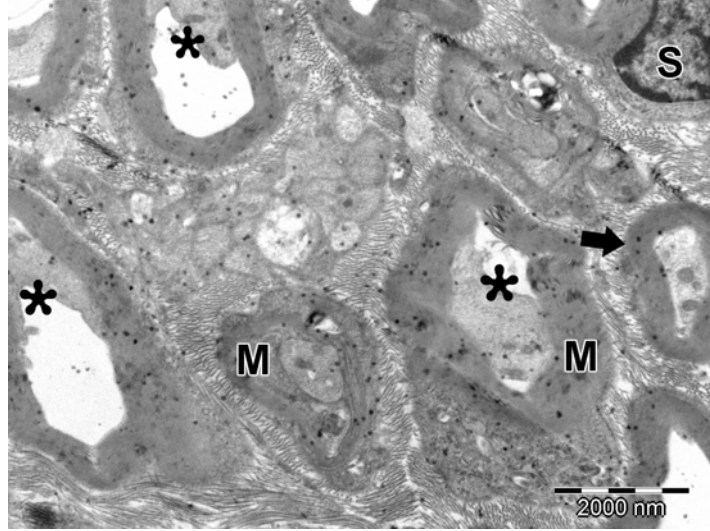
Resim 12. Frenik sinir elektron mikroskopik görüntüsü [A: akson, M: miyelin kılıf, S: schwann hücresi (kontrol grubu)].

İskemi reperfüzyon grubu 1. saat: Miyelin kılıfın lameller yapısında ayrışma, parçalanma, miyelin lamellerinin akson içine invaginasyonları izlenmektedir. Aksonal yapıda bozulma, dejenerasyon, şişme, organel harabiyeti görülmektedir. Bazı aksonlar ve miyelin kılıf arasında aksonal büzüşmeye bağlı olarak vakuol benzeri, içleri boş alanlar mevcuttur. Schwann hücre çekirdeklerinde kromatin kümeleşmesi, sitoplazmalarında elektron dansite artışı ve organel harabiyeti dikkati çekmektedir (Resim 13).



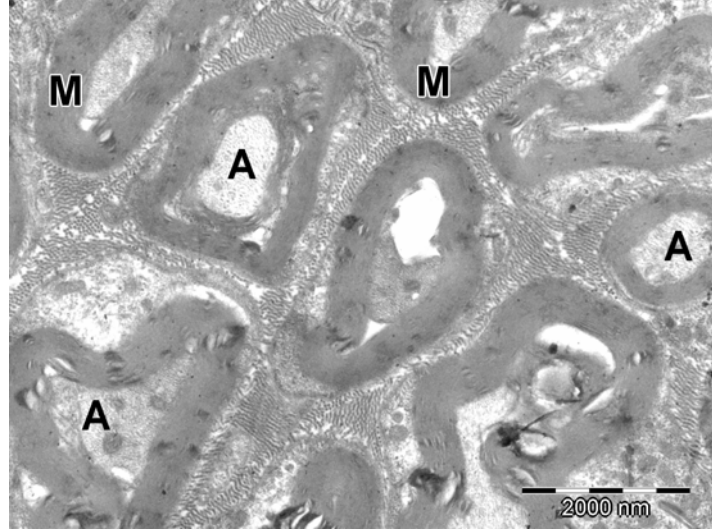
Resim 13. Frenik sinir elektron mikroskopik görüntüsü [A: akson, *: aksonal dejenerasyon, ok başı: miyelin kılıf ayrışması, ok: akson içine miyelin lamellar invajinasyon (IR 1. saat)].

İskemi reperfüzyon grubu 24. saat: Bazı alanlarda miyelin kılıf, aksonal yapı ve Schwann hücrelerinde 2. gruba benzer yapısal bozukluklar dikkati çekmekle birlikte, bazı alanlarda aksonal bütünlüğün ve yapının korunduğu izlenmektedir (Resim 14).



Resim 14. Frenik sinir elektron mikroskopik görüntüsü [M: miyelin kılıf, S:schwann hücresi *: aksonal harabiyet, ok: bazı alanlarda bütünlüğü korunmuş aksonal ve miyelin yapı (IR 24.saat)].

İskemi reperfüzyon grubu + N-acetyl cysteine: Miyelin kılıf ve aksonal yapıda bazı alanlarda hafif yapısal değişiklikler görülmekle birlikte, geniş alanlarda normal yapının korunduğu dikkati çekmektedir (Resim 15).



Resim 15. Frenik sinir elektron mikroskopik görüntüsü [A: akson, M: miyelin kılıf (IR + NAC)].

TARTIŞMA

Bu çalışma 1) intestinal IR hasarının diyaframda kasılma bozukluğuna neden olduğunu 2) bu etkinin primer olarak frenik sinir nöropatisine bağlı geliştiğini 3) NAC'ın bu hasarı önlediğini ve 4) diyafram dokusunda lipid peroksidasyonuna, nötrofil aktivasyonuna, IL-1 β ve TNF- α gibi sitokin üretimine neden olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın önemli bir özelliği deneysel modelinde yenidoğan sıçan kullanılmış olmasındır. Yenidoğan döneminde görülen midgut volvulus, doğumsal band anomalisi, internal herniyasyon ve nekrotizan enterokolit gibi yaygın barsak iskemisi ile seyreden intestinal obstrüksiyon olgularını doğru bir şekilde yansıtabilmek için bu çalışmada IR modeli olarak intestinal IR kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar intestinal IR hasarını daha çok kalp, akciğer, karaciğer, böbrek ve barsak gibi dokularda incelemiş ve lipid peroksidasyonunun anlamlı olarak arttığını göstermiştir^{59, 60}. Bildiğimiz kadarıyla yenidoğan sıçanlarda intestinal IR hasarını diyafram kası ve frenik sinir üzerine hem mekanik hem de elektrofizyolojik yönden inceleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmamızda kullandığımız intestinal IR modelinin barsak dokusunda hasar oluşturup-oluşturmadığını incelemedik. Bunun nedeni bu modelin daha önce birçok çalışmada denenmiş ve barsaklarda hasar oluşturduğunun doğrulanmış olmasındır^{7,9,59}. Yapılan çalışmalar bu modelin hem barsaklarda lipid peroksidasyona neden olduğunu hem de doku hasarı yaptığını göstermektedir. Gözlemlerimize göre de deneklerde iskemiden hemen sonra barsak dolaşımı bozulmakta ve doğal görünümleri kaybolmaktadır, iskemi sonlandırıldıktan sonra barsak dolaşımı yeniden sağlanmaktadır.

Çalışmamız intestinal IR hasarının diyafram kasılmasını olumsuz yönde etkilediğini gösterdi. Diyaframın mekanik kas aktivasyon ölçümlerinde hem kasılma kuvvetinin hem de kasılma süresinin belirgin olarak azaldığını bulduk. Bu azalmanın 1. saat gibi erken dönemde başladığı ve 24. saatte de devam ettiği görüldü. Mc Laughlin ve ark. alt ekstremitede oluşturdukları IR hasarının diyafram kasının kasılmasını bozduğunu ve bunun termal ön koşullama ile azaltılabileceğini

göstermişlerdir. Yazarlar bu hasarlanmanın serbest radikallerin intraselüler Ca^{+2} oranında değişikliğe neden olarak miyofilamantal proteinlerdeki azalmış Ca^{+2} affinitesine bağlı olduğunu öne sürmüşler. Yapılan çalışmalar septik koşulların benzer şekilde diyafram kasılmasını olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Septik koşullar, intestinal IR hasarında olduğu gibi sistemik enflamatuvar yanıtı neden olup, uzak organ hasarı yapmaktadır. Lipopolisakkarid bilindiği gibi deneysel sepsis modeli oluşturmak için oldukça sık kullanılır. Alain ve ark. lipopolisakkarid verilen sıçanlarda diyafram kasılmasının olumsuz yönde etkilendiğini ve sarkolemmada hasar oluştuğunu göstermişlerdir ^{61, 62}. Lin ve ark. da benzer şekilde lipopolisakkarid verilen sıçanlarda diyafram kasındaki kuvvet kaybının sarkolemmal hasara bağlı geliştiğini bulmuşlardır. Her iki çalışmada da sarkolemmal hasarın nitrik oksit yolları üzerinden olduğu ileri sürülmüştür. Özdülger ve ark. ise lipopolisakkarid verilen sıçanlarda görülen diyafram kasılmasındaki bozulmayı Ca^{2+} -ATPaz'ın baskılanmasına bağlamışlar. Ca^{2+} -ATPaz sarkoplazmik retikulum membranında ve sarkolemmada bulunan ve diyafram kasılmasından sorumlu bir kas proteindir ⁶². Çalışmamızın bir diğer önemli özelliği IR hasarının neden olduğu diyafram kasılmasındaki bozulmanın 1. saat gibi oldukça erken dönemde görülmesidir. Bildiğimiz kadarıyla diyafram kasının bu kadar erken dönemde etkilendiğini gösteren başka bir çalışma bulunmamaktadır. Literatüre baktığımızda diyafram kasındaki etkilenmenin en fazla 4. ile 12. saatlerde olduğu gösterilmiş ^{61, 62, 63}. Bunun bir nedeni yapmış olduğumuz intestinal IR modelinin daha yoğun sistemik enflamatuvar yanıt oluşturmasıyla ilgili olabilir. Örneğin barsak mezenterinden ipek halka geçirilerek yapılan bir saat iskemi ve bir saat reperfüzyon modelinin, superior mezenterik artere damar klempini konarak yapılan bir saat iskemi ve bir saat reperfüzyon modelinden daha fazla lipid peroksidasyona ve doku hasarına neden olduğu gösterilmiştir ⁵⁹. Ayrıca intra abdominal sepsis modelinin klinik koşulları daha iyi yansıttığı bildirilmiştir. Bir başka çalışmada da intra abdominal sepsis modelinin, lipopolisakkarid modelinden daha etkin sitokin salınımına ve doku hasarına neden olduğu bildirilmiştir ⁶³. Çalışmamızda NAC uygulanmasının diyafram kasında kuvvet kaybını önlediği görüldü. Diyafram kası hasarında NAC'ın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada yüksek inspiratuvar basınçta soluyan sağlıklı insanlarda diyafram güçsüzlüklerini giderebildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar genellikle

IR hasarında NAC uygulamasının diyafram kasındaki kuvvet kaybını önlediğini göstermektedir⁴⁹. Ancak bunun tersini savunan yazılar da vardır⁸⁰.

Diyafram kasının iğne elektromiyografisi ve frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli gibi elektrofizyolojik çalışmalar doku hasarının karakterini belirlemek ve miyopatik ve/veya nöropatik hasarın ayrımını yapmak için kullanılmaktadır. Bu çalışmadaki elektrofizyolojik bulgular diyafram kasında oluşan kuvvet kaybının aksonal dejenerasyon ve demiyelinizan frenik sinir nöropatisi ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli sinir içerisinde yer alan çok sayıda aksonun bireysel katkılarıyla oluşur. Aksonlarda gelişecek herhangi bir hasar aksonun bileşik kas aksiyon potansiyeline katkıda bulunamamasına neden olacaktır. Bilindiği gibi miyelin kılıfı aksonlarda iletim hızını etkileyen önemli faktörlerden biridir ve iletim hızını artırır. Miyelin kılıfı bu etkisini zar kapasitansını azaltarak gösterir. Zar kapasitansı $C=kA/d$ bağıntısı ile verilir. Burada A aksilemanın alanı, d ise aksonun kalınlığıdır. d'nin azalması zar kapasitansının artmasına ve iletimin yavaşlamasına yol açmaktadır. Frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyelinde genlik ve süre gibi iki değişkenin ölçümü yapılır. Frenik sinirde genliğin azalması akson hasarını gösterir ve periferik sinir işlevinde geri dönüşümü güç ve ağır bir bozulma olduğu anlamına gelir. Frenik sinirde distal latansın uzaması ise miyelin kılıfında ortaya çıkan bir hasarı düşündürür ve iletkenliğin yavaşladığı anlamına gelir. Buna göre bulgularımız akson ve miyelin hasarının ve ileti hızında yavaşlamanın eşlik ettiği frenik sinir nöropatisini desteklemektedir. Akson ve miyelin hasarı 1. saatte, ileti hızındaki yavaşlama ise 24. saatte maksimum düzeyde bulundu. NAC uygulanmasıyla hem genliğin hem de sürenin normal değerlere döndüğü, dolayısıyla gözlenen bu nöropatik etkilenmenin düzeldiği görülmektedir. Diyafram kası iğne elektromiyografisinde ise genlik, süre ve frekans gibi üç değişkenin ölçümü yapılır. Diyafram kasında genliğin artışı, sürenin artışı ve/veya frekansın düşmesi periferik sinir işlevinde bozulmaya sekonder kas atrofisi bir başka deyişle nörojenik etkilenme anlamına gelir. Tüm bu durumların tersi miyojenik etkilenme yani kasın kendi hastalıklarına sekonder güçsüzlüklerini düşündürür. Buna göre bulgularımız 24. saatte maksimum etkinin gözlendiği nörojenik etkilenmeyi ve NAC uygulaması sonrasında bu nörojenik etkilenmede gözlenen düzelmeyi desteklemektedir. Yapılan çalışmalar NAC'ın periferik sinir nöropatisini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir⁶⁴. Literatürde IR hasarının diyafram elektrofizyolojisi üzerine

etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Septik koşullarda ise solunum kaslarının elektrofizyolojisini inceleyen sadece birkaç klinik çalışma bulunmaktadır. İntra abdominal sepsis modelinde diyafram kasının etkilendiği ve aksonal ve demiyelinizan tip frenik sinir nöropatisi geliştiği gösterilmiştir ^{64,65}. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan septik hastaların kol ve bacaklarında kas güçsüzlüğünden yakınmalarının ve/veya solunum desteği yapılan septik hastaların ventilatörden ayrılmalarının septik olmayan hastalara göre daha güç olduğunun farkedilmesiyle kas elektrofizyolojisini araştıran çalışmalar yapılmış ve aksonal nöropati, demiyelinizan nöropati, nöromusküler bileşke transmisyon defekti, miyopati gibi polinöropatiyle uyumlu elektrofizyolojik bulgular tespit edilmiştir ^{72,73,74,75,76,77}. Örneğin Zifko ve ark. yoğun bakım hastalarında diyafram kasının elektrofizyolojisini araştırdıklarında bulgularının aksonal sinir dejenerasyonu ve frenik sinir denervasyonu ile uyumlu olduğunu göstermişlerdir ⁷². Zochodne ve ark. yoğun bakım ünitesinde yatan septik hastalarda solunumsal elektrofizyolojiyi incelemişler ancak buldukları frenik sinir nöropatisinin tipini belirtmemişlerdir ⁷³. Witt ve ark. septik hastalarda hem solunumsal kaslarda hem de kol bacak kaslarında primer aksonal sinir dejenerasyonu bulmuşlardır ⁷⁴. Septik hastalarda miyopatiler de sıklıkla görülmektedir. Miyopatiler tek başına görülebildiği gibi nöropatilere de eşlik edebilmektedir. Ancak bazı yazarlar yoğun bakım ünitelerinde yatan septik hastalarda miyopatilerin nöropatiler kadar sık görülmediğini ileri sürmektedir. Hatta bazı miyopatilerin aslında frenik sinir işlevinde bozulmaya sekonder kas atrofisi bir başka deyişle nörojenik etkilenmeye bağlı olduğunu belirtmişlerdir ⁷⁵. Bednarik ve ark. yoğun bakım ünitesinde yatan septik hastalarda hem elektrofizyolojik hem de histopatolojik çalışmalar yapmışlar ve bulgularının aksonal motor nöropati, duysal nöropati ve miyopati ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir ⁷⁶. Trojaborg ve ark. da yoğun bakım ünitesinde yatan septik hastalarda miyopatilerin nöropatilerden daha çok görüldüğünü bildirmişlerdir ⁷⁷. Ancak bu iki çalışmanın kol ve bacak kaslarındaki elektrofizyolojik bulguları yansıttığı unutulmamalıdır. Yazarlar çalışmalarında solunumsal kaslardaki elektrofizyolojik bulguları belirtmemişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz elektrofizyolojik ölçümler miyopatiyi desteklememektedir. Bu durum elektrofizyolojik çalışmalardaki görünümünün birbirlerine çok benzemesine ve ayrımlarının kolay olmamasına bağlanabilir. Ancak histopatolojik bulgularımızın da miyopati ile uyumlu olmaması bu olasılığı ortadan kaldırmaktadır.

Çalışmamızda diyafram iğne elektromiyografisi ve frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli bulgularının uyumluluğunu kontrol etmek için histopatolojik değerlendirme de yapıldı. Frenik sinir elektron mikroskopisinde miyelin kılıfın lameller yapısında ayrışma ve parçalanma, miyelin lamellerinin akson içine invaginasyon yaptığı görüldü. Aksonal yapıda bozulma, dejenerasyon, şişme, organel harabiyeti ve aksonal büzüşmeye bağlı vakualizasyon bulundu. Ayrıca Schwann hücre çekirdeklerinde kromatin kümeleşmesi, sitoplazmalarında elektron dansite artışı ve organel harabiyeti görüldü. Bu bulguların frenik sinir nöropatisi ile uyumlu olduğu bulundu. NAC uygulanan deneklerde ise bu bulguların büyük oranda düzeldiği görüldü. Sonuç olarak intestinal IR hasarının miyopati oluşturmayıp nöropati oluşturduğunu bulduk. IR hasarının derecesini belirleyen faktörler iskeminin süresi, iskeminin genişliği ve dokunun iskemiye duyarlılığıdır. Farklı dokuların IR hasarına duyarlılıkları farklıdır. Kas hücreleri iskemiye uzun süre dayanabildikleri halde sinir hücrelerinde geri dönüşümsüz hasarlar dakikalar içerisinde meydana gelebilir ⁸. Bu durum çalışmamızda görülen frenik sinir nöropatisini açıklamaktadır.

Sitokinler IR hasarının oluşumundan sorumlu tutulmaktadır. TNF- α , IR hasarından sonra erken dönemde salınan ve enflamasyonun hem lokal hem de sistemik etkilerinden sorumlu olan mediyatördür. TNF- α ayrıca serbest radikallerin oluşumunu ve nötrofil aktivasyonunu artırarak doku hasarının artmasına neden olmaktadır ^{33,35,37}. Bulgularımız intestinal IR hasarından sonra diyafram dokusunda TNF- α 'nın 1. saatte ve 24. saatte anlamlı olarak arttığını göstermektedir. Tracey ve ark. *in vitro* çalışmalarında TNF- α 'nın iskelet kasında membran potansiyelini düşürdüğünü bulmuşlar. Ayrıca, diyafram kasında membran dinlenme potansiyelinin azalmasının, nöromusküler kavşakta veya miyolemma boyunca impuls iletiminin yavaşlamasına, dolayısıyla kasılmanın bozulmasına neden olabileceğini belirtmişler. Wilcox ve ark. ise *in vivo* çalışmalarında TNF- α 'nın diyafram kasında doğrudan hasar oluşturduğunu ve kuvvet kaybına neden olduğunu göstermişler. Diyafram kasında yaptıkları elektrofizyolojik çalışmalarla da miyojenik etkilenmeyi doğrulamışlardır. TNF- α 'nın diyafram kası üzerine bu olumsuz etkisini araştıran çeşitli çalışmalar vardır. Örneğin, TNF- α 'nın kan basıncını ve kalp atım hacmini azalttığı ve bu nedenle diyafram perfüzyonunu azaltarak kas dokusunun metabolik gereksinimlerini sağlayamamasına neden olduğu gösterilmiştir ⁶⁶. Yine TNF- α 'nın serum elektrolit dengesini bozarak ve

metabolik asidoza yol açarak diyafram işlevini olumsuz yönde etkilediği ileri sürülmüştür ⁶⁷. IL-1 β ise IR hasarından sonra erken dönemde salınan bir diğer önemli sitokindir. IL-1 β ve TNF- α 'nın sinerjistik olarak salındığı bildirilmiştir ^{68,69,70}. IL-1 β , IL-10'u uyararak bu sitokin üzerinden TNF- α salınımını baskılamakta dolayısıyla doku hasarını azaltmaya çalışmaktadır ³⁴. Bulgularımız intestinal IR hasarından sonra diyafram dokusunda IL-1 β 'nin 1. saatte ve 24. saatte anlamlı olarak arttığını göstermektedir. Sonuç olarak, bulgularımız IR hasarından sonra ilk 24. saatte TNF- α ve IL-1 β 'nin diyafram kas hasarında rol oynadığını düşündürmektedir. Literatürdeki çalışmalar bu bulgumuzu desteklemektedir. TNF- α ve IL-1'in düz kaslarda kuvvet kaybına neden olduğu bildirilmiştir ^{68,69,74}. NAC verilen deneklerde ise TNF- α ve IL-1 β düzeyinin tekrar bazal değerlere indiğini gördük. Bunun yanında bazı çalışmalar NAC'ın TNF- α , IL-6 ve IL-10'a etki etmediğini göstermiştir ^{52,55}.

IR hasarında ksantin oksidaz yolağı ile oluşan serbest radikaller hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonuna ve dolayısıyla hücrenin zar yapısının bozulmasına neden olurlar. MDA düzeyi, IR çalışmalarında lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak kullanılır. Çalışmamızda diyafram dokusundaki MDA düzeyinin 1. saatte arttığı ancak 24. saatte tekrar bazal seviyelere gerilediği görüldü. 1. saatteki MDA artışının anlamlı olmamasını şuna bağlayabiliriz: 1) MDA artışı daha sonraki bir saatte anlamlılık kazanmış olabilir 2) Denek sayımız istatistiksel anlamlılığa ulaşmak için yetersiz kalmış olabilir. Yapılan çalışmalarda diyafram dokusunda lipid peroksidasyonu, hem erken ⁶², hem geç ⁶⁴ dönemde gösterilmiştir. Serbest radikallerin ayrıca hasarlanmış dokulardaki nötrofil birikimini arttırarak enflamasyonu tetiklediğini görüyoruz. Dokuda nötrofil birikimi, dokunun MPO aktivitesi ölçülerek dolaylı olarak saptanabilmektedir. Nötrofil aktivasyonu, endotel hücrelerinin adhezyon molekülleri ile bağlanması sonrası ortaya çıkan serbest radikaller ve proteolitik enzimler lokal doku hasarını tetiklerken, sistemik dolaşıma geçen aktive nötrofiller akciğer, karaciğer, kalp gibi uzak organ doku hasarından sorumludurlar. Bulgularımıza göre diyafram dokusundaki MPO'nun 1. saatte anlamlı olarak arttığını ancak 24. saatte tekrar bazal değerlere döndüğünü gördük. Bu bulgumuz literatürdeki çalışmalarla uyumludur. Ekingen ve ark. çalışmalarında MPO'nun 1. saatte arttığını ve 24. saatte azaldığını bulmuşlar ⁷⁹. Boczkowski ve ark. lipopolisakkarid verilen sıçanlarda 6. saatten itibaren diyafram

kasında nötrofil infiltrasyonu görüldüğünü ve 12. saatten itibaren de diyafram kasında kuvvet kaybının geliştiğini göstermişler⁷¹. Sonuç olarak bulgularımız IR hasarından sonra MDA ve MPO'nun erken dönemde diyafram kas hasarında rol oynadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalar NAC uygulamasının MDA ve MPO düzeylerini anlamlı olarak azalttığını göstermektedir⁷⁸. Deneysel sepsis modellerinde solunum kaslarındaki kuvvet kaybının kısmen lipid peroksidasyona ve nötrofil aktivasyonuna bağlı olduğunu ve bu kaybın NAC uygulamasından sonra düzeldiği gösterilmiştir^{61,64}. Bu çalışmamızda NAC uygulanmasının MDA ve MPO değişimine olumlu veya olumsuz katkıda bulunmadığı görüldü. Bunu birkaç şekilde açıklayabiliriz: 1) NAC, diyafram dokusundaki MDA ve MPO düzeyleri 24. saatte bazal seviyelere gerilediği için katkı sağlayamamış olabilir. 2) NAC uygulamasındaki farklılıklar etkinliği değiştirmiş olabilir. NAC'ın veriliş yolunun, dozunun ve zamanlamasının etkinliğini değiştirdiği hatta antioksidan etkisinin yanında prooksidan etkisinin de oluşabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir⁶⁴.

Çalışmamızda intestinal IR hasarından sonra sıçanlarda solunum sayısının arttığını ve bazılarında solunum sıkıntısı geliştiğini gözlemledik. Bazı deneklerde bulgular saatler içerisinde arttı ve solunum yetmezliği gelişti. Yapılan deneysel sepsis modellerinde solunum yükünün ve solunumsal kasların metabolik gereksinimlerinin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Ancak sepsis koşullarında solunumsal kasların metabolik gereksinimleri karşılanamamaktadır. Bu durum, sepsiste kardiak atım hacminin ve kan basıncının azalması ve dokuların gerekli enerjiyi alamamaları ve kullanamamaları ile açıklanabilir. Solunumsal yükün aşırı artması kas yorgunluğuna, hatta kas hasarına neden olmaktadır⁶⁴. Hussain ve ark. diyafram ve interkostal kaslarda elektromiyografi yapmışlar ve sepsiste solunum yetmezliğinin kas yorgunluğuna bağlı geliştiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda solunum yükünün aşırı artmış olmasının kas yorgunluğuna yol açıp-açmadığını incelemedik ancak bulgularımızla diyafram kasında hasar gelişmediğini söyleyebiliriz.

Çocuk Cerrahisi Klinikleri'nde yenidoğan cerrahisinin ayrı bir yeri vardır. Midgut volvulus, doğumsal band anomalisi, internal herniyasyon ve nekrotizan enterokolit gibi yaygın barsak iskemisi ile seyreden bazı intestinal obstrüksiyon olgularında solunumsal sıkıntı gelişebilmektedir. Bu hastalarda görülen solunum sıkıntısı kimi zaman giderek artmakta, arter kan gazları bozulmakta ve mekanik

solunum desteği gereksinimleri doğmaktadır. Hipotezimize göre midgut volvulus, doğumsal band anomalisi, internal herniasyon ve nekrotizan enterokolit gibi hastalıklarda barsak kan akımı bozulmakta ve doku iskemisi oluşmaktadır. İskemik hasarın derecesini belirleyen faktörler iskeminin süresi, iskeminin genişliği ve dokunun iskemiye olan duyarlılığıdır. Ancak hastalar ameliyata alınıp kan akımı yeniden sağlandığında reperfüzyon hasarı gelişmektedir. Reperfüzyon sonrası olan hasarın iskemiden daha fazla olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu alışmamızda özellikle solunum sıkıntısına neden olan fizyopatolojik olayları araştırmak ve bir tedavi yaklaşımı belirlemek istedik. Bulgularımız bu tip hastaların fizyopatolojisinde bir IR hasarı olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmamızda diyafram dokusunda lipid peroksidasyonu, nötrofil aktivasyonu ve sitokin birikimi sistemik enflamatuvar yanıtın tetiklendiğini ve uzak organ hasarı oluşturduğunu göstermektedir. Bunun sonucunda diyafram işlevinin bozulduğunu görmekteyiz. Ancak çalışmamızın belki de en önemli ve en çarpıcı sonucu diyafram kasındaki kuvvet kaybının 1. saat gibi oldukça erken dönemde görülmüş olmasıdır. Bu bir bakıma hastanın daha yatağına alınmadan solunum dinamiklerinin etkilendiği anlamına gelmektedir. Bu bulgu tedavinin erken başlaması gerektiği görüşünü desteklemektedir. Bazı hastalarda diyafram işlevindeki bozukluk post-op dönemde giderek artmakta ve sonunda yetersiz hale gelmektedir. Bu durumda mekanik solunum desteği kararının belki de klinik bulgular belirginleşmeden ve arter kan gazları bozulmadan verilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada yapmış olduğumuz elektrofizyolojik çalışmalar aksonal ve demiyelinizan frenik sinir nöropatisini göstermektedir. Halbuki daha önce yapılan çalışmalar solunumsal yetersizliği açıklarken primer olarak akciğer parankim dokusu ve diyafram kası üzerinde yoğunlaşmışlardır. Bu hastalarda periferik sinir tutulumunun gösterilmiş olması tedavide dikkate alınması gereken bir bulgu olabilir. Örneğin bu hastalarda eritropoetin, B vitamini gibi sinir dokusunu destekleyen ilaçların kullanımı gündeme gelebilir. Bu çalışmada diyafram hasarının gelişiminde oksidatif stres belirteçlerinin rol oynadığı ve NAC'ın diyafram kasında kuvvet kaybını önlediği gösterildi. Bu bulgularımız intestinal IR hasarında antioksidan tedavilerin kullanımını desteklemektedir. NAC bir glutatyon prekürsörü olup serbest radikal giderici özelliği ile de birçok çalışmada kullanılmıştır. Hücre içi oksidan-antioksidan dengenin sağlanmasında rol oynamaktadır. Ancak NAC kullanımında belli noktalara dikkat edilmesi gereklidir. Örneğin NAC'ın, NF-kB ve HIF-1 α

aktivasyonunu doza bağımlı arttırdığı gösterilmiştir ⁶⁴. NF-kB iNOS yapımını uyarmaktadır. Ayrıca NAC yüksek dozlarda verildiğinde prooksidan etki gösterebilmektedir. Bu nedenle klinik ve farmakokinetik çalışmalarla optimum kullanım dozu, veriliş zamanı ve uygulama şekli belirlenmelidir.

Sonuç olarak, çalışmamız midgut volvulus, doğumsal band anomalisi, internal herniyasyon ve nekrotizan enterokolit gibi yaygın barsak iskemisi ile seyreden intestinal obstrüksiyon olgularının fizyopatolojisine ışık tutmaktadır. Ayrıca çalışmamız bu hastaların tedavilerinde yeni açılımlar getirmektedir. Bu çalışmamızın benzer konudaki çalışmalara destek olacağını ve diğer araştırmacıları bu konuda çalışmaya teşvik edeceğini umut ediyoruz.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1) İntestinal IR hasarı diyafram kasında kuvvet kaybına neden olmaktadır.
- 2) Bulgular 1. ve 24. saat gibi çok erken dönemde belirmektedir.
- 3) Bu etki primer olarak frenik sinir nöropatisine bağlı gelişmektedir .
- 4) Aksonal ve demiyelinizan farklı 2 tip frenik sinir nöropatisine neden olmaktadır.
- 5) Diyafram dokusunda MDA, MPO, IL-1 β ve TNF- α artmaktadır.
- 6) NAC diyafram kasındaki kuvvet kaybını önlemektedir.
- 7) NAC diyafram elektrofizyolojisi bulgularını düzeltmektedir.
- 8) NAC diyafram dokusunda MDA ve MPO birikimini etkilememektedir
- 9) NAC diyaframda TNF- α ve IL-1 β gibi sitokin birikimini önlemektedir.
- 10) Antioksidan tedavi erken dönemde düşünülmelidir.
- 11) Mekanik solunum desteği kararı erken dönemde verilmelidir.
- 12) Frenik siniri korumaya yönelik nöroprotektif ilaçlar düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Montero EF, Abrahao MS, Koike MK, Manna MC, Ramalho CE. Intestinal ischemia and reperfusion injury in growing rats: hypothermia and N-acetylcysteine modulation. *Microsurgery*. 2003; 23: 517-21.
2. Avlan D, Tamer L, Ayaz L, Polat A, et al. Effects of trapidil on renal ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2006; 41: 1686-93.
3. Steinberg J, Halter J, Schiller H, Gatto L, Nieman G. The development of acute respiratory distress syndrome after gut ischemia/reperfusion injury followed by fecal peritonitis in pigs: a clinically relevant model. *Shock*. 2005; 23: 129-37.
4. Aytakin FO, Tekin K, Kabay B, et al. Antithrombin III attenuates pulmonary tissue injury caused by mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Surg*. 2005; 189: 161-6.
5. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 490-511.
6. Mc Laughlin R, Kelly CJ, Kay E, Bouchier-Hayes D. Diaphragmatic dysfunction secondary to experimental lower torso ischaemia-reperfusion injury is attenuated by thermal preconditioning. *Br J Surg*. 2000; 87:201-5.
7. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994; 81: 37-47.
8. Chervu A, Moore WS, Homsher E, Quinones-Baldrich WJ. Differential recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 1989; 47: 12-9.
9. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med*. 1993;21: 1376-86.
10. Blum H, Summers JJ, Schnall MD, Barlow C, et al. Acute intestinal ischemia studies by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann Surg*. 1986; 204: 83-8.
11. Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med*. 1986; 314: 1670-6.

12. Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Flaherty JT. Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation*. 1987; 75: 282-91.
13. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. 1986; 250: 749-53
14. Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol*. 1982; 60: 1390-7
15. Fantone JC, Duque RE, Davis BH, Phan SH. 3-deaza-adenosine inhibition of stimulus-response coupling in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*. 1989; 45: 121-8
16. Seyama A. The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Surg Today*. 1993;23: 1060-7.
17. Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE. Total ischemia in dog hearts, in vitro. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res*. 1981; 49: 892-900.
18. Souza DG, Bertini R, Vieira AT, Cunha FQ, et al. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol*. 2004; 143: 132-42.
19. Molmenti EP, Ziambaras T, Perlmutter DH. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 1993; 268: 14116-24.
20. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J*. 1990; 4: 355-9.
21. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol*. 2002; 97: 68-75.
22. Merchant SH, Gurule DM, Larson RS. Amelioration of ischemia-reperfusion injury with cyclic peptide blockade of ICAM-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: 1260-8.

23. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J.* 1999; 138: 69-75.
24. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1999; 43: 860-78.
25. Vermeiren GL, Claeys MJ, Van Bockstaele D, et al. Reperfusion injury after focal myocardial ischaemia: polymorphonuclear leukocyte activation and its clinical implications. *Resuscitation.* 2000; 45: 35-61.
26. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg.* 1992; 216: 117-34.
27. Schoenberg MH, Fredholm BB, Haglund U, Jung H, et al. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol Scand.* 1985; 124: 581-9.
28. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161: 488-503.
29. Souza DG, Cara DC, Cassali GD, et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000; 131: 1800-8.
30. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol.* 1990; 259: 300-5.
31. Tuttle RS, McCleary M. Inferior cardiac nerve activity in the cat during occlusion of the mesenteric artery. *Am J Physiol.* 1979; 236: 286-90.
32. Synder F. : Platelet activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol* 1990; 259: 697-708.
33. Souza DG, Cassali GD, Poole S, Teixeira MM. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2001; 134: 985-94.
34. Souza DG, Guabiraba R, Pinho V, Bristow A, Poole S, Teixeira MM. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *J Immunol.* 2003; 170: 4759-66.

35. Souza DG, Bertini R, Vieira AT, Cunha FQ, et al. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2004;143: 132-42.
36. Souza DG, Vieira AT, Soares AC, et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol.* 2004; 173: 4137-46.
37. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med.* 2003; 9: 575-81.
38. Yao YM, Bahrami S, Redl H, Schlag G. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha attenuates hemodynamic dysfunction secondary to intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Crit Care Med.* 1996; 24: 1547-53.
39. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg.* 1993; 80: 10-7.
40. Lane JS, Todd KE, Lewis MP, Gloor B, et al. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery.* 1997; 122: 288-94.
41. Haimovici H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myoneuropathic-metabolic syndrome. *Surgery.* 1979; 85: 461-8.
42. Rothenbach P, Turnage RH, Iglesias J, Riva A, Bartula L, Myers SI. Downstream effects of splanchnic ischemia-reperfusion injury on renal function and eicosanoid release. *J Appl Physiol.* 1997; 83: 530-6.
43. Turnage RH, Kadesky KM, Myers SI, Guice KS, Oldham KT. Hepatic hypoperfusion after intestinal reperfusion. *Surgery.* 1996; 119: 151-60.
44. Satoh K, Sakagami H. Effect of cysteine, N-acetyl-L-cysteine and glutathione on cytotoxic activity of antioxidants. *Anticancer Res.* 1997;17: 2175-9.
45. Ziment I. Acetylcysteine: a drug with an interesting past and a fascinating future. *Respiration.* 1986; 50: 26-30.
46. Dorow P. Mucolytics: when dispensable, when necessary?. *Lung.* 1990;168: 622-6.

47. Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med.* 1999; 27: 1100-4.
48. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1866-74.
49. Travaline JM, Sudarshan S, Roy BG, Cordova F, Leyenson V, Criner GJ. Effect of N-acetylcysteine on human diaphragm strength and fatigability. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156: 1567-71.
50. Ferrer JV, Ariceta J, Guerrero D, Balen E, Herrera J, Lera JM. Prevention by somatostatine and N-acetylcysteine of multiorgan failure mediated by oxidative stress after intestinal ischemia. *Transplant Proc.* 1999; 31: 2570-1.
51. Shalansky SJ, Pate GE, Levin A, Webb JG. N-acetylcysteine for prevention of radiocontrast induced nephrotoxicity: the importance of dose and route of administration. *Heart.* 2005; 91: 997-9.
52. Szkudlarek U, Zdziechowski A, Witkowski K, et al. Effect of inhaled N-acetylcysteine on hydrogen peroxide exhalation in healthy subjects. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004;17: 155-62.
53. Fahri Dere. *Anatomi, 4.* Baskı, Adana: Okullar Pazarı Kitabevi, 1996: 329-333.
54. Epstein SK. An overview of respiratory muscle function. *Clin Chest Med.* 1994; 15: 619-39.
55. Sieck GC. Diaphragm muscle: structural and functional organization. *Clin Chest Med.* 1988; 9: 195-210.
56. Yagi K. Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic diseases. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 366: 165-9.
57. Aminoff MJ. Electrophysiologic testing for the diagnosis of peripheral nerve injuries. *Anesthesiology.* 2004; 100: 1298-303.
58. Drachler DH, Koepke GH, Weg JG. Phrenic nerve injury from subclavian vein catheterization. Diagnosis by electromyography. *JAMA.* 1976; 236 :2880-1.

59. Akcakaya A, Alimoglu O, Sahin M, Abbasoglu SD. Ischemia-reperfusion injury following superior mesenteric artery occlusion and strangulation obstruction. *J Surg Res.* 2002; 108: 39-43.
60. Caglayan F, Caglayan O, Gunel E, Elcuman Y, Cakmak M. Intestinal ischemia-reperfusion and plasma enzyme levels. *Pediatr Surg Int.* 2002; 18: 255-7.
61. Comtois A, Hu F, Grassino A. Restriction of regional blood flow and diaphragmatic contractility. *J Appl Physiol.* 1991; 70: 2439-47.
62. Ozdulger A, Cinel I, Unlu A, et al. Poly(Adp-ribose) synthetase inhibition prevents lipopolysaccharide-induced peroxynitrite mediated damage in diaphragm. *Pharmacol Res.* 2002; 46: 67-73.
63. Lin MC, Ebihara S, El Dwairi Q, Hussain SN, et al. Diaphragm sarcolemmal injury is induced by sepsis and alleviated by nitric oxide synthase inhibition. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 1656-63.
64. Atis S, Nayci A, Ozge A, Comelekoglu U, Gunes S, Bagdatoglu O. N-acetylcysteine protects the rats against phrenic nerve dysfunction in sepsis. *Shock.* 2006; 25: 30-5.
65. Nayci A, Atis S, Comelekoglu U, et al. Sepsis induces early phrenic nerve neuropathy in rats. *Eur Respir J.* 2005; 26: 686-92
66. Wilcox P, Milliken C, Bressler B. High-dose tumor necrosis factor alpha produces an impairment of hamster diaphragm contractility. Attenuation with a prostaglandin inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 1611-5.
67. Wilcox PG, Wakai Y, Walley KR, Cooper DJ, Road J. Tumor necrosis factor alpha decreases in vivo diaphragm contractility in dogs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150: 1368-73.
68. Welborn MB 3rd, Douglas WG, Abouhamze Z, et al.. Visceral ischemia-reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. *Shock.* 1996; 6: 171-6.
69. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, Mukai M, Kitajima M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation.* 1997; 63: 143-8.

70. Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, et al. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. *Circulation*. 2001; 104: 308-3.
71. Boczkowski J, Lanone S, Ungureanu-Longrois D, et al. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. *J Clin Invest* 1996; 98: 1550-59.
72. Zifko UA, Zipko HT, Bolton CF. Clinical and electrophysiological findings in critical illness polyneuropathy. *J Neurol Sci*. 1998; 159: 186-93.
73. Polkey MI, Moxham J. Clinical aspects of respiratory muscle dysfunction in the critically ill patients. *Chest*. 2001; 119: 926-39.
74. Zochodne DW, Bolton CF, Wells GA, et al. Critical illness polyneuropathy. A complication of sepsis and multiple organ failure. *Brain*. 1987; 110: 819-41.
75. Witt NJ, Zochodne DW, Bolton CF, et. al. Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest*. 1991; 99:176-84.
76. Bednarik J, Lukas Z, Vondracek P. Critical illness polyneuromyopathy: the electrophysiological components of a complex entity. *Intensive Care Med*. 2003;29:1505-14.
77. Trojaborg W, Weimer LH, Hays AP. Electrophysiologic studies in critical illness associated weakness: myopathy or neuropathy--a reappraisal. *Clin Neurophysiol*. 2001; 112:1586-93.
78. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O. et al. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock*. 2003; 19: 366-72.
79. Ekingen G, Ceran C, Demirtola A. ve ark. İnce Barsak İskemi ve Reperfüzyon Süresinin Biyokimyasal ve Anastomoz İyileşmesi Üzerine Etkisi. *İnönü Üniv. Tıp Fak. Dergisi* 2006; 1:7-12.
80. Naik AK, Tandan SK, Kumar D, Dudhgaonkar SP. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 530: 59-69.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

sa	Saat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
IL-1β	İnterlökin-1
NAC	N-asetil Sistein
MOY	Multi Organ Yetmezliği
ARDS	Akut Respiratuvar Distres Sendromu
ATP	Adenozin Trifosfat
ADP	Adenozin Difosfat
PGI₂	Prostasiklin
NO⁻	Nitrik Oksit
PAF	Platelet Aktivite Edici Faktör
OH⁻	Hidroksil
NADPH	Nikotinamid Difosfonükleotid
PGH₂	Prostoglandin Endoperoksit
NOS	NO Sentaz
eNOS	Endotelyal NO Sentaz
iNOS	İndüklenebilir NO Sentaz
nNOS	Nöronal NO Sentaz
cGMP	Siklik GMP
C3a	Kompleman 3a
C5a	Kompleman 5a
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
GSH	Glutatyon
SOD	Süperoksitdismutaz
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografi

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (İskemi-reperfüzyon hasarı)	11
Şekil 2 (Antioksidan savunma mekanizmaları)	19
Şekil 3 (Doku MPO düzeyleri)	38
Şekil 4 (Doku MDA düzeyleri)	38
Şekil 5 (Doku TNF- α düzeyleri)	39
Şekil 6 (Doku IL-1 β düzeyleri)	39
Şekil 7 (Frenik Sinir Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli Genliği)	40
Şekil 8 (Frenik Sinir Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli Süresi)	40
Şekil 9 (EMG Kaydı ile Elde Edilen MÜAP Süreleri)	41
Şekil 10 (EMG Kaydı ile Elde Edilen MÜAP Genliği)	41
Şekil 11 (EMG Kaydı ile Elde Edilen MÜAP Frekans)	42
Şekil 12 (Diyafraam Kası Kasılma Süresi)	42
Şekil 13 (Diyafraam Kası Kasılma Kuvveti)	43
Şekil-14 (EMG ve Frenik Sinir İleti Hızı Kayıt Bulguları)	44
Resimler	
Resim 1 (Hayvan laboratavuarı)	31
Resim 2 (Yenidoğan rat)	31
Resim 3 (Normal barsak morfolojisi ve ipek halka tekniği)	32
Resim 4 (İskeminin geç dönemi)	32
Resim 5 (BIOPAC MP 100 veri toplama sistemi)	34
Resim 6 (Elektrofizyolojik çalışmalar)	34
Resim 7 (Diyafraam kası kontraksiyon çalışması)	35
Resim 8 (Frenik sinir elektron mikroskopik bulgusu)	45
Resim 9 (Frenik sinir elektron mikroskopik bulgusu)	46
Resim 10 (Frenik sinir elektron mikroskopik bulgusu)	47
Resim 11(Frenik sinir elektron mikroskoik bulgusu)	48

TABLULAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Diyafam dokusu MDA, MPO, IL-1 β ve TNF- α düzeyleri)	36
Tablo 2 (Diyafam kasının mekanik aktivasyon bulguları)	37
Tablo 3 (Frenik sinir bileşik kas aksiyon potansiyeli bulguları)	37
Tablo 4 (Diyafam kası iğne elektromiyografisi (EMG) bulguları)	37

EK-1-

İSTATİSTİKSEL TABLOLAR

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
MPO	34	13,1147	8,27945	1,80	33,14
MDA	34	19,4932	9,03786	4,61	40,73
TNF	34	483,6126	378,26283	31,09	1510,12
IL	34	275,2218	267,13370	31,09	1077,53

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MPO	MDA	TNF	IL
N		34	34	34	34
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	13,1147	19,4932	483,6126	275,2218
	Std. Deviation	8,27945	9,03786	378,26283	267,13370
Most Extreme Differences	Absolute	,122	,120	,134	,242
	Positive	,122	,120	,134	,242
	Negative	-,092	-,082	-,116	-,180
Kolmogorov-Smirnov Z		,711	,702	,779	1,410
Asymp. Sig. (2-tailed)		,693	,707	,579	,037

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MPO	Between Groups	781,657	3	260,552	5,280	,005
	Within Groups	1480,468	30	49,349		
	Total	2262,124	33			
MDA	Between Groups	597,729	3	199,243	2,849	,054
	Within Groups	2097,808	30	69,927		
	Total	2695,537	33			
TNF	Between Groups	2066419	3	688806,174	7,782	,001
	Within Groups	2655313	30	88510,428		
	Total	4721731	33			
IL	Between Groups	523306,2	3	174435,401	2,857	,054
	Within Groups	1831587	30	61052,912		
	Total	2354894	33			

Robust Tests of Equality of Means

		Statistic ^a	df1	df2	Sig.
MPO	Brown-Forsythe	5,594	3	22,025	,005
MDA	Brown-Forsythe	2,650	3	19,417	,078
TNF	Brown-Forsythe	6,295	3	10,431	,011
IL	Brown-Forsythe	2,632	3	20,985	,077

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons p values (2-tailed); IL (r_34) Independent (grouping) variable: GRUP Kruskal-Wallis test: H (3, N= 34) =14,20468 p =,0026

	kontrol	1. saat	24. saat	24. saat+nac
kontrol		0,068468	0,002876*	0,050997
1. saat	0,068468		1,000000	1,000000
24. saat	0,002876*	1,000000		1,000000
24. saat + nac	0,050997	1,000000	1,000000	

Correlations

			MPO	MDA	TNF	IL
Spearman's rho	MPO	Correlation Coefficient	1,000	,275	,350*	,189
		Sig. (2-tailed)	.	,116	,042	,286
		N	34	34	34	34
	MDA	Correlation Coefficient	,275	1,000	-,144	-,130
		Sig. (2-tailed)	,116	.	,415	,464
		N	34	34	34	34
	TNF	Correlation Coefficient	,350*	-,144	1,000	,616**
		Sig. (2-tailed)	,042	,415	.	,000
		N	34	34	34	34
	IL	Correlation Coefficient	,189	-,130	,616**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,286	,464	,000	.
		N	34	34	34	34

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
MPO	Dunnett T3	kontrol	1.saat	-12,4450*	3,34173	,014
			24.saat	-2,1606	3,67417	,990
			24.saat+nac	-2,2807	2,11420	,850
		1.saat	kontrol	12,4450*	3,34173	,014
			24.saat	10,2844	4,12940	,130
			24.saat+nac	10,1643*	2,83235	,035
		24.saat	kontrol	2,1606	3,67417	,990
			1.saat	-10,2844	4,12940	,130
			24.saat+nac	-,1202	3,21786	1,000
		24.saat+nac	kontrol	2,2807	2,11420	,850
			1.saat	-10,1643*	2,83235	,035
			24.saat	,1202	3,21786	1,000
MDA	Dunnett T3	kontrol	1.saat	-6,4555	4,72116	,683
			24.saat	3,0170	2,63811	,818
			24.saat+nac	-6,9744	4,12937	,485
		1.saat	kontrol	6,4555	4,72116	,683
			24.saat	9,4725	4,47856	,284
			24.saat+nac	-,5189	5,49086	1,000
		24.saat	kontrol	-3,0170	2,63811	,818
			1.saat	-9,4725	4,47856	,284
			24.saat+nac	-9,9914	3,84965	,147
		24.saat+nac	kontrol	6,9744	4,12937	,485
			1.saat	,5189	5,49086	1,000
			24.saat	9,9914	3,84965	,147
TNF	Dunnett T3	kontrol	1.saat	-604,2377*	113,81172	,004
			24.saat	-517,4907*	45,53690	,000
			24.saat+nac	-465,2669	208,72624	,275
		1.saat	kontrol	604,2377*	113,81172	,004
			24.saat	86,7471	117,46367	,967
			24.saat+nac	138,9709	235,13985	,989
		24.saat	kontrol	517,4907*	45,53690	,000
			1.saat	-86,7471	117,46367	,967
			24.saat+nac	52,2238	210,73977	1,000
		24.saat+nac	kontrol	465,2669	208,72624	,275
			1.saat	-138,9709	235,13985	,989
			24.saat	-52,2238	210,73977	1,000

*. p<0.05

ANOVA

FREKANS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	571,370	3	190,457	2,192	,110
Within Groups	2606,115	30	86,870		
Total	3177,485	33			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: FREKANS

Tukey HSD

(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.saat	3,2621	4,42107	,881	-8,7593	15,2835
	24.saat	7,4591	4,28244	,321	-4,1853	19,1036
	24.saat+nac	-3,9835	4,59316	,822	-16,4728	8,5058
1.saat	kontrol	-3,2621	4,42107	,881	-15,2835	8,7593
	24.saat	4,1970	4,52892	,791	-8,1176	16,5116
	24.saat+nac	-7,2456	4,82378	,449	-20,3620	5,8708
24.saat	kontrol	-7,4591	4,28244	,321	-19,1036	4,1853
	1.saat	-4,1970	4,52892	,791	-16,5116	8,1176
	24.saat+nac	-11,4426	4,69706	,092	-24,2144	1,3292
24.saat+nac	kontrol	3,9835	4,59316	,822	-8,5058	16,4728
	1.saat	7,2456	4,82378	,449	-5,8708	20,3620
	24.saat	11,4426	4,69706	,092	-1,3292	24,2144

ANOVA

SÜRE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3050,196	3	1016,732	44,739	,000
Within Groups	681,780	30	22,726		
Total	3731,976	33			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SÜRE

Tukey HSD

(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.saat	-19,6165*	2,26127	,000	-25,7651	-13,4678
	24.saat	-22,9666*	2,19037	,000	-28,9224	-17,0107
	24.saat+nac	-18,1505*	2,34929	,000	-24,5385	-11,7625
1.saat	kontrol	19,6165*	2,26127	,000	13,4678	25,7651
	24.saat	-3,3501	2,31643	,482	-9,6488	2,9485
	24.saat+nac	1,4660	2,46725	,933	-5,2427	8,1747
24.saat	kontrol	22,9666*	2,19037	,000	17,0107	28,9224
	1.saat	3,3501	2,31643	,482	-2,9485	9,6488
	24.saat+nac	4,8161	2,40243	,209	-1,7164	11,3486
24.saat+nac	kontrol	18,1505*	2,34929	,000	11,7625	24,5385
	1.saat	-1,4660	2,46725	,933	-8,1747	5,2427
	24.saat	-4,8161	2,40243	,209	-11,3486	1,7164

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GENLİK

Tukey HSD

(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.saat	-,4040	,52845	,870	-1,8410	1,0329
	24.saat	-,3992	,51188	,863	-1,7911	,9926
	24.saat+nac	,3891	,54902	,893	-1,1037	1,8820
1.saat	kontrol	,4040	,52845	,870	-1,0329	1,8410
	24.saat	,0048	,54134	1,000	-1,4672	1,4768
	24.saat+nac	,7932	,57659	,524	-,7746	2,3610
24.saat	kontrol	,3992	,51188	,863	-,9926	1,7911
	1.saat	-,0048	,54134	1,000	-1,4768	1,4672
	24.saat+nac	,7884	,56144	,507	-,7382	2,3150
24.saat+nac	kontrol	-,3891	,54902	,893	-1,8820	1,1037
	1.saat	-,7932	,57659	,524	-2,3610	,7746
	24.saat	-,7884	,56144	,507	-2,3150	,7382

ANOVA

GENLIK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,306	3	1,102	,888	,459
Within Groups	37,235	30	1,241		
Total	40,541	33			

ANOVA

KUVVET

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5355,230	3	1785,077	139,362	,000
Within Groups	384,267	30	12,809		
Total	5739,497	33			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KUVVET

Tukey HSD

(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.saat	25,464320*	1,6976467	,000	20,848233	30,080407
	24.saat	20,521064*	1,6444157	,000	16,049718	24,992410
	24.saat+nac	-4,416409	1,7637275	,080	-9,212177	,379360
1.saat	kontrol	-25,464320*	1,6976467	,000	-30,080407	-20,848233
	24.saat	-4,943256*	1,7390588	,038	-9,671947	-,214564
	24.saat+nac	-29,880729*	1,8522844	,000	-34,917292	-24,844165
24.saat	kontrol	-20,521064*	1,6444157	,000	-24,992410	-16,049718
	1.saat	4,943256*	1,7390588	,038	,214564	9,671947
	24.saat+nac	-24,937473*	1,8036230	,000	-29,841721	-20,033225
24.saat+nac	kontrol	4,416409	1,7637275	,080	-,379360	9,212177
	1.saat	29,880729*	1,8522844	,000	24,844165	34,917292
	24.saat	24,937473*	1,8036230	,000	20,033225	29,841721

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SÜRE_DK

Tukey HSD

(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.saat	158,1513*	6,57489	,000	140,2735	176,0292
	24.saat	153,7313*	6,36873	,000	136,4141	171,0486
	24.saat+nac	-,3248	6,83082	1,000	-18,8985	18,2490
1.saat	kontrol	-158,1513*	6,57489	,000	-176,0292	-140,2735
	24.saat	-4,4200	6,73528	,913	-22,7340	13,8939
	24.saat+nac	-158,4761*	7,17379	,000	-177,9824	-138,9698
24.saat	kontrol	-153,7313*	6,36873	,000	-171,0486	-136,4141
	1.saat	4,4200	6,73528	,913	-13,8939	22,7340
	24.saat+nac	-154,0561*	6,98533	,000	-173,0500	-135,0622
24.saat+nac	kontrol	,3248	6,83082	1,000	-18,2490	18,8985
	1.saat	158,4761*	7,17379	,000	138,9698	177,9824
	24.saat	154,0561*	6,98533	,000	135,0622	173,0500

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ANOVA

genlik

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	222,146	3	74,049	17,842	,000
Within Groups	124,504	30	4,150		
Total	346,650	33			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: genlik
Tukey HSD

(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.saat	4,13906*	,96632	,001	1,5115	6,7666
	24.saat	3,95948*	,93602	,001	1,4143	6,5046
	24.saat+nac	-2,08139	1,00394	,185	-4,8112	,6484
1.saat	kontrol	-4,13906*	,96632	,001	-6,7666	-1,5115
	24.saat	-,17958	,98990	,998	-2,8712	2,5121
	24.saat+nac	-6,22044*	1,05435	,000	-9,0873	-3,3536
24.saat	kontrol	-3,95948*	,93602	,001	-6,5046	-1,4143
	1.saat	,17958	,98990	,998	-2,5121	2,8712
	24.saat+nac	-6,04087*	1,02665	,000	-8,8324	-3,2493
24.saat+nac	kontrol	2,08139	1,00394	,185	-,6484	4,8112
	1.saat	6,22044*	1,05435	,000	3,3536	9,0873
	24.saat	6,04087*	1,02665	,000	3,2493	8,8324

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ANOVA

sure

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	151,429	3	50,476	15,001	,000
Within Groups	100,947	30	3,365		
Total	252,375	33			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: sure

Tukey HSD

(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	1.saat	4,21059*	,87011	,000	1,8447	6,5765
	24.saat	3,83559*	,84283	,000	1,5438	6,1273
	24.saat+nac	-,45749	,90398	,957	-2,9155	2,0005
1.saat	kontrol	-4,21059*	,87011	,000	-6,5765	-1,8447
	24.saat	-,37501	,89134	,975	-2,7987	2,0486
	24.saat+nac	-4,66808*	,94937	,000	-7,2495	-2,0866
24.saat	kontrol	-3,83559*	,84283	,000	-6,1273	-1,5438
	1.saat	,37501	,89134	,975	-2,0486	2,7987
	24.saat+nac	-4,29308*	,92443	,000	-6,8067	-1,7794
24.saat+nac	kontrol	,45749	,90398	,957	-2,0005	2,9155
	1.saat	4,66808*	,94937	,000	2,0866	7,2495
	24.saat	4,29308*	,92443	,000	1,7794	6,8067

*. The mean difference is significant at the .05 level.