

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



**RATLARDA SİRKADİYEN RİTİM BOZUKLUĞUNUN YARA İYİLEŞMESİ
VE BARSAK ANASTOMOZ KUVVETİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Mesut SİPAHİ

GENEL CERRAHİ
UZMANLIK TEZİ

KOCAELİ
2009

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



**RATLARDA SİRKADİYEN RİTİM BOZUKLUĞUNUN YARA İYİLEŞMESİ
VE BARSAK ANASTOMOZ KUVVETİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Mesut SİPAHİ

GENEL CERRAHİ
UZMANLIK TEZİ

Tez Yöneticisi: Prof.Dr. Anıl ÇUBUKÇU

Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr. Mustafa DÜLGER

Etik Onayı: 04/03/2008, HAEK 3/2, Proje No:9

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi Tarafından Desteklenmiştir

Proje No: 2008/039

KOCAELİ
2009

TEŐEKKÜR

“İlim ve sanat takdir görmediđi yerden göç eder”

İbni Sina

Uzmanlık eğitimim boyunca eğitim ve öğrenimimde katkılarından dolayı başta Sayın Prof.Dr. Mustafa Dülger, Prof.Dr. Zafer Utkan ve Prof.Dr Zafer Cantürk Bey olmak üzere tüm hocalarıma, tez çalışmam süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Anıl Çubukçu Bey’e ve Sayın Yard.Doç.Dr. Ayşe Karson Hanım’a, birlikte çalışmaktan onur duyduğum asistan arkadaşlarıma, sevgi, destek ve hoşgörülerini ile her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim, oğlum ve aileme en içten teşekkürlerimi, hürmet ve saygılarımı sunuyorum.

Dr. Mesut Sipahi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	i
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Biyolojik Ritimler	3
2.2. Sirkadiyen Ritim	4
2.3. Suprakiazmatik Nükleus	8
2.4. Shift Work	10
2.5. Sirkadiyen Ritim ve Bağışıklık Sistemi	11
2.5.1. Melatonin ve bağışıklık sistem üzerine etkileri	11
2.5.2. Prolaktin ve bağışıklık sistem üzerine etkileri	15
2.5.3. Kortizol ve bağışıklık sistemi üzerine etkileri	16
2.6. Yara İyileşmesi	19
2.6.1. Hemostaz ve inflamasyon	19
2.6.2. Proliferasyon	20
2.6.3. Matürasyon	21
2.7. İntestinal yara iyileşmesi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. Deneysel Yöntem	24
3.2. Biyokimyasal Yöntem	31
3.3. Doku Takip ve Boyama Yöntemi	31
3.4. İstatistiksel Yöntem	32
4. BULGULAR	33
4.1. Biyokimyasal Bulgular	33
4.2. Histolojik Bulgular	36
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43

7. ÖZET	44
8. ABSTRACT	46
9. KAYNAKLAR	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ACTH: Adrenokortikotropik Hormon
AK: Aydınlık-Karanlık
AVP: Arjinin Vazopressin
CBG: Kortizol Bağlayıcı Globulin
CRH: Kortikotropin Releasing Hormon
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
GABA: Gama Amino Bütirik Asit
İL: İnterlökin
ML: Melatonin
NK: Natural Killer
PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör
PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PRL: Prolaktin
RHT: Retinohipotalamik Traktus
RNS: Serbest Nitrojen Radikali
ROS: Serbest Oksijen Radikali
SCN: Suprakiazmatik Nükleus
TGF: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF: Tümör Nekrozis Faktör
TRH: Tiroid Releasing Hormon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Normal aydınlık-karanlık döngüsünde bulunan nokturnal bir hayvanın tipik lokomotor aktivite kayıtları.	4
Şekil 2. Biyolojik ritim, zeitgeber ve zaman değerlendirmesi.	6
Şekil 3. Günlük insan plazma melatonin seviyesi, vücut ısısı, plazma kortizol seviyesi	7
Şekil 4. Suprakiazmatik Nükleus	8
Şekil 5. Sirkadiyen saatin düzenlenmesi ve fizyolojik etkileri	9
Şekil 6. Faz ilerlemesi ve faz silinmesinde melatonin düzeyi	10
Şekil 7. Serotonin sentezi	12
Şekil 8. Melatonin sentezi	12
Şekil 9. Melatoninin iki saat modeli ile regülasyonu	14
Şekil 10. Genç bayanlarda prolaktinin diurnal ve pulsatil salınımı	15
Şekil 11. ACTH ve kortizolün diurnal ve pulsatil salınımı	17
Şekil 12. ACTH/Kortizol oranının yaş ile ilişkisi	17
Şekil 13. Barsak basınç kuvveti ölçümü için hazırlanan manşon basınç düzeneği	24
Şekil 14. Ratların numaralandırılması	25
Şekil 15. Ratların ameliyat masasına tespiti	25
Şekil 16. Antisepsi sağlanması	26
Şekil 17. Ratların steril örtü ile örtülmesi	26
Şekil 18. Kolon diseksiyonu	27
Şekil 19. Kolon anastomozu	27
Şekil 20. Karın kapatılması	28
Şekil 21. Kan alma işlemi	28
Şekil 22. Barsak basınç ölçümü düzeneği	29
Şekil 23. Barsak anastomoz basınç kuvveti ölçümü.	29
Şekil 24. Çalışma grubu için uygulanacak zaman çizelgesinin şematik görünümü	30
Şekil 25. Preoperatif ve postoperatif ağırlık ortalamalarının gruplara göre değerlendirilmesi.	33

Şekil 26. Serum melatonin seviyesinin gruplara göre değerlendirilmesi	34
Şekil 27. Doku hidroksiprolin seviyesini gruplara göre değerlendirilmesi	35
Şekil 28. Anastomoz basınç kuvvetinin gruplara göre değerlendirmesi	36
Şekil 29. Sham grubu histolojisi	37
Şekil 30. Kontrol grubu histolojisi	38
Şekil 31. Kontrol grubu anastomoz bölgesi	38
Şekil 32. Çalışma grubu histolojisi	39

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. Yara iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörler

23

1. GİRİŞ

Evrende tüm olaylar belirli bir ritim içerisinde gerçekleşmektedir. Bir elektronun atom çekirdeği etrafında, ayın dünya, dünyanın kendi ve güneş etrafında dönmesi hep bir ritim içerisinde. Bu nedenle günler mevsimler ve yıllar meydana gelmektedir. Biyolojik ritimler, canlıların dış dünyada tekrar eden fiziksel etkenlere karşı gösterdikleri biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal yanıtlardır. Tüm ökaryotlar ve bazı prokaryotlardan itibaren insana dek hemen hemen tüm canlılarda biyolojik ritim bulunmaktadır (1). Biyolojik ritim, canlının dış dünyaya adaptasyonunu sağlamaktadır. Kalbin elektriksel aktivitesi, solunum hareketleri, uyku-uyanıklık, hormonların sentez ve salgılanması gibi birçok olay belirli bir ritim içerisinde gerçekleşmektedir. Canlılarda, herhangi fiziksel ve kimyasal etkiye istenilen yanıtın alınması için, doğru etkinin doğru zamanda, doğru miktarda ve doğru yöntemle yapılması gerekmektedir. Fizyolojik fonksiyonların 24 saatlik döngüler şeklinde gerçekleştirilmesine sirkadiyen ritim denilmektedir. Biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal olayların senkronize çalışmasını düzenleyerek organizmanın çevreye adaptasyonunu sağlamaktadır. Canlılar, dış ortamda meydana gelen olayları, içerisinde bulunduğu meteorolojik durumu, sosyal etkenleri, barınma ve beslenme durumlarını değerlendirerek vücut ısısı düzenlenmesi, uyku uyanıklık durumu, gastrointestinal motilite, psikolojik durum gibi düzenlemelerle o an içerisinde bulunduğu çevreye adapte olmaktadır. Bunun için her canlı kendi fiziksel özelliklerine göre çeşitli davranışlar geliştirmiştir. Baykuş, yarası gibi canlıların gece aktif, gündüz dinlenme durumunda olmaları, ayıların kış uykusuna yatmaları, göçmen kuşların kışın güneye, yazın kuzeye göç etmeleri gibi davranışlar bunlara en güzel örneklerdir. Bu davranışlar hayati öneme sahiptir. Biyolojik ritim sürekli çevre ile iletişim halindedir. Kendisini içerisinde bulunduğu yeni ortama tekrar adapte etmekte, güncellemekte ve ona göre yeni pozisyon almaktadır.

Transmeridyonel uzun mesafe kısa sürede yapılan uçuşlar sonrası görülen sirkadiyen ritim bozukluğuna jet lag, vardiyalı çalışanlarda görülen sirkadiyen ritim bozukluğuna ise shift lag veya shift work denilmektedir (10, 11, 12, 13). Her ikisi de vücutta benzer biyolojik etkilere sahiptir. Sirkadiyen ritimde başlıca rol alan hormonlar melatonin, adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortizol ve büyüme

hormonudur. Bu hormonların özellikle bağışıklık sistemi başta olmak üzere, kardiyovasküler sistem, sindirim sistemi, enerji metabolizması, ürogenital sistem üzerine çok önemli fonksiyonları bulunmaktadır (6).

Yara iyileşmesi hala cerrahi bölümlerin en çok üzerinde durduğu ve araştırdığı konular arasında bulunmaktadır. Yara iyileşmesi üzerine etkisi bulunan birçok mekanizmaya açıklık getirilmekle birlikte hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Çok karmaşık multisistemik faktörlerin etkileri bulunmaktadır. Bağışıklık sistem hücreleri ve fonksiyonları, serbest oksijen radikalleri, hemostaz, fibrin ve kollajen sentezi ve yıkımı, beslenme durumu, enerji metabolizması, enfeksiyon gibi faktörlerin birbirleri ile yakın ilişkiler içerisinde bulunduğu kompleks, hayati bir fonksiyondur. Bu sistemler üzerinde vücut sirkadiyen ritminin ana mesajcıları olan melatonin (ML), kortizol ve ACTH'nin çok büyük etkileri bulunmaktadır. Birçok çalışmada farmakolojik dozlarda yara iyileşmesi üzerine olumlu ya da olumsuz etkili oldukları ispatlanmıştır (48, 49, 51, 53, 54, 55). Özellikle kalın barsak olmak üzere barsak anastomoz kaçakları hala gastrointestinal cerrahinin en önemli komplikasyonları arasında bulunmaktadır. Barsak anastomozu yapılan hastalarda en büyük mortalite ve morbidite nedenini hala anastomoz kaçakları oluşturmaktadır.

Modern yaşamda çalışma, mesai şartları, sosyal şehir yaşantısı, transmeridyenel uçuşların yaygınlaşması gibi nedenlerle sirkadiyen ritim bozuklukları sık görülen bir rahatsızlıktır. Buna karşın sirkadiyen ritim bozukluğunun yara iyileşmesi ve barsak anastomozu üzerine olan etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle bu tür hastalarda postoperatif komplikasyonları azaltmak amacıyla ratlarda shift lag'in yara iyileşmesi ve barsak anastomoz kuvveti üzerine etkilerinin araştırılması planlandı. Bu çalışmanın, günümüzde sık görülen shift lag'i bulunan hastalarda elektif operasyon planlanırken, ameliyat tarihinin değerlendirilmesi sırasında bu rahatsızlıkların göz önüne alınıp alınmaması gerektiği konusunda faydalı olabileceği düşünüldü.

2. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

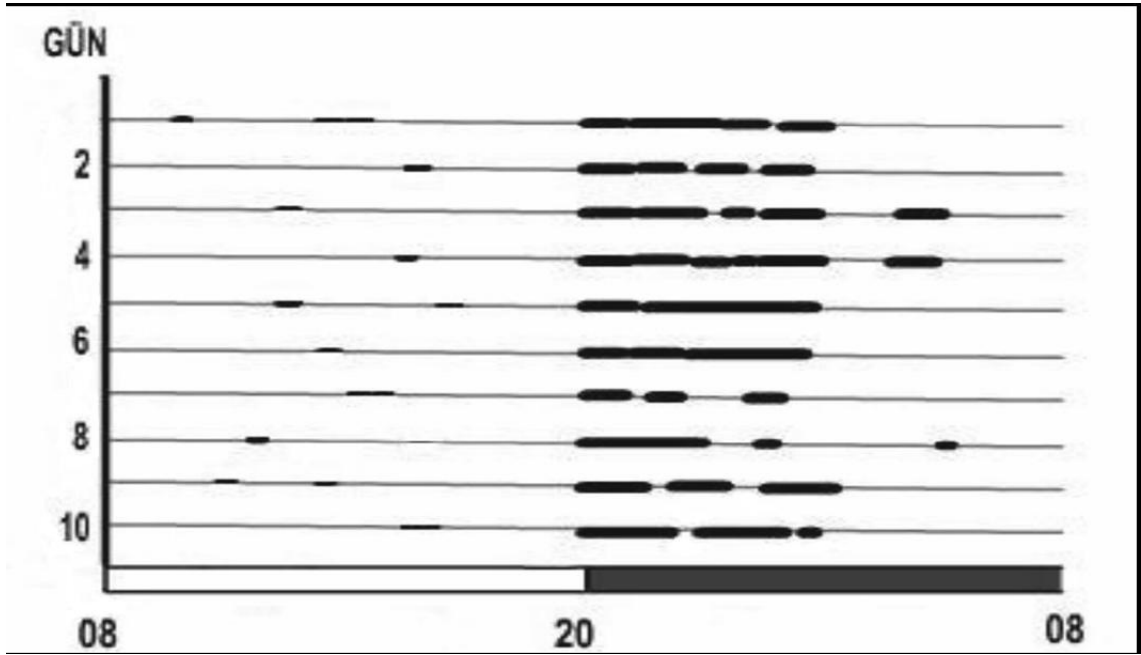
2.1. Biyolojik Ritimler

Canlıların dış dünyada tekrar eden fiziksel etkenlere karşı gösterdikleri biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal yanıtlara biyolojik ritimler denilmektedir. Biyolojik ritimleri inceleyen bilim dalı kronobiyoloji olarak adlandırılır. Başlıca 4 çeşit biyolojik ritim bulunur (6).

- 1) Sirkadiyen ritimler: Gece-gündüz değişiklikleri ile meydana gelen fizyolojik cevaplar.
- 2) Sirkatidal ritimler: Gel-git olayları sonucu meydana gelen fizyolojik cevaplar.
- 3) Sirkalunar ritimler: Ayın evreleri (dolunay, yarım ay, hilal) ile meydana gelen fizyolojik cevaplar.
- 4) Sirkannual ritimler: Yıllık, mevsimsel değişiklikler ile meydana gelen fizyolojik cevaplar.

Ayrıca sıklığı sirkadiyen ritimlerden sık olan ve 20 saatten daha kısa süreli döngüler şeklinde gerçekleşen ritimlere ultradiyen, döngüsü 30 saatten uzun olan ritimlere ise infradiyen ritimler denilmektedir. Birkaç gün, bir haftadan 20-30 gün arasındaki süre içerisinde gerçekleşen menstrüel siklus gibi ritimlere ise sirkaseptal ritim denilmektedir (6). Hayvanlarda ve bitkilerde biyolojik ritimler 1729'dan beri bilinmektedir. Ünlü Fransız astronom Jean Jacques d'Ortous de Mairan güneşe yönelen (heliotrop) bitkilerin yapraklarının gündüz açılıp gece kapandığını, buna rağmen bitkilerin sürekli karanlıkta tutulmasına rağmen bu davranışlarının değişmediğini göstermiştir. Bu bulgu, bilim çevrelerinde, canlılardaki ritim mekanizmasının içsel bir kaynaktan yönetildiğine dair ilk deneysel kanıt olarak kabul edilmiştir (1). İnsanlarda ritimlere ilişkin ilk gözlemi 1866'da vücut sıcaklığının gündüz ve gece değişikliğini kaydeden William Ogle yapmıştır (2). 1961'de Jurgen Aschoff tarafından insanlardaki ilk araştırma gerçekleştirilmiştir (3). Aschoff kendi kurduğu ve Tier Bunker olarak anılan bir izolasyon ünitesinde 3-4 hafta boyunca kalan gönüllülerin uyku-uyanıklık döngülerinin 25 saatlik bir periyodu olduğunu göstermiştir. Denekler, ışıkların açılıp kapanması ve yemek saati konularında serbest bırakılmalarına, ayrıca ortam sıcaklığı araştırmacılar tarafından habersizce artırılıp

azaltılmasına rağmen bu periyod değişmemiştir. Sirkadiyen sistem ve günlük fiziksel aktivite arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Lokomotor aktivite kaydı, sirkadiyen ritmin izlenmesinde kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Gece aktif olan hayvanlar, karanlıkta lokomotor aktivite gösterip aydınlıkta dinlenirler. Kafesine yerleştirilen bir koşma tekerleği ile hayvanın gün boyu yaptığı aktivite, grafik olarak (aktogram) kaydedilebilir. Gece aktif bir hayvanın lokomotor aktivitesi şekil 1’de gösterilmiştir.



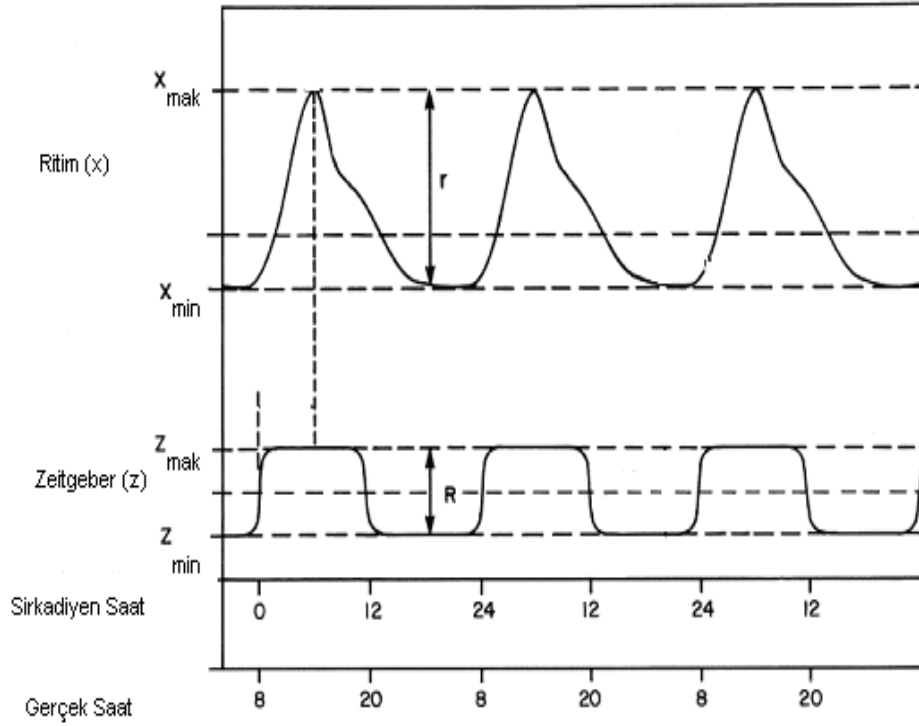
Şekil 1: Normal aydınlık-karanlık döngüsünde bulunan nokturnal bir hayvanın tipik lokomotor aktivite kayıtları (aktogram) (36).

2.2. Sirkadiyen Ritim

Latince circa: etrafında, dies: bir gün anlamına gelmektedir. Biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal ritimlerin 24 saat içerisinde tekrar edilmesine sirkadiyen ritim denilmektedir. Vücuttaki birçok hücrede internal bir saat bulunmaktadır. Fizyolojik fonksiyonlarını bu saate göre yerine getirmektedirler. İn vitro çalışmalarda, karaciğer, böbrek gibi bazı organların, çevresel bir etken olmamasına rağmen fizyolojik fonksiyonlarını belirli bir ritimde gerçekleştirdikleri gösterilmiştir. Bu saatlere periferik biyolojik saat denilmektedir. Suprakiazmatik nükleus (SCN)’da bulunan internal saate ise ana biyolojik saat denilmektedir. Zeitgeber (zaman verici),

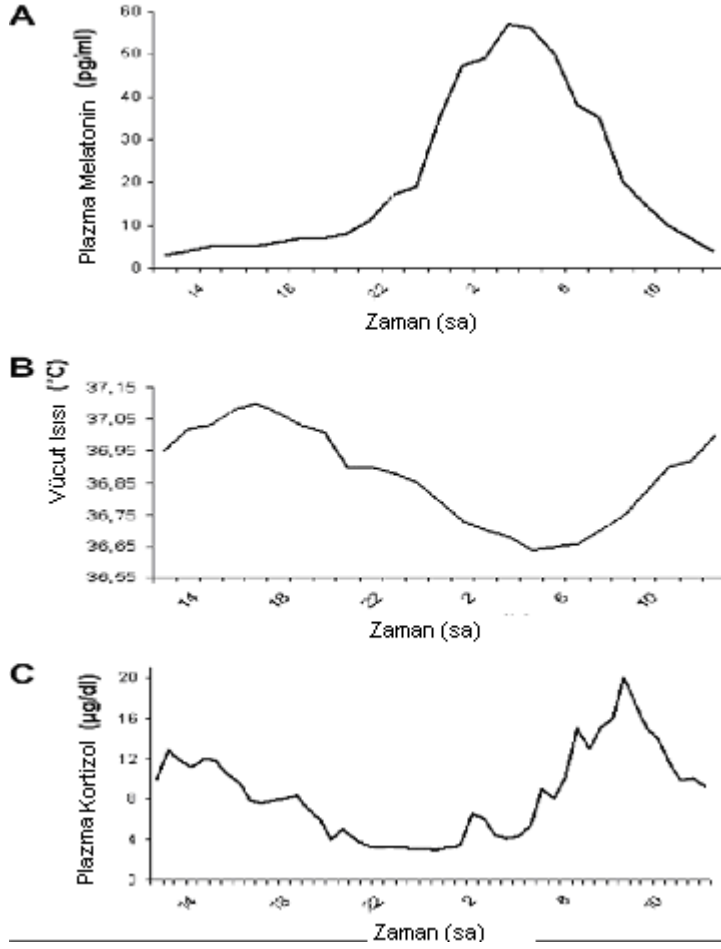
almanca kökenli; ışık, uyku programı, aktivite, sıcaklık, yemek, saat gibi sosyal sinyallerdir. SCN da bulunan ana biyolojik saat, zeitgeber denilen bu sinyaller yorumlanarak senkronize edilir. Gün içerisinde sık sık kontrol edilerek tekrar ayarlanır. Vücuttaki diğer periferik saatler ise bu ana saate göre ayarlanmaktadır. Işık en kuvvetli zeitgeberdir. Charles Czeisler ve arkadaşları 1970'lerin sonlarına doğru aydınlığın insan sirkadiyen ritmi üzerine etkisi ile ilgili birçok araştırma yapmışlar ve aydınlığı uyku bozukluklarının tedavisinde başarı ile uygulamışlardır (1). Periferik organların günlük ritimleri ışığa duyarlı değildir. Periferik organlardaki biyolojik saat, SCN tarafından gönderilen sinyaller ile ayarlanmaktadır. Fakat istisna olarak Kawara ve ark. (2002) ultraviyole B-band radyasyonunun, insan deri hücresindeki keratinositlerde bulunan sirkadiyen saat genleri üzerinde direkt olarak etkili olabileceğini söylemiştir. Ancak bu mekanizmaya tam olarak açıklık getirilememiştir (7).

Sirkadien ritim birçok fizyolojik ve psikolojik etkiye sahiptir. Uyku uyanıklık döngüsü, vücut ısısı, kan basıncı düzenlenmesi, çalışma performansı, melatonin, büyüme hormonu, kortizol gibi çeşitli hormonların sentez ve sekresyonu bunların başlıcalarıdır. Sirkadien ritimde aydınlık-karanlık (AK) süreleri, aydınlık periyod photoperiod olarak, karanlık periyod ise scotoperiod olarak isimlendirilir. Örneğin AK 16/8, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık periyodu anlamına gelmektedir (4). Sirkadiyen ritim ve zeitgeber ilişkisi şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: Biyolojik ritim, zeitgeber ve zaman değerlendirmesi. Biyolojik ritim (x). Zeitgeber uyarısı (z). Maksimum and minimum seviye (X_{mak} , X_{min} , Z_{mak} , Z_{min}), Ossilasyon (r , R) (1).

Ana biyolojik saat anterior hipotalamustaki SCN'da bulunur. Retinadaki özelleşmiş ganglion hücrelerinden ışık sinyali alınarak retinohipotalamik traktus (RHT) ile SCN'a getirilir ve burada yorumlanır. Deneysel çalışmalarda SCN lezyonu oluşturulan ratlarda sirkadiyen ritim düzensizleşmiş olarak bulunmuştur (1). Sirkadiyen ritmi değerlendirmek için sıklıkla kullanılan kriterler vücut ısısı, serum melatonin ve kortizol seviyeleridir. Ayrıca uyku uyanıklık, yeme içme, lokomotor aktivite gibi davranışsal parametreler de sirkadiyen ritmin değerlendirilmesinde kullanılabilir.



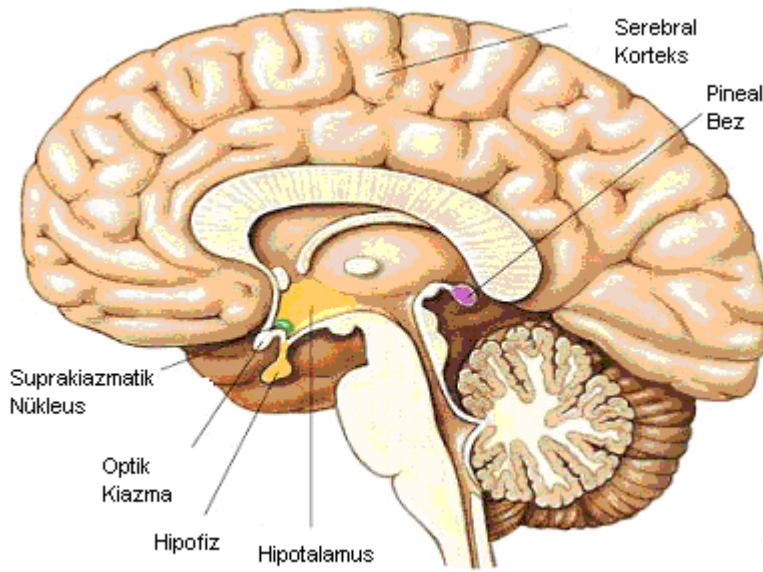
Şekil 3: Günlük insan plazma melatonin seviyesi, vücut ısısı, plazma kortizol seviyesi. (37).

Jet lag ve shift lag (shift work) sırası ile meridyenler arası uzun mesafe kısa sürede uçuşlar sonucu ve vardiyalı çalışma sonrası, kırıklık, keyifsizlik, yorgunluk, bitkinlik, uykusuzluk, kabızlık, ishal, bulantı, şişkinlik, sinirlilik, algılama bozukluğu, çalışma performansında azalma gibi semptomlarla seyreden biyolojik ritim bozukluğu sendromlarıdır (2). Bu semptomlar genellikle kısa sürelidir ve takip eden birkaç gün içerisinde kaybolur. Uzun süren sirkadiyen ritim bozukluğuna “kronik shift work” denir. Kardiyovasküler hastalıklar, sindirim sistemi düzensizlikleri, ürogenital sistem disfonksiyonu gibi çeşitli rahatsızlıklara neden olur (2). Boggild ve Knutsson (1999) gündüz süreli ve vardiyalı çalışanların karşılaştırıldığı 17 çalışmada kardiyovasküler hastalık riskinin %40 oranında arttığını bildirmişlerdir (5). Sirkadiyen sistemin normal aktivitesini bozan vardiyalı çalışanlarda kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser gibi yaşla ilişkili

hastalıklarda belirgin artış tespit edilmiştir (9). Kardiyovasküler hastalıklar gelişmiş ülkelerde ölüm sebebi olarak hala birinci sırada yer almaktadır.

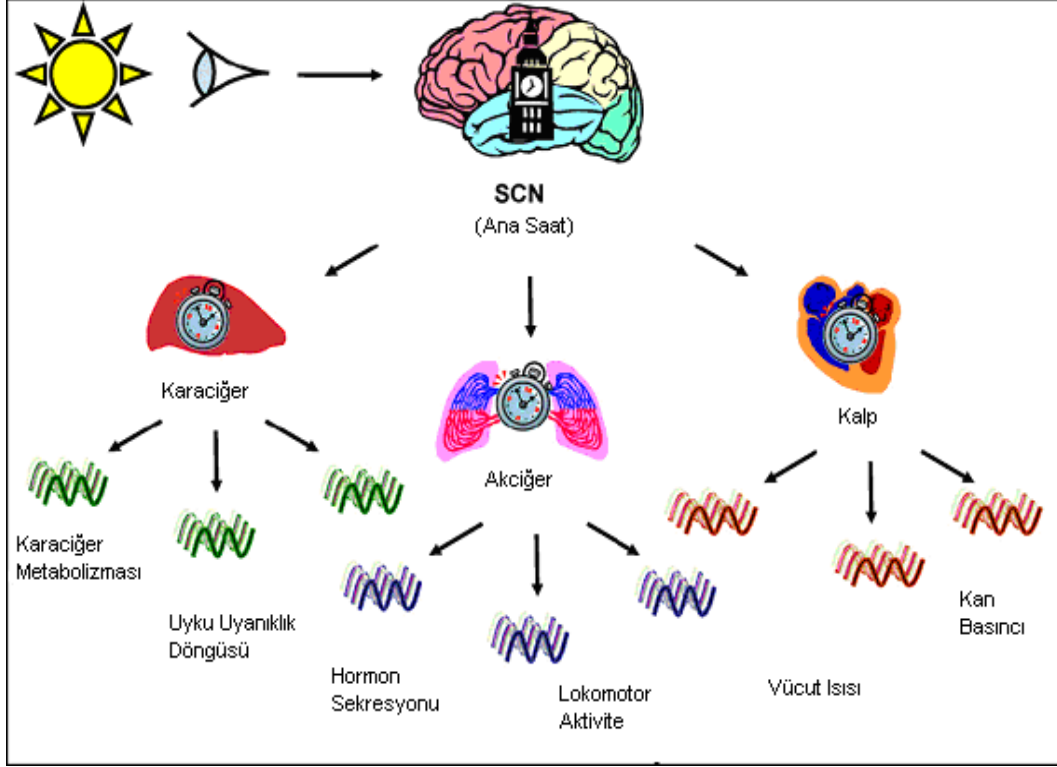
2.3. Suprakiazmatik Nükleus

SCN, anterior hipotalamusta, 4. ventrikül ortalarında, optik kiazma üzerinde her iki hemisferde orta hat yanında sağlı sollu birer adet bulunur.



Şekil 4: Suprakiazmatik Nükleus.

SCN’da bir internal saat bulunmaktadır. Bu saat zeitgeber denilen zaman verici sinyaller değerlendirilerek senkronize edilmektedir. Vücutta bulunan diğer hücreler de SCN’ dan gelen sinyaller ile kendi internal saatlerini ayarlamakta ve fonksiyonlarını buna göre yerine getirmektedirler (9).

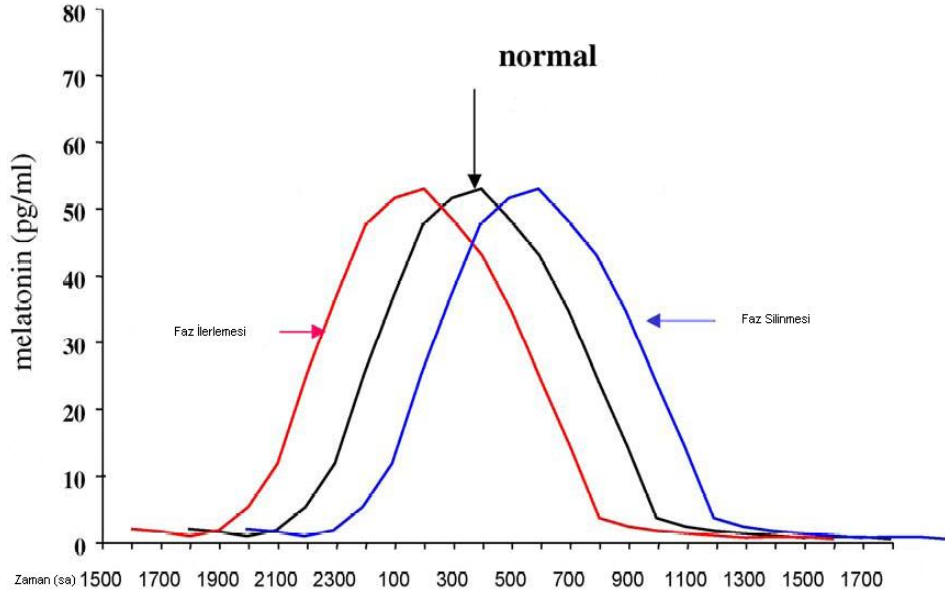


Şekil 5: Sirkadiyen saatin düzenlenmesi ve fizyolojik etkileri (9).

SCN’da yaklaşık 20.000 ila 100.000 arasında hücre bulundurulur. SCN’un hedef organı pineal bezdir. Ana medyatör hormonu pineal bezden salgılanan melatonindir. Deneysel SCN lezyonu sirkadiyen ritmi devre dışı bırakmaktadır. Lokomotor aktivite, yeme içme, vücut ısısı, uyku uyanıklık düzeni, kortizol, melatonin ve büyüme hormonu sekresyonu düzeni kaybolur. Bir istisna olarak yenidoğan ratlara uygulanan SCN lezyonunda, nükleusun fonksiyonunu beynin diğer bölümleri üstlenmiş, fizyolojik ve hormonal sirkülasyon değişmemiş olarak bulunmuştur (1). Aynı zamanda SCN’da lezyon oluşturulan ratlara fetal SCN transplantasyonu sonrasında ritmin restore edildiği gözlenmiştir (1). SCN anatomik olarak iki bölüm altında incelenebilir. Birinci bölüm kabuk olarak adlandırılan kısımdır. Önbeyin, beyin sapı ve talamus ile ilişkili nöronları mevcuttur. Kor denilen 2. bölüm ise direkt olarak retinohipotalamik traktusla (RHT) ve indirekt olarak da intergenikulat yaprakla ilişkilidir. Kor kısmı ventrolateral ve dorsomedial olmak üzere 2 bölüm altında incelenebilir.

2.4. Shift Work

Shift Work, aydınlık karanlık siklus değişikliği neticesinde olan uykusuzluk, huzursuzluk, gastrointestinal problemler, hipertansiyon gibi bulguların eşlik ettiği bir sendromdur.



Şekil 6: Faz ilerlemesi ve faz silinmesinde melatonin düzeyi (45).

Akşam erken saatlerde uyuma ve sabah erken saatlerde uyanma ile seyreden ritim bozukluğuna faz ilerlemesi denilmektedir. Bu bozuklukta melatonin serumda erken yükselmekte ve erken azalmaktadır. Gece geç saatlerde uyumak ve sabah uykusunu almamış şekilde uyanma ile seyreden, ritim bozukluğuna ise faz silinmesi denilmektedir. Bu bozuklukta ise serumda melatonin geç yükselmekte ve geç azalmaktadır. Faz kaymalarının etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte yaş ilerledikçe daha fazla görülmektedir. Bu bozuklukların her ikisi de melatonin ile tedavi edilebilmektedir (46). Shift lag ve shift workte de benzer melatonin düzeyleri ve benzer fizyolojik etkiler görülmektedir.

Shift work çalışanlarında koroner kalp hastalıkları (11), diyabet hastalığı (12), meme kanseri görülme riski (Schernhammer et al., 2001, 2006), kolorektal kanser insidansı (13) artmış olarak bulunmuştur. Fakat (Fujino et al., 2006) shift work

çalışanlarında iskemik kalp hastalıkları insidansında artış saptamakla birlikte sabit gece çalışanlarında artış saptanmamıştır(14). Buna rağmen (Chen et al., 2006) ın vardiyalı çalışan hemşirelerde yaptığı çalışmada parkinson hastalığını azalmış olarak tespit edilmiştir (15).

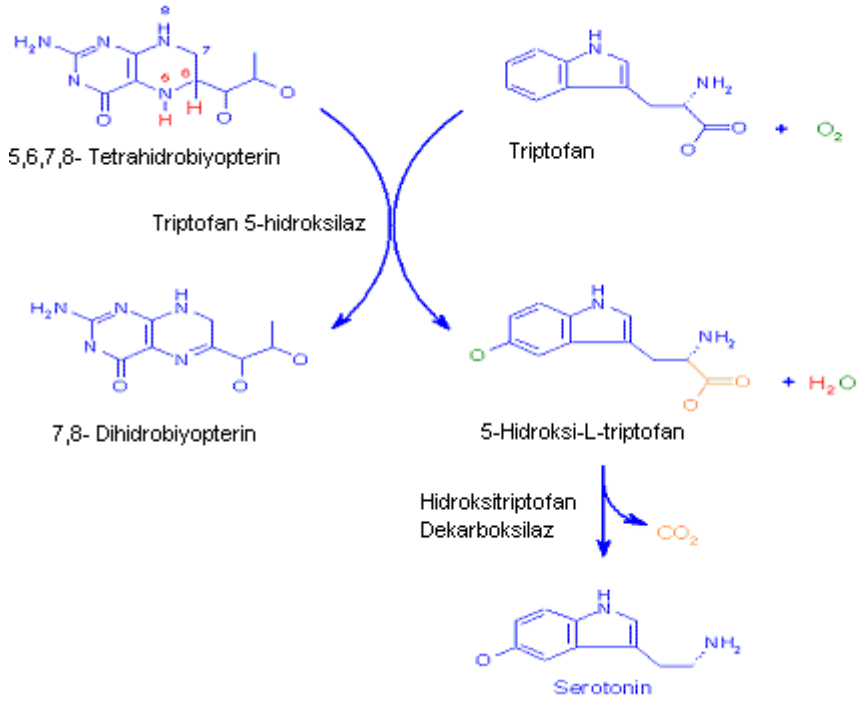
2.5. Sirkadiyen Ritim ve Bağışıklık Sistemi

Serbest oksijen (ROS) ve nitrojen radikallerinin (RNS), hücrel metabolizma regülasyonu, gen ekspresyonu ve moleküler yanıt üzerine önemli etkileri bulunmaktadır. Oksidatif stres defans sistemi, sirkadiyen ritmin etkisi altında ayarlanmaktadır. Günlük antioksidatif defans sistemini oluşturan antioksidanlar ve metabolik proteinlerin sentezlenmesinde en önemli faktör, sirkadiyen saattir. Serbest radikallerin artışına neden olan ilaçların etkilerinde birçok çalışmada günlük ritmik farklılıklar bulunmuştur. Chloroform (31), acetaminophen (32) ve cisplatin (33), BMAL1 başta olmak üzere diğer sirkadiyen proteinler direkt olarak hücre içi serbest radikal oranlarına etki etmektedirler.

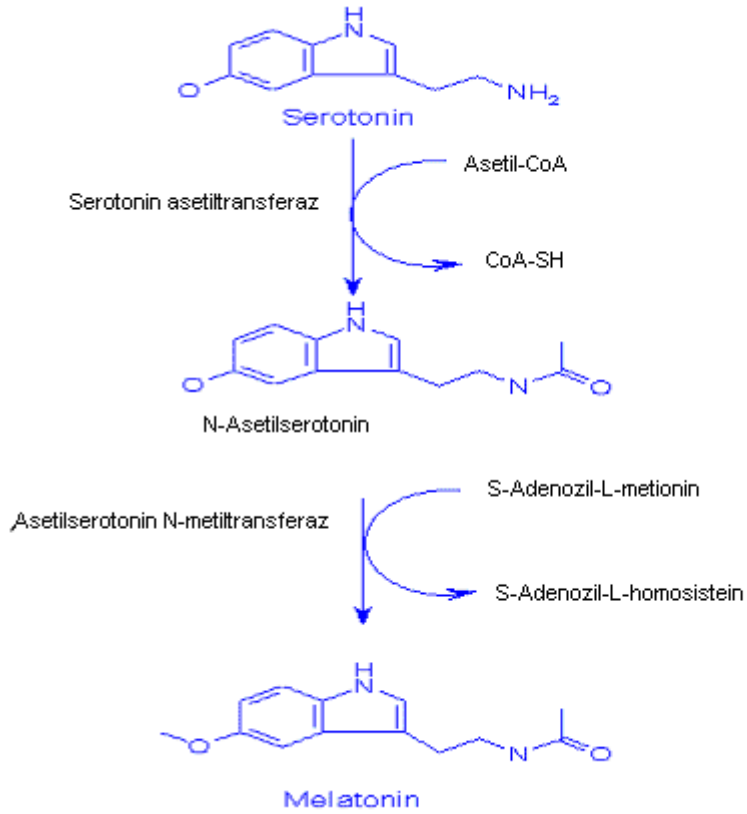
ROS ve RNS, vasküler tonus regülasyonu, ventilasyon kontrolü, inflamatuvar cevap gibi birçok fizyolojik mekanizmada kilit rol oynamaktadır (30). İnsanlarda vücut sıcaklığı, uyku uyanıklık siklusu, hormon seviyeleri yaşla birlikte değişiklik göstermektedir. Sirkadiyen saatin fonksiyonları memelilerde yaşla birlikte düzensizleşmektedir. Yaş ilerledikçe bağışıklık sistemi de zayıflamaktadır. Hofman (2006), bu değişikliğin sebebini SCN organizasyonu ve aktivasyonundaki değişikliğe bağlı olabileceğini söylemiştir. (34).

2.5.1. Melatonin ve bağışıklık sistemi üzerine etkileri

Melatonin karanlık hormonu olarak nitelendirilmektedir. Gece uzunluğu ile ilgili hormonal bir indikatördür. Aydınlik karanlık değişiklikleri ile ilgili bir mesajcı olarak değerlendirilebilir. Endojen saatle ilgili fizyolojik fonksiyonlara etki etmektedir. Dolaşımdaki triptofan aktif transport ile hücre içine alındıktan sonra iki basamakla serotonin sentezlenir.



Şekil 7: Serotonin sentezi.

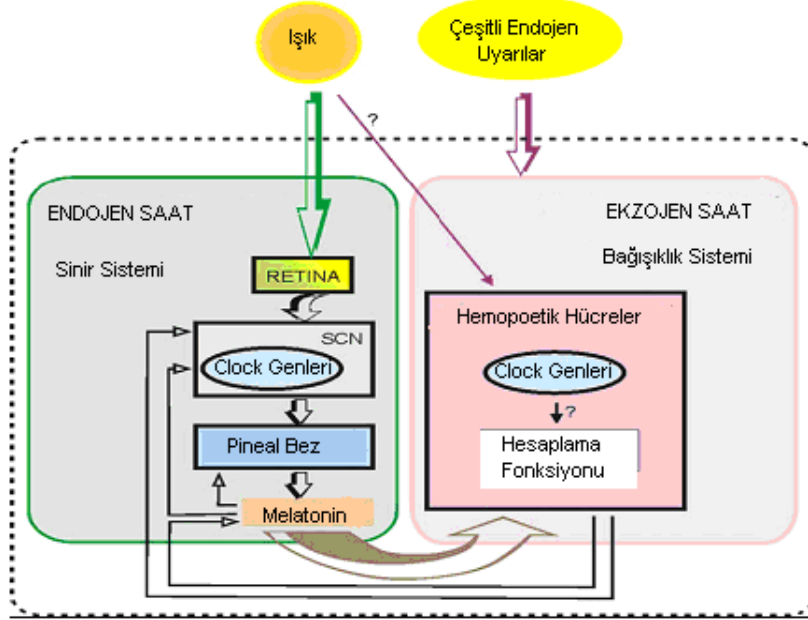


Şekil 8: Melatonin sentezi.

Triptofandan ML, hidroksilasyon, dekarboksilasyon, N-asetilasyon ve O-metilasyon ile 4 basamakla sentezlenir. Hidroksilasyon ve dekarboksilasyon ile Serotonin sentezlenir. Serotonin ise, serotonin asetiltransferaz ile N-asetilserotonine çevrilir. Asetilserotonin N-metiltransferaz ile de melatonine çevrilir (16). Sentezin kontrolünde hız sınırlayıcı basamak, N-asetiltransferaz reaksiyonudur. ML bir metoksiindoldür. Lipofilik özelliğine rağmen pek çok etkisini membran reseptörleri aracılığıyla gösterir. Melatonin, MT1, MT2 ve MT3 olarak adlandırılan reseptörlere bağlanarak, adenilat siklaz ve /veya polifosfoinozidid yolunu uyarır. Ayrıca melatoninin sitozolik ve nükleer bağlanma bölgeleri de tanımlanmıştır. Hücre membranını ve kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmektedir. Tükürükte plazmadan daha az konsantrasyonda olmasına rağmen paralel seviyelerde bulunur ve karşılaştırılabilir. Ana metaboliti, 6-sulfatoksimeletonindir. İndol halkasının hidroksillenmesi sonucu oluşur ve idrarla atılır. Serum 6-sulfatoksimeletonin seviyesi, melatonin seviyesi ile orantılıdır. ML maksimum plazma konsantrasyonuna gece 03:00-04:00 sıralarında ulaşmaktadır. Gün boyunca çok düşük seviyelerde devam eder. Farmakolojik olarak gece ML sentezinin baskılanması ve gündüz ML seviyesinin arttırılması, gece vardiyalı çalışanlardaki gibi sirkadiyen ritim bozukluğuna neden olmaktadır (17). Gece yüksek ML seviyesi, vasküler ML reseptör sitümlasyonu sonucu oluşan vazodilatasyon ile gece vücut ısısı regülasyonuna katkıda bulunmaktadır (18). Yenidoğanlarda melatoninin sirkadiyen ritmik salgılanması 3-4 haftalık süre almaktadır (19). ML sentez regülasyonunun ana nörotransmitteri norepinefrindir. Norepinefrin, SCN sinyali ile pineal bezden salgılanmasını etkilemektedir (20). Beta 1 adrenerjik reseptör blokörleri atenolol ve propranolol, melatonin sentezini inhibe etmektedirler (21). Alfa 2 adrenerjik reseptör blokörü olan klonidin de serum melatonin seviyesini azaltmaktadır. Sodyum valproat ile gama amino bütirik asit (GABA) -ergik tonusun yükseltilmesi ve benzodiazepinler ile GABA reseptör aktivasyonu da serum melatonin seviyesini azaltmaktadır. Fakat melatonin seviyesi, sempatik katekolamin seviyelerini arttıran monoaminooksidaz (MAO) inhibitörleri ve trisiklik antidepresanlar ile arttırılabilir.

Melatonin, T helper hücre modülasyonu, natural killer (NK) aktivitesi, timus selülaritesi, lökosit ve lenfosit sayıları, interlökin (İL)-2, İL-6, İL-12 ve IFN- γ üretimi gibi bağışıklık sistemi üzerinde de çok önemli etkileri bulunmaktadır. İmmun

hücrelerinin programlanmış hücre ölümünü inhibe eder. Pineal melatonin sentezinin propranolol ile inhibisyonu bağışıklık supresyonuna neden olmaktadır (22).

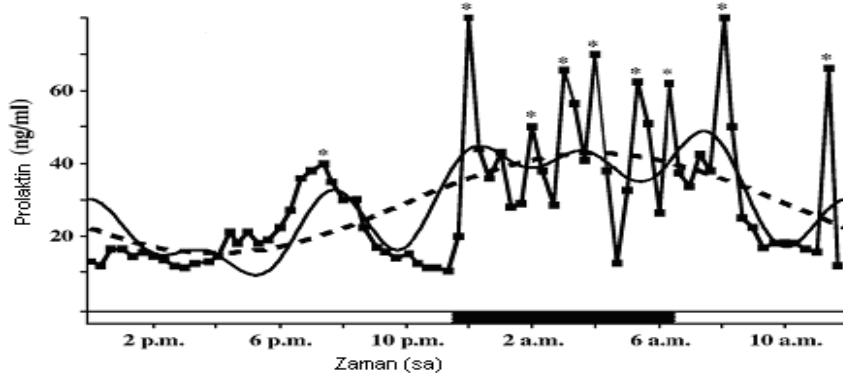


Şekil 9: Melatoninin iki saat modeli ile regülasyonu (16).

Melatonin, pineal bezden SCN kontrolünde sentezlenir. SCN’da melatonin reseptörleri bulunmuştur. Pineal bez ile SCN arasında negatif feed-back mekanizması bulunmaktadır. Bu kontrol ‘endojen-nöral clock’ olarak isimlendirmiştir. Bağışıklık sistemi ve sirkadiyen ritim yakın ilişki içerisindedir. Sitokinler kan beyin bariyerini geçerek talamus ve SCN’a, rahatlıkla ulaşmaktadır. Buradaki reseptörleri etkileyerek fizyolojik cevaplara neden olmaktadırlar. Bağışıklık sistemi hem diüurnal ritimden etkilenmekte hem de etkilemektedir. Sirkadiyen ritmi endojen ve ekzojen clock olarak iki ayrı bölümde değerlendiren Berger (2008), sirkadiyen sistem ve dolayısı ile serum melatonin düzeyi regülasyonunu iki saat modeli şeklinde tanımlamıştır. Sirkadiyen sistem düzenlenmesinde diğer ana sistem ise bağışıklık sistemi ile düzenlenmesidir. Berger (2008), sirkadiyen ritim ile bağışıklık sistemi arasındaki ilişkiyi şu şekilde değerlendirmiştir. Bağışıklık sistemi elemanları SCN fonksiyonu üzerinde regülatuar özelliğe sahiptir. SCN ventrolateral bölümünde gama interferon reseptörleri tespit edilmiştir. Berger (2008) bu ilişkiyi de ‘ekzojen-immün Clock’ olarak isimlendirmiştir (16). Bu ilişki şekil 9 da gösterilmiştir.

2.5.2. Prolaktin ve bağışıklık sistemi üzerine etkileri

Prolaktin (PRL), başlıca ön hipofizin laktotrofik hücreleri tarafından sentezlenen, 199 amino asitten oluşmuş ve 23-kDa ağırlığında, polipeptid yapıda bir hormondur. PRL'i sentezleyen gen, 6. kromozomun kısa kolunda yer alır. PRL'in genel olarak laktojenik ve mammotrofik etkilerinin üzerinde durulmasına karşın, 1930 yılından itibaren bağışıklık sistemi üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir. PRL üretimi ve salınımı, hipotalamusa ait peptitler olan tiroid releasing hormon (TRH) ve vazoaaktif intestinal peptit (VIP) ile uyarılır. Hipotiroidi ile artan TRH, hiperprolaktinemiye neden olabilir. PRL, başlıca hipotalamustan salgılanan dopamin ile inhibe olur. PRL, pulsatil, epizodik hormon sekresyon paterni ile salgılanmaktadır. Günlük serum PRL seviyesi şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10: Genç bayanlarda prolaktinin diurnal ve pulsatil salınımı. Siyah bar uyku zamanını göstermektedir (6).

Normal sekresyon paterni her 2-3 saatte bir pulse şeklindedir. En fazla sekresyon hızlı göz hareketlerinin bulunduğu REM uykusu dönemlerindedir. REM uykusu gece uykusunun ikinci yarısında daha fazla görülmektedir. Prolaktin seviyesinde gecenin ikinci yarısında yüksek seviyelere ulaşmaktadır (23). Sabah erken saatlerde tekrar tepe yapmaktadır. Erkeklerde, gebeliği ve laktasyonu bulunmayan kadınlarda prolaktin seviyesinin primer düzenleyicisi REM uykusudur. Prolaktin infüzyonu, REM uykusu aktivitesini arttırmaktadır. Bunu Roky ve ark.(1995) elektroensefalogram ile göstermişlerdir. (24).

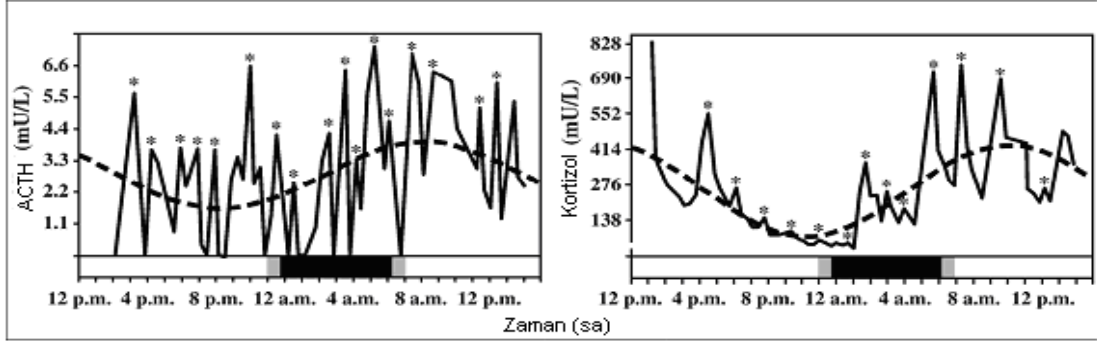
PRL'nin bağımsıklık sistemi üzerine regülatör etkileri bulunmaktadır. T hücre çoğalması protein kinaz C ve ornitin dekarboksilaz aktivasyonu, İL-2 ile birlikte mitojenik aktivite, İL-2 reseptör ekspresyonunda artış, interferon düzenleyici faktör 1 (İRF-1) aracılığı ile İFN- γ üretiminde artış, antikor üretimini uyarma gibi fonksiyonları bulunmaktadır.

Kemik iliği, dalak, timus gibi hemopoetik ve lenfopoetik organlarda PRL reseptörleri bulunmaktadır. Gala (1991) hipofizektomili hayvanlarda PRL verilmesinin, hipofizektominin neden olduğu bağımsıklık yetmezliğini restore ettiğini söylemiştir (25). Ayrıca bromokriptin ile prolaktin sekresyon inhibisyonu bağımsıklığın baskılanmasına neden olmaktadır (26). Glukokortikoidlerin bağımsıklığı baskılayıcı etkilerini antagonize etmektedir (27). İnsan bağımsıklık aktivitesi üzerinde ve lupus eritematozis, postpartum dönemde romatoid artrit alevlenmesini içeren bağımsıklık sistemi hastalıklarında PRL'in etkili olduğu rapor edilmiştir (28). Hiperprolaktineminin bağımsıklık sistemi üzerine etkisi yoktur. PRL'in sirkadiyen ritme bağı pulsatil salınımı bağımsıklık sistemi üzerinde etkilidir. Yaşlılarda, serum PRL seviyesi düşmektedir. Aynı zaman da sirkadiyen ritimle pulsatil salınımına duyarlılığı azalmaktadır. Bu yüzden özellikle yaşlılarda transmeridyenel uçuşlarda, vardiyalı çalışanlarda görülen sirkadiyen ritim bozukluğu ve uyku bozukluğu, bağımsıklık disfonksiyonu ile ilişkili olabilir (6).

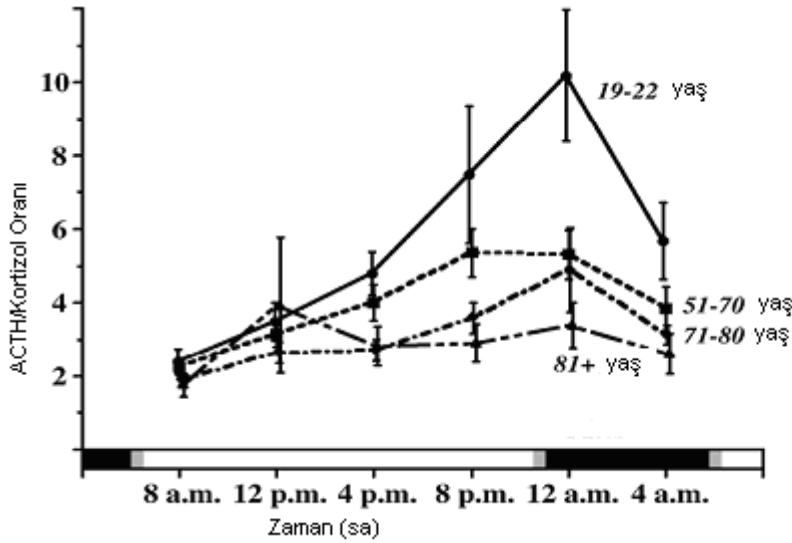
2.5.3. Kortizol ve bağımsıklık sistemi üzerine etkileri

Kortizol, ACTH, kortikotropin salıverici hormon (CRH) sentez ve salınımı kortikotropik aks olarak isimlendirilir. CRH ve ACTH kontrolünde adrenal kortekste, zona fasikülatada sentezlenir. Sitokrom P450 enzimatik zinciri ile kolesterolden sentezlenen 19 karbon atomuna sahip bir hormondur. Serumda çoğunlukla albumin ve kortizol bağlayıcı globulin (CBG) bağı olarak bulunur. Aktif kolesterol serbest olarak bulunan bölümdür ve total kolesterolün %5-10'unu oluşturur. Yarılanma ömrü kısadır. Kortizol sentezinin ana uyaran hormonu ACTH'dır. ACTH salgısı CRH ve arjinin vazopressin (AVP) sitümüstasyonu ile gerçekleşir. CRH güçlü, AVP zayıf etkiye sahiptir. CRH ve AVP hipotalamustan salgılanmaktadır. ACTH ise anterior hipofizde üretilmektedir. Glukokortikoidler, ACTH üretimini CRH ve AVP sentezini

inhibe ederek azaltmaktadır. CRH, ACTH, kortizolün sentez ve salınımı diurnal ve pulsatil özelliğe sahiptir. Sabah 06:00-08:00 saatleri arasında tepe yapmaktadır (29). Akşam ve gece erken saatlerde ise düşük amplitütlü seyretmektedir. ACTH ve kortizol yirmi dakika aralıklarla pulsatil salgılanmaktadır. Multisistemik çok önemli etkileri bulunmaktadır.



Şekil 11: ACTH ve kortizolün diurnal ve pulsatil salınımı (6).



Şekil 12: ACTH/Kortizol oranının yaş ile ilişkisi (6).

Serum ACTH ve kortizol seviyeleri kıyaslandığında genç ve erişkinlerde yaşlılara oranla ACTH seviyelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kortizol yaşamsal öneme sahip bir hormondur. Salgılanması esas olarak ACTH tarafından kontrol edilir. Sentezi kolesterol üzerinden 4 basamakta yapılır. Serbest kolesterol, Pregnonolon, Progesteron ve hidroksilasyonla kortizol oluşumu gerçekleşir.

Kullanılan enzimler Sitokrom P450 enzimleridir ve ortamda NADPH ve oksijen bulunması gerekmektedir. Kortizolün biyosentez hızı ve plazma düzeyi gün içi ritim gösterir. CRH ve ACTH' nin bazal salgılanma hızının gün içi ritim göstermesi ile ilişkilidir. Esas olarak KC' de metabolize edilmektedir. Az bir kısmı diğer dokularda da metabolize edilmekte ve bir miktarı da serbest kortizol olarak böbreklerden atılmaktadır. Kortizolün genel etkileri aşağıda sıralanmıştır.

- 1- Glikojenoliz ve glikoneogenez artar. Periferik insülin rezistansını arttırarak periferik dokuların glikoz alımını inhibe eder.
- 2- Karaciğer dışında protein yapımını azaltır, yıkımını arttırır. Karaciğere ise aminoasitlerin girişini kolaylaştırır. Karaciğere giren bu aminoasitler glikoneogenez ve protein yapımında kullanılır.
- 3- Yağ depolarından yağ asitlerini mobilize eder. Yağ hücrelerinin glikoz alımını inhibe eder.
- 4- Yüksek dozlarda, lökosit diapedezini azaltarak iltihabı bloke eder.
- 5- Eosinofil, lenfosit sayısını azaltırken eritrosit sayısını arttırır. Lenfoid dokuda atrofiye neden olup, immunoglobulin miktarını azaltır.
- 6- Histamin miktarını azaltır.
- 7- Kardiovasküler sistem: Kan basıncını arttırır. Bu etkisini damarların adrenaline duyarlılığını ve karaciğerde anjiyotensin yapımını arttırarak gösterir.
- 8- Gastrointestinal sistem: Hipersekresyon, hiperasidite oluşur.
- 9- Mental aktiviteyi arttırır.
- 10-Osteoblastik aktiviteyi inhibe, osteoklastik aktiviteyi aktive eder. İntestinal sistemden Ca emilimini azaltır. Ca üriner sekresyonunu arttırır, reabzorbsiyonunu azaltır.

Bağışılık hücrelerinde glukokortikoidlere yüksek afinitesi bulunan reseptörler bulunmaktadır. Glukokortikoidlerin suprafizyolojik dozlarda anti inflamatuvar etkileri bulunmaktadır (29). Anti inflamatuvar etkilerini lenfositler, monositler, makrofajlar, eozinofiller, nötrofiller, mast hücreleri, bazofiller üzerinden gerçekleştirir.

2.6. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi ile ilgili ilk önemli tanımlamalar Hamurabi zamanına kadar uzanmaktadır. Sümerler zamanında, sıcak su ve bira uygulaması şeklinde erken yara bakımı tarif edilmiştir. Enfeksiyon, hemostaz ve nekrotik doku kontrolü bakımından önemli bilgiler elde edilmesi nedeniyle 19. yüzyılda yara iyileşmesi ve bakımı çağ atlamıştır. Sitokinlerin ve büyüme faktörünün 1950' lerde bulunması ile yeni bir çağ açılmıştır (38). Yara iyileşmesi birçok sistemin birlikte ve birbirleri ile yakın ilişkide olarak düzenlenmiş olan kompleks bir süreçtir. Yara iyileşmesi yaranın olduğu andan itibaren başlayan aktif dinamik bir süreçtir. Aslında iyileşme evreleri birbirinin içine geçmiş, karmaşık bir takım etkiler ile birbirini izleyen sınırlarını tam olarak çizmenin mümkün olmadığı bir süreçtir (39). Dört ana bölümde incelenir.

- 1- Hemostaz
- 2- İnflamasyon
- 3- Proliferasyon
- 4- Matürasyon

Yaralanmanın hemen sonrasında akut inflamasyon oluşmaktadır. İnflamasyon fazı, trombosit agregasyonu ve akabinde yara bölgesine lökositlerin infiltre olması ile başlar. Proliferasyon fazı epitel hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlar sayesinde epitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşumu aşamasıdır. Remodeling fazı ise fibroblastlar tarafında ekstraselüler matriksin matürasyon aşamasıdır. Zayıf olan kollajen yıkılır ve yerine kuvvetli kollajen sentezlenir. Sonuçta yara ayrışmasına karşı mukavemeti olan skar dokusu meydana gelir.

2.6.1. Hemostaz ve inflamasyon

Hasarlanmış damar ve lenfatiklerden oluşan kanamaya yanıt olarak katekolamin salınımı ve vazokonstriksiyon ile başlar. Subendotelyal kollajen trombositlere maruz kalır. Bu durum trombosit agregasyonu ile sonuçlanır. Trombositler, primer tıkaç oluşturarak hemostaz kaskatını aktifleştirir. Fibrin bariyer meydana gelir. Ayrıca inflamatuvar hücre ve fibroblast göçü için uygun zemin

hazırlanır. Yetersiz pıhtı oluşumu, faktör XIII (fibrin stabilize edici faktör) yetersizliğinde gözlenir.

Kollajen ve trombositler arasındaki temas hem trombin hem de fibronektin ve fragmanlarının varlığında trombosit alfa-granüllerden trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), trombosit aktive edici faktör (PAF), fibronektin ve serotonin serbestleşmesi ile sonuçlanır

Yara yerine ulaşan ilk hücreler nötrofillerdir. Kompleman faktörleri, İL-1, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), TGF- β , platelet faktör 4 ve prostaglandinlerin yarattığı inflamasyon ve vasküler geçirgenliğin de artışı ile nötrofil göçü uyarılır. Endotelial hücre yüzey reseptörleri olan selektin ve nötrofil yüzey reseptörleri olan integrinlerin, ekstraselüler matriks oluşumuna önemli katkıları vardır. Kemotaktik etki sonucu yara bölgesindeki hücreler aktifleşerek lokal mediatörler tarafından indüklenen çeşitli biyokimyasal, hücreyel ve fonksiyonel özellikler gösterirler. Aktivasyon yeni hücre yüzey antijen oluşumunu indükler, sitotoksiteyi, sitokin oluşumunu ve salınımını artırır.

2.6.2. Proliferasyon

Yaralanmadan sonra 1. gün başlar, maksimum 14. günde sonlanır. Fibroblastlar ve endotel hücreleri bu fazdaki primer hücrelerdir. Fibroblastlar yara çevresindeki dokudan göç ederler. Endotel hücreleri de yara yakınındaki venüllerden proliferer olur ve anjiyogenez olayı için de yeni kapillerler oluşturur. Esas olarak aktif makrofajlar ve trombositlerden salınan büyüme faktörleri ve sitokinler, bu iki hücre tipinin proliferasyonunu üstlenir. Mezenkimal hücreler, otokrin mekanizma ile büyüme faktörleri ve sitokinlerin serbestleşmesine neden olabilirler. Çevre dokulardaki fibroblastlar, PDGF ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi kemotaktik ajanlarla hem göç ederler, hem de replikasyon için uyarılırlar. Yaralanmadan birkaç gün sonra epitelyal proliferasyon başlar, yara kenarlarından ve hasara uğramayan epitelyal adacıklardan yara içerisine doğru ilerler. Eksizyonel yaralarda epitel hücre proliferasyonu hem sıvı kaybını önlemek hem de enfeksiyonlara bariyer teşkil etmek üzere yara kenarlarından itibaren ilerleyerek yarayı kapatır.

Yara iyileşmesinde doku devamlılığı, granülasyon dokusu ve yumuşak bağ dokusu matriks ile sağlanır. Bu matriksi oluşturan ekstraselüler makromoleküler; ara madde kollajen, retikülin, elastin ve proteoglikanlardan oluşur. Kollajen fibriller, aksial ve lateral monomer topluluklardır. Monomer, fibroblastların irregüler endoplazmik retikulumundaki ribozomlarda mevcut m-RNA özelliklerine göre sentez edilen ve pro-alfa zinciri denilen, lineer polipeptit zincirdir.

2.6.3. Matürasyon

Matürasyon (remodeling) fazı yara iyileşmesinin son fazıdır. Klinik bir görüşe göre bu, yara iyileşmesinin en önemli fazıdır. Çünkü nispeten skarın dayanıklılığını matriks birikiminin toplam miktarı belirler (41).

Yara matriksi yapısındaki değişimler mutlaka şu paternleri izler: Başlangıç olarak hemostaz ve makrofajlardan kaynaklanan fibrin ve fibronektin oluşur. Diğer bir özel protein olan trombospondin I, yara çevresine hücrel birikimi destekler. Daha sonra glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve buna benzer diğer proteinler sentezlenir. Bunlar da ileride matriks depozisyonunu ve yeni model oluşumunu destekler. Daha sonra kollajenler giderek baskın skar proteini haline gelir. Sağlam dermisi dominant şekilde kollajen I (% 80-90) ve kollajen III (% 10-20) oluşturur. Granülasyon dokusunda tip III kollajen artmıştır (% 30), oysa olgun skar dokusunda tip III kollajen oranı daha düşüktür (%10). Yaralanma sonrası net kollajen sentezi en az 4-5 hafta sürer. Fibroblastlar kollajen sentezinin esas hücreleridir. Kollajen sentezi sırasında hücre sayısındaki artışın yanında, hücre başına kollajen üretiminde de net artış görülür. Normal dermiste lifler örülmüş sepet gibi iç içe girerken, skar dokusunda daha zayıf olan kollajen lifleri cilde paralel dizilir. Liflerin kalınlığı ile gerilim kuvveti uyumu arasında pozitif bir ilişki vardır. Biyokimyasal olarak granülasyon dokusundaki kollajenle sağlam derideki farklıdır.

Yeni model oluşumu fazı bir yıldan fazla sürmesine rağmen, iyi bir skar dokusundaki kollajen lifleri asla sağlam dermisteki kadar organize olamaz. Skarın dayanma gücü normal derinin gücüne hiç bir zaman eşit olamaz. Yarada bir hafta sonraki dayanıklılık gücü sadece % 3 iken, 3 hafta sonra bu oran % 20'dir. 3 ay sonra

yaklaşık olarak sağlam dokunun % 80'ine ulaşır, ancak bu oran daha fazla yükselmez (40).

Yara kontraksiyonu ise skar dokusunun kendisini küçültmesi sonucu ortaya çıkar. Bundan myofibroblastlar sorumlu tutulmaktadır. Myofibroblastlar, 6. günde ortaya çıkan ve dört hafta sonra tamamen kaybolan, düz kas lifleri taşıyan hücrelerdir. Bu hücreler, hücreden zengin granülasyon dokusunu hücreden fakir skar dokusuna çevirir. Dört hafta sonunda ise hücrelerin apoptosise uğradığı sanılmaktadır (40).

2.7. İntestinal yara iyileşmesi

İntestinal mukozal epitel her 8 günde bir kendini yenilemektedir. Mukoza altında bulunan lamina propria tip I, tip III, tip IV kollajen ve elastin ile oluşmuştur ve çeşitli inflamatuvar hücreleri içerir. Muskularis mukoza motiliteyi sağlayan düz kas hücrelerinden oluşmuştur. Muskularis propria ise düz kas hücreleri yanında tip I ve tip III, az miktarda da tip V kollajenden oluşan bir tabakadır. Bu kollajen yapısı barsağın dayanıklılığını sağlar. En dışta ise sağlam bir serozal tabaka bağırsağı sarar (41).

İntestinal anastomozlarda iyileşmenin mukozal komponenti epitel hücrelerinin hiperplaziye uğrayıp migrasyonu ile yara skar dokusunun üstünü kapamasıyla ortaya çıkar. Granülasyon dokusu yaranın üstünü örter, boşlukları doldurur ve lüminal içerik için bir bariyer oluşturur. Barsak duvarı tabakaları karşılıklı olarak birleştiğinde bile boşlukların doldurulması en az 3 gün sürer.

Barsak iyileşmesi sırasında submukozada fibroblastlar ve düz kas hücreleri kollajen üretirler. Bu dönemde İL- 1 düz kas hücrelerinin proliferasyonunu sağlar. Proliferatif fazda ortaya çıkan bu olayla, kollajen bir yandan yapılırken bir yandan da lizise uğrar. Erken dönemde yıkım ön plandayken, ortaya çıkan bir diğer sitokin olan TGF- β göç eden hücreleri kollajen üretmeleri için uyarır. Postoperatif 3-4. günlerde intestinal yara kenarlarındaki güçsüzlük kollajenaz aktivitesine bağlıdır.

Anastomoz sağlamlığını barsaklarda submukoza sağlar. Kollajenin burada yoğunlaştığını düşünürsek yapısal bütünlük, intralüminal basınca karşı sağlamlık submukozada sağlanır. Submukozada tip I kollajen % 68 oranla bulunur ve bunu %

20 ile tip III ve % 12 ile de tip V izlemektedir. İyileşmenin erken döneminde kollajen yıkımı etkindir. Postoperatif 4. güne dek kollajen sentezi yavaş yavaş artar. Postoperatif 7. günde ise kollajen sentezi yıkıma karşı net bir galibiyet elde eder (42).

Tablo 1: Yara iyileşmesini olumsuz olarak etkileyen faktörler (43).

<u>Lokal etkenler</u>	<u>Sistemik etkenler</u>
Dolaşımın bozuk olması	Malnutrisyon
Anastomozda gerginlik	Sepsis, enfeksiyon
Yara dudaklarının sağlığı	Hipovolemi
Bakteriyel kontaminasyon, enfeksiyon	İlaçlar (kemoterapi, steroid vs.)
Distal obstrüksiyon	İmmün yetmezlikler
Radyasyon hasarı	Kan transfüzyonu
Barsakların mekanik kirliliği	Üremi, sarılık
Hipertermi	Yaş

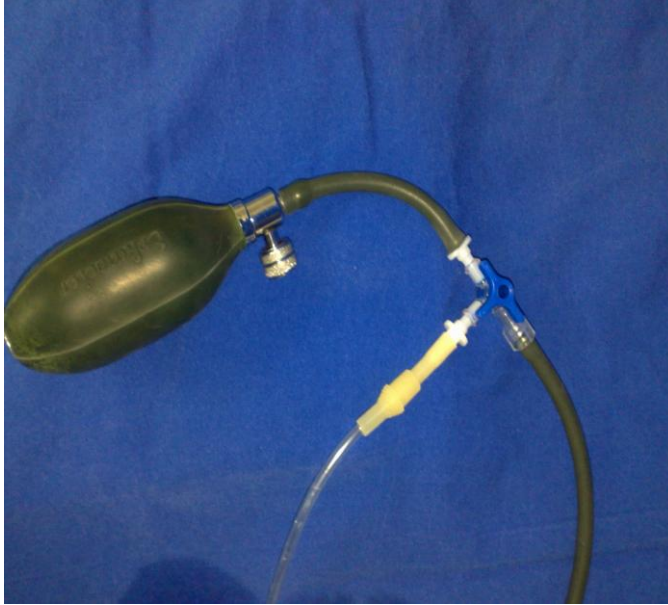
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneysel Yöntem

Çalışmada yaklaşık 200- 300 gr ağırlığında erkek sıçanlar kullanıldı. Yeme içmeleri serbest bırakıldı. Hayvanların buldukları odalar 300 lux gücünde floresan lamba ile aydınlatıldı. Lambalar elektronik bir zamanlayıcıya bağlı olarak çalıştırıldı. Oda sıcaklığı 22-22 °C ve nemi % 55-70 olacak şekilde sabit tutuldu. Hayvanlar rastgele seçilerek, her grupta hayvan sayısı 15 olacak şekilde 3 grubu oluşturuldu.

1. Sirkadiyen ritmi bozulmamış sham kontrol grubu
2. Sirkadiyen ritmi bozulmamış kontrol grubu
3. Sirkadiyen ritmi, aydınlık karanlık döngüsü değiştirilerek bozulmuş deney grubu

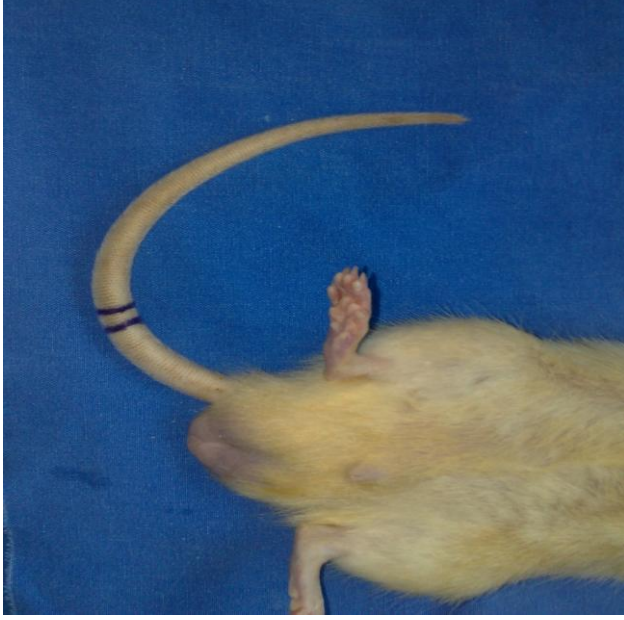
Sfigmomanometrenin barometre kısmına, üçlü musluk ile serbest çıkış verilecek şekilde barsak anastomoz basıncını ölçmek için düzenek hazırlandı.



Şekil 13: Barsak basınç kuvveti ölçümü için hazırlanan manşon basınç düzeneği.

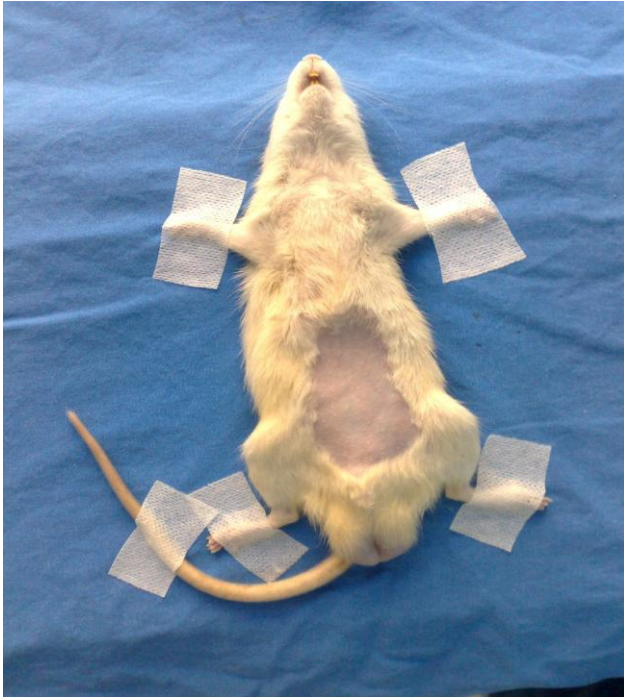
Kontrol grubu olarak 15 rat rastgele alındı. Yeme içmeleri serbest tutuldu. Standart sıçan yemi ve musluk suyu verildi. AK 12/12 siklusunda 2 hafta tutuldu. Sirkadiyen ritimleri normal olarak kabul edildi. İki haftalık periyod sonrasında preop

gece aç bırakıldı. Ketamin (50 mg/kg-ip) ve xylazine (12 mg/kg-ip) anestezisi uygulandı. Kuyruklarından marker kalem ile işaretlenerek numaralandı.



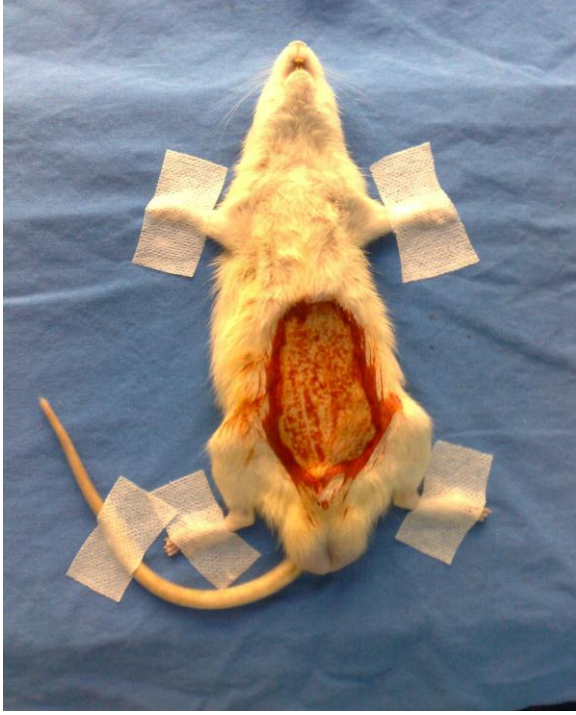
Şekil 14: Ratların numaralandırılması.

Preoperatif ağırlıkları ölçülerek not edildi. Tıraş bıcağı ile karın tıraşı yapıldı. Operasyon için operasyon masasına flaster ile tespit edildi.



Şekil 15: Ratların ameliyat masasına tespiti.

Batikon ile cilt antisepsisi sađlandı.



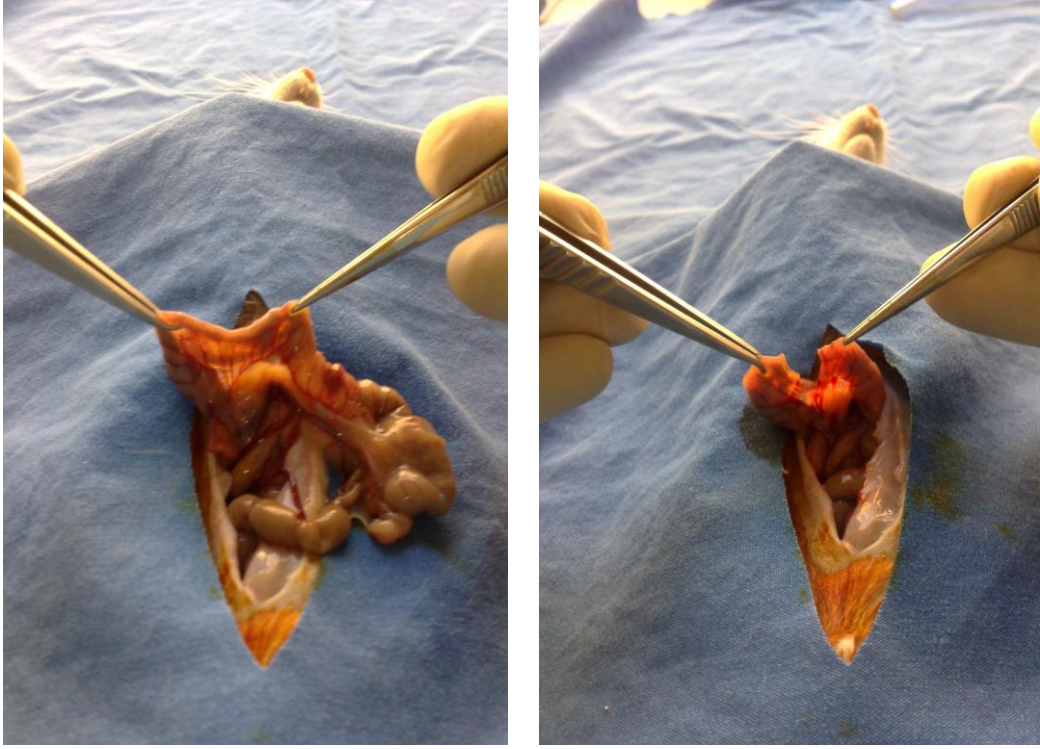
Şekil 16: Antisepsi sağlanması.

Steril örtü ile örtüldükten sonra cilt orta hattın açıldı. Fasya, linea albadan açılarak median laparotomi yapıldı.



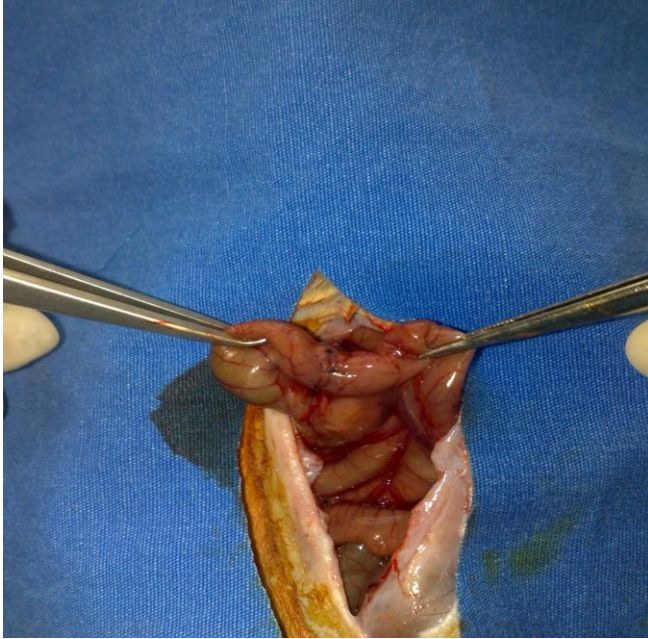
Şekil 17: Ratların steril örtü ile örtülmesi.

İleoçekal valvde yaklaşık 5 cm distalden kolon tam kat kesildi.



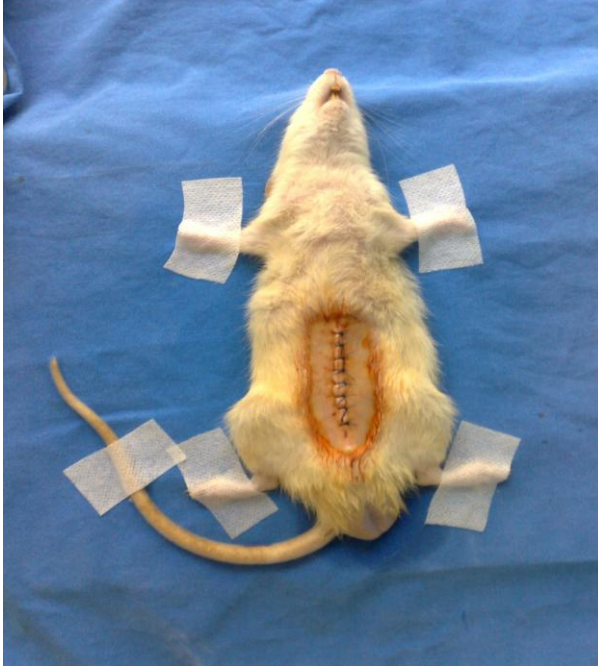
Şekil 18: Kolon diseksiyonu.

6/0 prolon ile tek kat 6 ila 8 sütünerek anastomoz edildi.



Şekil 19: Kolon anastomozu.

Normal anatomik plana uygun şekilde yerleřtirildikten sonra cilt ve fascia 3/0 prolen ile tek kat, tek tek suture edildi.



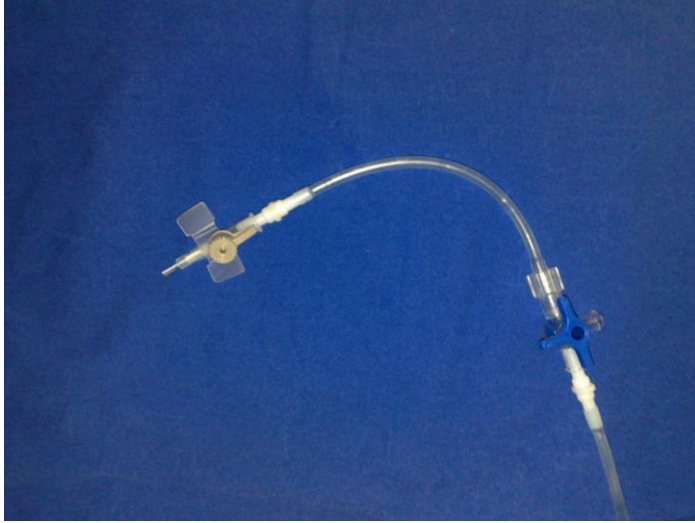
Şekil 20: Karın kapatılması.

Operasyon sonrasında yeme ieme serbest bırakıldı. AK 12/12 siklusuna devam edildi. Postoperatif 7 gn sonra, preop gece a bırakıldıktan sonra tekrar ketamin (50 mg/kg-ip) ve xylazine (12 mg/kg-ip) anestezisi uygulandı. Postoperatif ağırlıkları llerek not edildi. Median laparotomi ve torakatomi uygulandı. İnrakardiyak sağ ventriklden 4 cc kan alındı.



Şekil 21: Kan alma işlemi.

Sağ ventrikül içerisine kateter yerleştirildi. Sol atrium kesildi. Kateterden serum fizyolojik verilerek kan sol atriumdan boşaltıldı. Yaklaşık 200 cc serum fizyolojik ile ratlar perfüze edildi. Anastomoz bölgesini içine alacak şekilde 3 cm lik kolon segmenti rezeke edildi. Çıkarılan kolonun bir ucu 3/0 ipek ile kapatıldı. Diğer ucu ise 3/0 ipek ile No: 16 anjiyokete bağlandı.



Şekil 22: Barsak basınç ölçüm düzeneği.

Barsak içerisi metilen mavisi ile dolduruldu. İçi su dolu kab içerisine konularak sfigmomanometre ile basınç uygulandı.

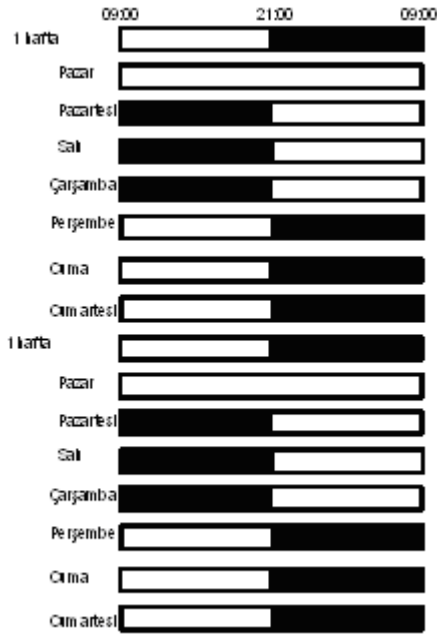


Şekil 23: Barsak anastomoz basınç kuvveti ölçümü.

Barsaktan veya anastomoz bölgesinden patlama veya metilen mavisi sızıntısı olduğu andaki basınç kaydedildi. Barsak sistemden çıkartıldı. Anastomoz bölgesinden sirküler kesilerek histolojik değerlendirme ve doku hidrokspirolin seviyesi ölçümü için doku örnekleri alındı.

Sham grubuna da rastgele 15 rat seçildi. Aynı işlemler barsak anastomozu yapılmaksızın sham grubuna da uygulandı. Barsak patlama basıncı anastomoz yapılmadığından dolayı ileoçekal valvden yaklaşık 5. cm'yi içerecek şekilde alınan 3 cm lik barsak segmentinde uygulandı. Barsak dokusunun histolojik değerlendirilmesi ve doku hidrokspirolin seviyesi çalışılması için bu segmentten normal barsak dokusu alındı.

Sirkadiyen ritmi aydınlık karanlık süre değişikliği uygulanarak bozulması planlanan çalışma grubuna da rastgele 15 rat seçildi. Bu hayvanlar, 2 haftalık normal AK 12/12 siklusunun ardından, aydınlık karanlık süreleri ayarlanabilen özel kafeslere konuldu. Sirkadiyen ritim bozukluğu oluşturulması için şekil 24'deki program, özel kafes de 2 haftalık süre ile uygulandı (35).



Şekil 24: Çalışma grubu için uygulanacak zaman çizelgesinin şematik görünümü (35).

İki haftalık periyod sonrasında kontrol grubu ile aynı cerrahi işlemler uygulandı. Preop gece aç bırakılarak operasyona alındı. İleoçekal valvde yaklaşık 5 cm distalden kolon tam kat kesildi. 6/0 prolén ile tek kat 6 ila 8 sütür konularak

anastomoz edildi. Operasyondan sonra yine özel kafeslerde aydınlık karanlık süreleri şemaya göre uygulanmaya devam edildi. Operasyon sonrasında yeme içme serbest bırakıldı. Postoperatif 7 gün sonra operasyona alınarak, intrakardiyak sağ ventrikülden 4 cc kan alındı. 200 cc serum fizyolojik ile perfüze edildi. İleoçekal bölgeden yaklaşık 5 cm distalini içine alacak şekilde yaklaşık 3 cm lik kolon segmenti rezeke edildi. Barsak anastomoz patlama basıncı ölçüldükten sonra histolojik değerlendirme ve doku hidroksiprolin seviyesi ölçümü için doku örnekleri alındı. Tüm cerrahi işlemler serum melatonin seviyesinin daha iyi değerlendirilmesi için öğleden sonra yapıldı.

3.2. Biyokimyasal Yöntem

Biyokimyasal değerlendirmede melatonin seviyesi, ELİZA yöntemi ile değerlendirildi. Sakrifikasyon sırasında ratlardan alınan kanlar santrifüj edilerek serum ayrıldı. -80 °C de dondurulmuş olarak saklandı. DRG Melatonin ELISA (EIA-1431) kiti kullanıldı. Manuel olarak çalışıldı. Sonuçlar pg/ml olarak belirtildi.

Ratlarda alınan anastomoz bölgesi doku parçası serum fizyolojik ile yıkandı ve kurulandı. Kuru doku ağırlığı hassa tartı ile tartıldı ve not edildi. Eksi 80 °C de saklandı. Anastomoz bölgesi doku hidroksiprolin düzeyleri Switzer yöntemiyle çalışıldı. Sonuçlar µg/g doku olarak belirtildi (44).

3.3. Doku Takip ve Boyama Yöntemi

Parafin doku takip yönteminde, %10'luk formalin içerisinde tespit edilmiş doku örnekleri bir gece akar su altında yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi yapıldı; bu işlemde doku örnekleri % 60, % 70, % 80, % 90 etil alkol serilerinde 30'ar dakika, % 96 ve % 100 alkollerde 60'ar dakika tutuldu. Şeffaflaştırma işleminde, doku örnekleri alkol: ksilen karışımında 30 dakika, ksilende 2 değişim 60'ar dakika tutulduktan sonra infiltrasyon işleminde, doku örnekleri 60°C etüvde ksilen:parafin karışımında 30 dakika, parafinde 2 değişim 60'ar dakika tutulduktan sonra +4°C'de soğutulmuş blok kaplara alındı. Doku örnekleri etüvden alınarak, bohçalar makas ile kesilerek açıldı. Doku örneğinin bloklanacağı alana 1 ml erimiş

parafin dökülerek örnek pens yardımıyla kesit yüzeyi alta gelecek şekilde yerleştirildi. Örneğin üzeri erimiş parafin ile dolduruldu ve kurşun kalemle kimlik bilgileri yazılmış kağıt parafin içine yerleştirildi. Tüm örnekler 8 ve 9. Basamaklar tekrarlanarak bloklama işlemi tamamlandı. Soğutulmuş doku bloklarından 5-7 µm kalınlığında kesitler alınarak boyama işlemlerine geçildi.

Masson-Trikrom Boyama Yönteminde, deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler lam kutusuna yerleştirilerek 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 20' şer dakika 2 değişim ksilende tutuldu. Rehidratasyon işlemi için, %100, %90, %80, %70 etil alkol serilerinde 10 ar dakika tutuldu. Kesitler 5 dakika musluk suyu ile yıkandıktan sonra 5 dakika asit fuksin çalışma çözeltisinde tutuldu. Kesitler daha sonra distile su ile yıkandı. Fosfomolibdik asit çözeltisinde 5 dakika tutuldu. Kesitler direk olarak (yıkamadan) metilen mavisi çözeltisi içine alındı ve 1 dakika boyandı. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra asetik asit çözeltisinde 1 dakika tutuldu. Sonra, kesitler distile su ile çalkalandı. Kesitler daha sonra 10'ar dakika sırasıyla % 70 alkol, % 80, % 90 ve %100 lük alkolde tutuldu. Daha sonra kesitler 2 değişim ksilolde bekletildikten sonra üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve mikroskop altında incelendi. İnflamatuar hücre, fibroblast, neovaskularizasyon ve kollajen miktarı değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Yöntem

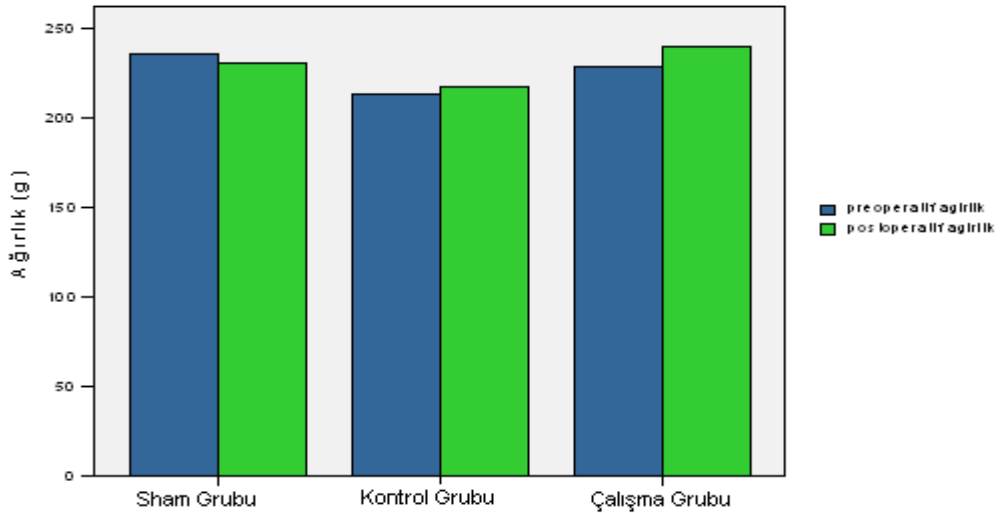
Değerler normal dağılıma uygun olamadığından ve sayısızca az olduğundan dolayı nonparametrik testler uygulandı. Değerlendirmede Wilcoxon, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U ve korelasyon testleri uygulandı.

4. BULGULAR

Çalışmamız sırasında operasyon öncesi anestezi indüksiyonu ketamin (50 mg/kg-ip) ve xylazine (12 mg/kg-ip) ile yapıldı. İndüksiyon sonrasında bazı ratlarda solunum arresti gelişti. Ambu ile solunum desteğine rağmen bazı ratlar kaybedildi. Bazı ratlar ise postoperatif dönemde kaybedildi. Ölüm sebepleri tespit edilemedi. İstatistiksel olarak gruplar arasında fark anlamlı bulunmadı. Diğer değerlendirmeler, deneyi tamamlayan 32 rat üzerinden yapıldı.

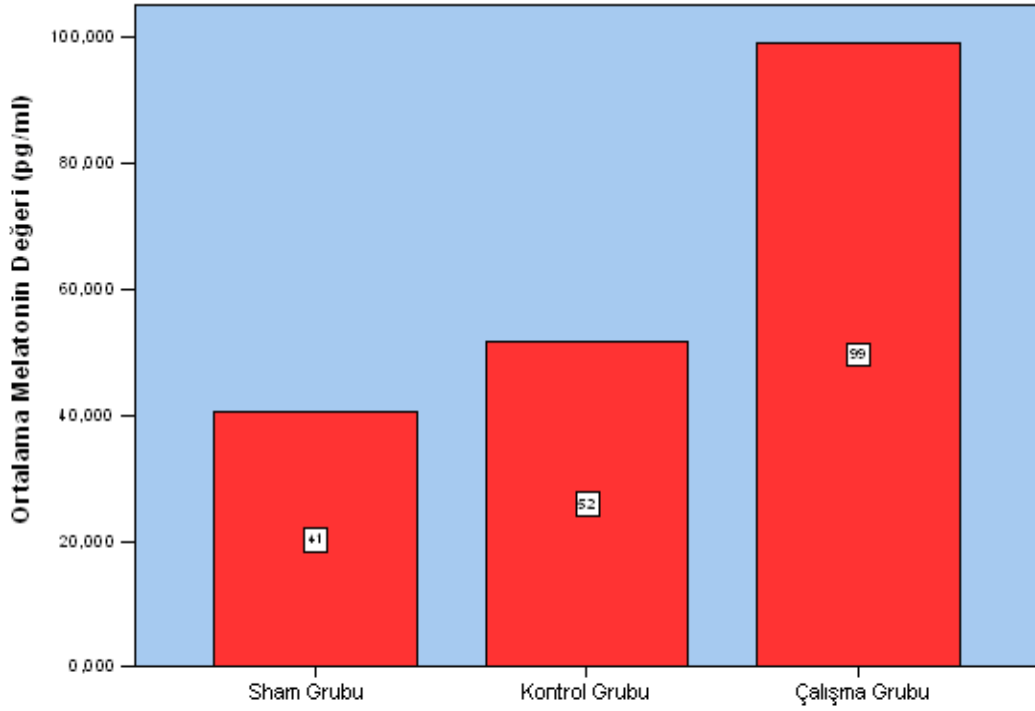
4.1. Biyokimyasal Bulgular

Preoperatif ağırlık ortalaması 228 g, postoperatif ağırlık ortalaması 231 g, olarak bulundu. Sham, kontrol ve çalışma grubunun preoperatif ağırlık ortalamaları sıra ile 236 g, 214 g, 229 g iken post operatif ağırlık ortalamaları 231 g, 218g, 240 g olarak bulundu. Laparotomi yapılan sham grubunda kilo kaybı görülürken barsak anastomozu yapılan kontrol ve çalışma grubunda kilo alımı şeklinde görülse de istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmadı ($p<0.505$).



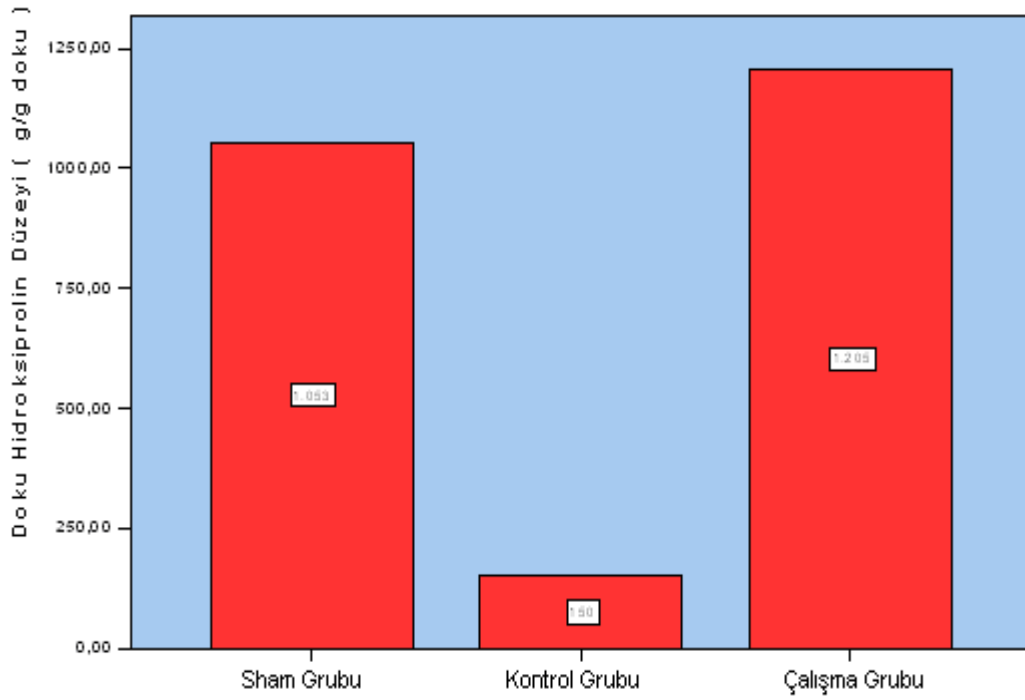
Şekil 25: Preoperatif ve postoperatif ağırlık ortalamalarının gruplara göre değerlendirilmesi.

Serum melatonin seviyesi ortalaması, çalışma grubunda 99 pg/ml, sham grubunda 41 pg/ml ve kontrol grubunda 52 pg/ml olarak bulundu. Sirkadiyen ritmi bozulmuş olan grupta diğer gruplara göre yaklaşık 2 kat yüksek bulundu. Buna rağmen gruplar arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmadı ($p < 0.262$).



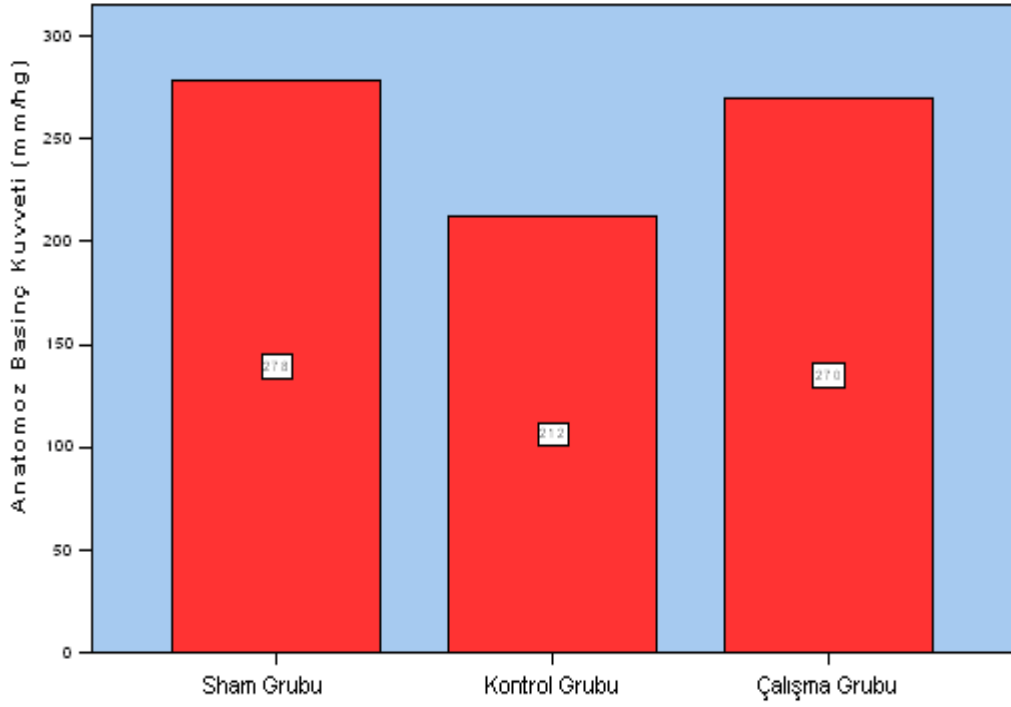
Şekil 26: Serum melatonin seviyesinin gruplara göre değerlendirilmesi.

Sham grubunda normal barsaktan, kontrol ve çalışma grubunda ise barsak anastomoz bölgesinde alınan doku incelemesi sonrasında hidrokspirolin seviyeleri kıyaslandı. Çalışma grubunda 1205 $\mu\text{g/g}$ doku, sham grubunda 1053 $\mu\text{g/g}$ doku, kontrol grubunda ise 150 $\mu\text{g/g}$ doku bulundu. Sham ve çalışma grubunda, kontrol grubuna kıyasla 7-8 kat yüksek idi ($p < 0.001$). Sham ve çalışma grubu arasında fark anlamlı bulunmadı ($p < 0.543$).



Şekil 27: Doku hidroksiprolin seviyesini gruplara göre değerlendirilmesi.

Barsak anastomoz basınç kuvvetleri değerlendirildiğine gruplar arasında anlamlı farklılıklar mevcuttu ($p < 0.023$). Barsak anastomozu yapılmayan sham grubunda haliyle yüksek bulundu. İkili değerlendirmelerde sham grubu basınçlar kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi ($p < 0.005$). Çalışma grubu basınçları da kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi ($p < 0.004$). Çalışma grubu basınçları neredeyse sham grubu kadar yüksek idi. Sham ve çalışma grubu arasında fark yoktu ($p < 0.861$).



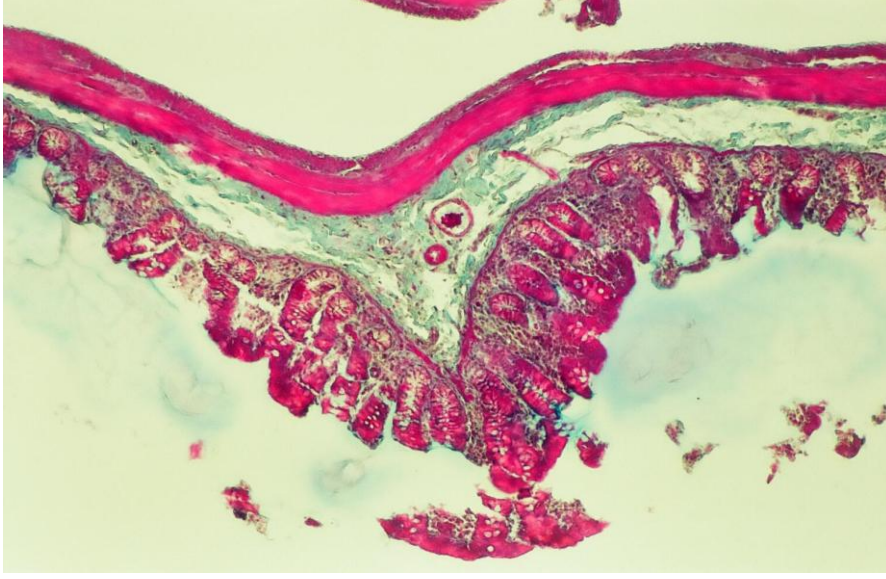
Şekil 28: Anastomoz basınç kuvvetinin gruplara göre değerlendirmesi.

Ayrıca serum melatonin, doku hidroksiprolin, anastomoz basınçları arasında korelasyon izlenmedi.

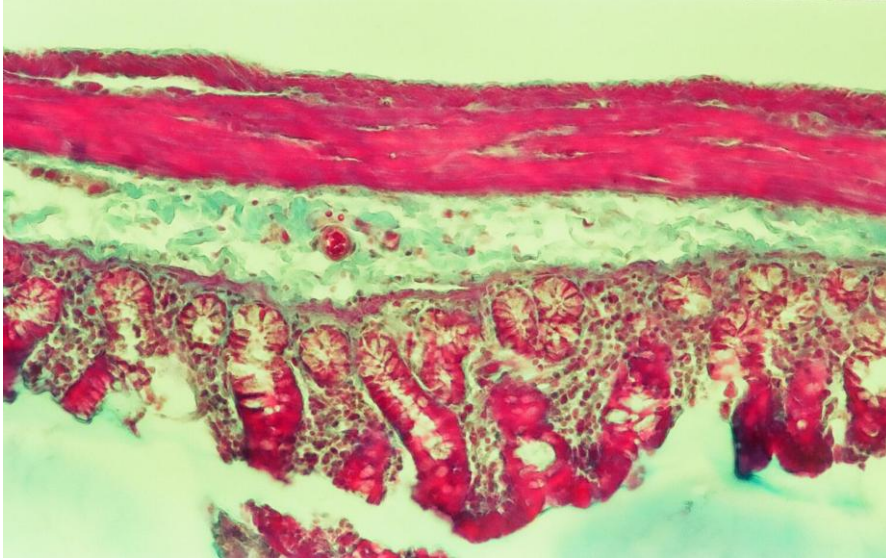
4.2. Histolojik Bulgular

Histolojik incelemede barsak anastomozu uygulanmayan sadece laparotomi yapılan sham grubu ratlarda haliyle ince barsak dokusunun genel morfolojisi normal görünmektedir. Villuslar, lümene doğru uzanmış olarak normal görünmekte idi. Muskularis mukoza, submukoza ve muskularis eksterna normal ve düzgün bir yapı özelliğine göstermekte idi.

A

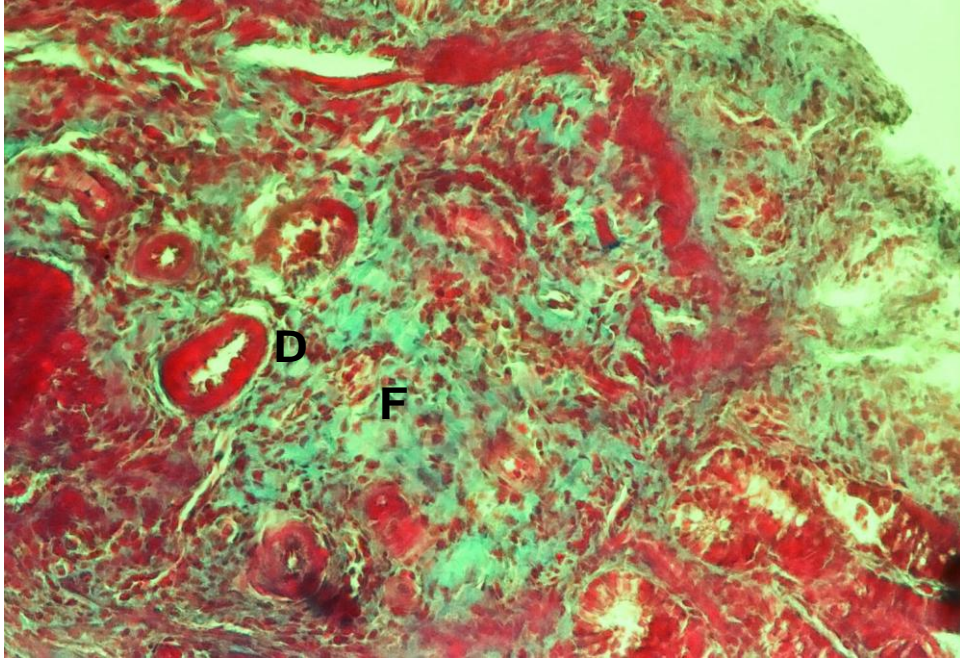


B



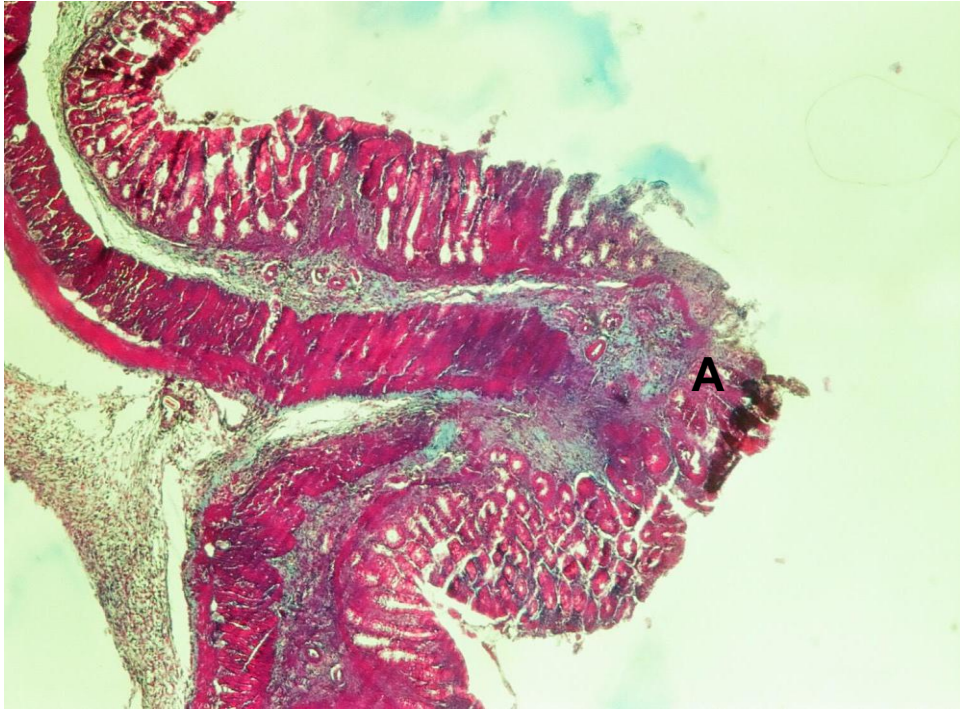
Şekil 29: Sham grubu barsak histolojisi. A: 10 luk büyütme, B: 20 lik büyütme.

Kontrol grubunda anastomoz alanlarında inflamatuvar bölgeler yaygın olarak görülmekte idi. Bu bölgelerde bol miktarda polimorfonükleer lökositler seçiliyordu. Ayrıca lenfosit infiltrasyonu ve makrofaj hücre infiltrasyonu belirgin bir şekilde gözlenmekte idi. Submukoza tabakasında ve tunika seroza tabakasında fibroblast proliferasyonu belirgindi. Buna bağlı olarak bu bölgelerde yoğun kollajen sentezi alanları göze çarpıyordu. Ayrıca bu bölgelerde yoğun damarlanmanın olduğu görülmüyordu.



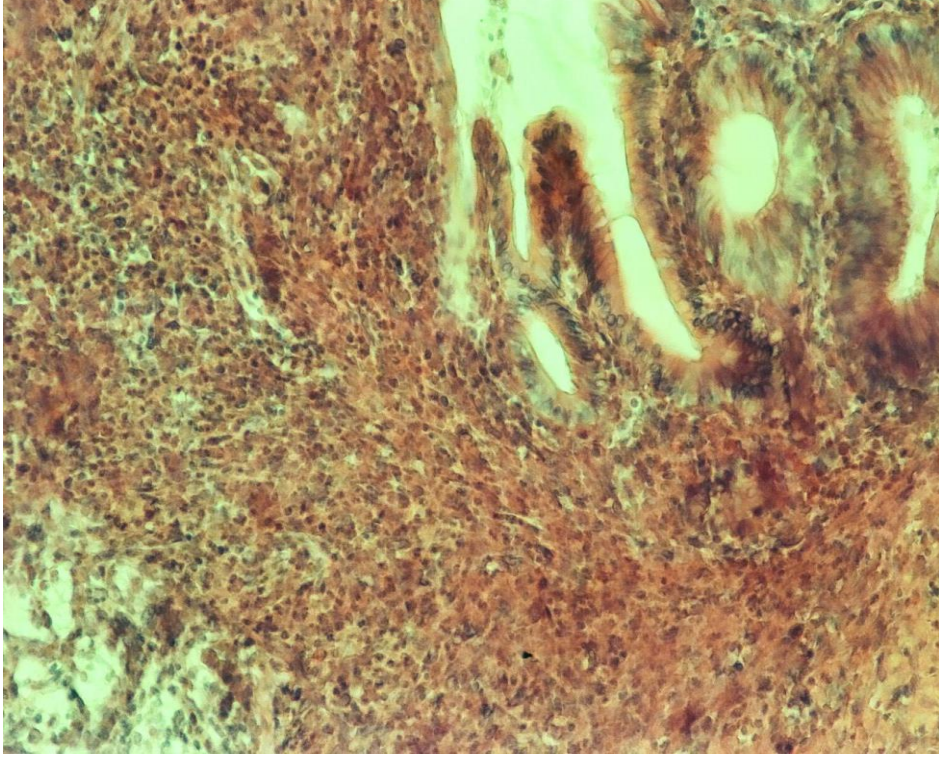
Şekil 30: Kontrol grubu histolojisi. D: damar, F: fibrozis.

Anastomoz bölgelerinde ince barsak dokusu anastomoz alanında karşılıklı gelen her iki yöndeki dokunun birbiri ile birleştikleri ve doku bütünlüğü oluşturdukları gözlemlendi. Ancak hala düzenli bir tabakalanmanın gerçekleşmediği görülmekte idi.



Şekil 31: Kontrol grubu anastomoz bölgesi. A: anastomoz bölgesi.

Çalışma grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında inflamatuvar hücre infiltrasyonu yönünden kontrol grubu ile arasında belirgin fark yoktu. Ancak bu grupta damarlanma kontrol grubuna göre oldukça az olarak izlendi. Buna rağmen kollajen sentezi kontrol grubuna göre artmış olarak gözlemlendi.



Şekil 32: Çalışma grubu histolojisi.

5. TARTIŞMA

Mevcut çalışma, dışsal faktörlerle oluşturulan sirkadiyen ritim düzensizliği ile cerrahi yara iyileşmesi arasındaki ilişkiyi direkt olarak inceleyen ilk çalışmadır. Günlük yaşamda sıkça karşılaşılan, shift work veya jet lag gibi, sirkadiyen ritim ile dış ortam arasındaki uyumu bozan durumlar, sıçanlarda aydınlık karanlık döngüsünde faz kayması oluşturularak modellenmiştir. Sirkadiyen ritmin en önemli bileşenlerinden biri olan pineal bez ve onun ürünü olan melatonin ile yara iyileşmesi arasındaki ilişki inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (48, 49, 50, 51, 52, 53). Fakat sirkadiyen ritim, melatonin dışında, yara iyileşmesi sürecini etkileyebilecek başka birçok faktör üzerinde etkilidir. Çalışmamız, sirkadiyen düzensizlik ile yara iyileşmesi arasındaki ilişkiyi ayrı ayrı faktörlerden bağımsız, bütün olarak incelemektedir. Çalışma sonuçları, sirkadiyen ritmi aydınlık/karanlık (AK) döngüsü değiştirilerek bozulan deney grubunda, yara iyileşmesinin, kontrol grubuna göre daha hızlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca serum melatonin, doku hidroksprolin düzeyleri ve anastomoz direnci arasında bir korelasyonun bulunmadığı ortaya çıkmıştır.

Serum melatonin seviyeleri, AK 12/12 döngüsünde bırakılan sham ve kontrol grubunda aynı seviyelerde, aydınlık karanlık süreleri değiştirilen çalışma grubunda ise önceki gruplara göre yaklaşık iki kat yüksek bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Yaklaşık iki katlık farka karşın, istatistiksel anlamlılığın bulunmaması denek sayısının az olmasına ya da grup içi farkların fazla olmasına bağlandı. Ölçülen melatonin düzeyi tamamen fizyolojik sentez ve salınımından kaynaklanıyordu. Dışarıdan melatonin ilaç olarak uygulanmadı. Tüm operasyonlar öğleden sonra yapıldığından normal sıklustaki ratlarda melatonin seviyesinin düşük, AK döngüsü değiştirilen çalışma grubunda ise yüksek olması beklenen bir sonuçtu. Çalışma grubunda iki kat yüksek olması ayrıca siklus bozukluğunun ispatı şeklinde değerlendirildi.

Melatoninin yara iyileşmesi üzerine etkileri, gerek sistemik ve lokal melatonin uygulaması ile gerekse endojen melatoninin ana kaynağı olan pineal bezin çıkarılması yöntemleriyle çalışılmıştır. İçinde kolon anastomozunun da bulunduğu çalışmaların sonuçları oldukça çelişkili görülmektedir. Pinealektominin ve ekzojen

melatoninin kolon anastomozu üzerine etkilerinin, barsak patlama basıncı ve doku hidroksiprolin düzeyi ile değerlendirildiği çalışmalardan ikisinde anlamlı bir etki bulunmazken (49, 52), birinde pinealektominin yara iyileşmesini arttırıcı yönde melatoninin ise zıt yönde etki gösterdiği (54) bildirilmiştir. Melatoninin kollajen birikimini ve anjiyogenezisi azaltıcı etkileri bildirilmişse de aksi yönde sonuçlara ulaşan çalışmalar da bulunmaktadır. Bu farklılıkların, uygulanan melatoninin dozu, uygulama zamanı ve organizmanın içinde bulunduğu fizyolojik/patolojik durumla ilişkisi olabilir. Melatoninin sirkadiyen ritmine uygun zaman aralığında verildiği bir çalışmada, anjiyogenezis dahil olmak üzere yara iyileşmesini arttırıcı yönde etkisi gösterilmiştir(55). Bizim çalışmamızda, günün farklı zamanlarında (aydınlık, karanlık) ardışık ölçümler yapılamadığı ve dışarıdan melatonin uygulanmadığı için, yara iyileşmesi ve melatonin arasındaki ilişkiyi değerlendirmek güçtür. Fakat melatonin salınımında sirkadiyen düzensizliklerin olduğu öngörülebilir ve sonuçlar bununla uyumludur. Melatonin, kortizol ve prolaktinin sirkadiyen paternindeki değişikliklerin romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklarla ilişkisi araştırılmış; melatonin salgısındaki faz değişikliklerinin inflamatuvar yanıtlarda artışa neden olduğu öne sürülmüştür.

Anastomoz patlama basınçları değerlendirildiğinde belirgin fark olduğu görüldü. Çalışma grubunda basınç kuvvetleri, neredeyse barsak anastomozu yapılmamış olan sham grubu kadar yüksekti. Oysa AK 12/12 olan kontrol grubunda ise düşük tespit edildi. Aynı şekilde doku hidroksiprolin seviyesi de sham ve çalışma grubunda yüksek bulundu. Bu yüksekliğin sebebinin sirkadiyen ritim bozukluğunda artmış olan İL-1, İL-6, TNF α fibroblastları etkileyerek kollajen sentezini arttırmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Çalışma grubunda, kontrol grubuna göre kollajen seviyesi artışı histolojik olarak izlendi. Histolojik değerlendirmede çalışma grubunda anjiyogenez azalmış olarak gözlemlendi.

Çalışmanın diğer önemli bir sonucu kollajen miktarı ve anastomoz direncindeki artışa karşın anjiyogenezde azalmanın olmasıdır. Bu çalışmada incelemenin yapıldığı 7. gün proliferasyon fazı olarak değerlendirilmektedir ve bu dönemin en önemli aşamaları epitelizasyon, anjiyogenezis, granülasyon, doku şekillenmesi ve kollajen birikiminden oluşmaktadır. Kollajen birikimi doku dayanıklılığını arttıran bir faktördür. Fakat anjiyogenezis yara iyileşmesinin erken

dönemlerinden başlayarak, yara bölgesine büyüme faktörleri, sitokinler gibi moleküllerin ve hücrelerin taşınmasının yanı sıra doku beslenmesini sağlayan bir fizyolojik yanıttır. Dolayısıyla anjiyogenezisteki azalmanın kısa dönemde en azından doku direnci yanıtlarını olumsuz etkilemese de uzun dönemdeki sonuçlarının bilinmesi gereklidir.

Yara iyileşmesi ve sirkadiyen ritimle direkt ilişkili diğer bir biyolojik bileşen bağışıklık sistemi ve inflamatuvar yanıtlardır. Bağışıklık sistemi ve sirkadiyen ritim arasındaki karşılıklı ilişkinin varlığını gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda interlökin (İL)-1, İL-2, İL-6, interferon üretimi, lenfosit çoğalması ve proliferasyonunun arttığı, kortizol seviyesinin değişmediği natural killer (NK) aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (46, 47, 56, 57). Bu sitokinlerin inflamatuvar yanıtta çok önemli etkileri bulunmaktadır.

Sonuç olarak, aydınlık karanlık döngüsü değiştirilerek uyarılan sirkadiyen ritim bozukluğu durumunun beklenmedik bir şekilde barsak anastomoz basınç kuvvetini olumlu yönde etkilediği, fakat doku damarlanmasını azalttığı bulunmuştur. İlk bakışta bu sonuçların İL-1, İL-6, TNF α gibi sitokinlerin etkilerine bağlı olabileceği düşünülse de unutulmamalıdır ki yara iyileşmesi bir çok faktörün bir arada rol aldığı kompleks bir süreçtir. Sirkadiyen ritim bozukluğunun bağışıklık sistemi üzerine olan etkileri hala tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Ayrıca siklus bozukluğunda görülen anjiyogenezin azalmasının uzun dönemde mortalite ve morbiditeyi ne şekilde etkileyeceği bilinmemektedir. Deneysel olarak oluşturulan bu sirkadiyen düzensizlik durumunun yara iyileşmesi üzerine etkilerinin zamana bağlı şekilde mekanizmalarını aydınlatacak ilave çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu mekanizmaların aydınlatılması barsak cerrahisinde ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkan anastomoz kaçağının önlenmesine yönelik yaklaşımlara katkı sağlayabilir. Ayrıca, ratlarda oluşturulan bu deneysel modelin insanlardaki durumla paralellik gösterip göstermediğinin de klinik çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1:Grupların preoperatif ve postoperatif ağırlıkları arasında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmadı ($p<0.505$).

2:Serum melatonin seviyesi ortalaması değerlendirildiğinde, çalışma grubunda diğer gruplara göre yaklaşık 2 kat yüksek olduğu görüldü. Buna rağmen gruplar arasında istatistiksel fark anlamlı bulunmadı ($p<0.262$).

3:Doku hidroksiprolin seviyeleri sham ve çalışma grubunda, kontrol grubuna kıyasla 7-8 kat yüksek idi ($p<0.001$). Sham ve çalışma grubu arasında fark anlamlı bulunmadı ($p<0.543$). Sirkadiyen ritim bozukluğu, iyileşme bölgesinde daha fazla kollajen sentezine neden olmaktadır.

4:Barsak anastomoz kuvvetleri değerlendirildiğinde sham ve çalışma grubu basınçları, kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu ($p<0.023$). Sham ve çalışma grubu arasında fark anlamlı bulunmadı ($p<0.861$). Sirkadiyen ritim bozukluğu, barsak anastomoz basınç kuvvetini arttırmaktadır.

5:Çalışma grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında inflamatuvar hücre infiltrasyonu yönünden kontrol grubu ile arasında belirgin fark yoktu. Ancak bu grupta damarlanma kontrol grubuna göre oldukça az olarak izlendi. Buna rağmen kollajen sentezi kontrol grubuna göre artmış olarak gözlemlendi.

6:Sirkadiyen ritim bozukluğu, barsak anastomoz basınç kuvvetini ve yara iyileşmesini olumlu etkiliyor şeklinde görülse de uzun dönem etkileri bilinmemektedir.

7:Yara iyileşmesi bir çok sistemin birlikte rol aldığı kompleks bir süreç olduğundan dolayı bu sonuçların sebebini aydınlatmak için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Ratlarda Sirkadiyen Ritim Bozukluğunun Yara İyileşmesi ve Barsak Anastomoz Kuvveti Üzerine Etkileri

Biyolojik ritimler, canlı bir organizmada yaşam boyu tekrarlayan ve tek hücreli organizmalardan insanlara kadar tüm canlı türlerinin dış ortama adaptasyonunu sağlayan fizyolojik olaylardır. Yaşayan bütün canlılar, fizyolojik işlevlerinin çoğunu belirli ritimler içerisinde gerçekleştirirler. Canlıların fizyolojik, biyokimyasal veya davranışsal olaylarının 24 saatlik döngüler şeklinde gerçekleştirilmesine sirkadiyen ritim denir. Uzun süren kıtalar arası yolculuklarda sirkadiyen ritim bozulmasına jet lag, gece gündüz ritminin bozulduğu vardiyalı çalışanlarda sirkadiyen ritim bozulmasına ise shift lag denir. Her ikisinde benzer metabolik etkilere sahiptir. Sirkadiyen ritimde başlıca hormonlar: melatonin, ACTH, kortizoldür. Bu hormonların özellikle immün sistem başta olmak üzere metabolizmada çok önemli fonksiyonları vardır. Ayrıca bir çok çalışmada farmakolojik dozlarda yara iyileşmesi ve barsak anastomoz kuvveti üzerine etkili oldukları ispatlanmıştır. Yara iyileşmesinde çok önemli etkileri bulunan sitokinler ile sirkadiyen sistem arasında yakın ilişki bulunmaktadır. Sirkadiyen ritim bozukluğunda İL-1, İL-6, TNF α miktarın artış gözlenmektedir. Barsak anastomozu yapılan hastalarda en büyük mortalite ve morbidite nedenini anastomoz kaçakları oluşturmaktadır. Modern şehir yaşamında çalışma ve mesai şartları, sosyal şehir yaşantısı nedeni ile sirkadiyen ritim bozuklukları çok sık görülen bir rahatsızlıktır. Bu nedenle bu tür hastalarda postoperatif komplikasyonları araştırmak için ratlarda shift lag'in yara iyileşmesi ve barsak anastomoz kuvveti üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla Wistar Albino cinsi 45 adet rat rastgele 15'erli sham grubu, kontrol grubu, çalışma grubu, olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Sham grubuna laparotomi uygulandı. Kontrol grubuna kolon anastomozu uygulandı. Sham ve kontrol grubu 12 saat aydınlık- karanlık siklusunda bırakıldı. Çalışma grubuna 2 hafta süre ile aydınlık karanlık siklus değişikliği yapıldıktan sonra kolon anastomozu uygulandı. Ratların preop ve postop ağırlıkları kaydedildi. Anastomoz uygulandıktan 1 hafta sonra serum melatonin seviyesi ölçümü için kan alındı, barsak anastomoz

basınç kuvveti ölçüldü, doku hidroksiprolin seviyesi ölçümü ve histolojik değerlendirme için doku örneği alındı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirmede Wilcoxon, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U ve korelasyon testleri uygulandı. Barsak anastomozu yapılmamış olan sham ve sirkadiyen ritmi bozulmuş olan çalışma grubunda barsak anastomoz patlama basınçları ($p<0.023$), doku hidroksiprolin düzeyleri ($p<0.001$), normal sirkadiyen ritimde bulunan kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Histolojik incelemede çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla fibroziste artış, anjiyogenezde azalma gözlemlendi. İlk bakışta bu sonuçların serum IL-1, IL-6, TNF α gibi sitokinlerin etkilerine bağlı olabileceği düşünülse de yara iyileşmesi bir çok faktörün bir arada rol aldığı kompleks bir süreçtir. Deneysel olarak oluşturulan sirkadiyen düzensizlik durumunun yara iyileşmesi üzerine etkilerinin zamana bağlı şekilde mekanizmalarını aydınlatacak ilave çalışmalara ihtiyaç vardır. Ratlarda oluşturulan bu deneysel modelin insanlardaki durumla paralellik gösterip göstermediğinin de klinik çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sirkadiyen ritim, yara iyileşmesi, barsak anastomoz kuvveti, suprakiazmatik nükleus lezyonu.

8. ABSTRACT

The Effects of Circadian Rhythm Disorders On Wound Healing and Potency of Bowel Anastomosis in Rats

Biologic rhythms are physiological facts that repeat throughout the entire life of a living organism ranging from single cell organism to the human being. Biologic rhythms adapt organisms to the outside environment. All the living creatures achieve most of their physiological functions in specific rhythms. Circadian rhythm is defined as 24 hour cycle in the biochemical, physiological or behavioural processes of living beings. Distruption of circadian rhythm at the intercontinental and taking a long time travels is called jet-lag and the one that is seen in the shift workers whose day-night rhythms are broken down is called shift-lag. Both of them have same metabolic effects. The major hormones on circadian rhythm are melatonin, ACTH and cortisone. These hormones have very important functions on metabolism, especially on immune system. Also, in many studies it has been proved that in pharmacologic doses they are effective on wound healing and bowel anastomosis potency. There is a close relationship between cytokines that pose important roles in wound healing and circadian rhythm system. IL-1, IL-6, TNF α levels increase during circadian rhythm disorders. In patients with bowel anastomosis, the major morbidity and mortality cause is anastomotic leak. In modern city life, because of working circumstances and social city life, circadian rhythm disorders are very common. So, to evaluate postoperative complications in these patients, we purposed to investigate the effects of shift lag on wound healing and bowel anastomosis in rats. For this purpose, 45 Wistar Albino species of rats were separated as 3 groups; sham, control and study group. Laparotomy was performed in the sham group. Colon anastomosis was made in the control group. Both sham and control groups were exposed to 12 hours of lighth and dark cyclus. Colon anastomosis was made in the study group after exposing to light and dark cyclus for 2 weeks. Pre and post operative weights of rats were recorded. One week after the anastomosis, blood was sampled for serum melatonin level and patency of bowel anastomosis pressures were evaluated. Also tissue samples were taken for measuring tissue hydroxyproline levels and

histological assessment. Results were assessed statistically. Wilcoxon, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U and correlation tests were used. In sham and study groups, bursting pressures of bowel anastomosis ($p < 0.023$) and tissue hydroxyproline levels ($p < 0.001$) were measured higher compared to control group. By histological assessment, increased fibrosis at the area of anastomosis in (the disordered circadian rhythm) and decreased angiogenesis the study group were statistically significant compared to the control group. At the first site, although these results may be related to effects of various cytokines like IL-1, IL-6, TNF α , wound healing depends on multifactorial, complex processes. However to evaluate the effects of circadian rhythm disorders on wound healing we need more clinical and experimental studies. Also we should investigate the parallelism between clinical and experimental results.

Keywords: Circadian rhythm, wound healing, bowel anastomosis potency, suprachiasmatic nucleus lesion.

9. KAYNAKLAR

1. Fuller CA, Fuller P. Circadian Rhythms. *Encyclopedia of The Human Brain* 2002; **1**:793-812.
2. Chassard D. Timing is everything. *Anesthesiology* 2005; **103**(3):454-456.
3. Aschoff J. Circadian rhythms in man. *Science* 1965; **11**(148):1427-1432.
4. Binkley S. *Biological Clocks: Your Owners Manual*. 1998; 35-38.
5. Boggild H, Knutsson A. Shift work, risk factors and cardiovascular disease. *Scand J Work Environ Health* 1999; **25**(2):85-99.
6. Haus E. Chronobiology in the endocrine system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; **59**:985–1014.
7. Kawara S, Mydlarski R, Mamelak AJ, Freed I, Wang B, Watanabe H, Shivji G, Tavadia SK, Suzuki H, Bjarnason GA, Jordan RC, Sauder DN. Low-dose ultraviolet Beta rays alter the mRNA expression of the circadian clock genes in cultured human keratinocytes. *J. Invest Dermatol* 2002; **119**:1220–1223.
8. Knutsson A. Health disorders of shift workers. *Occup Med* 2003; 53:103–108.
9. Kondratov RV. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Research Reviews* 2007; **6**:12–27.
10. Mignot E, Takahashi JS. A circadian sleep disorder reveals a complex clock. *Cell* 2007; **128**:22–23.
11. Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE, Speizer FE, Hennekens CH. Prospective study of shift work and risk of coronary heart disease in women. *Circulation* 1995; **92**:3178–3182.
12. Morikawa Y, Nakagawa H, Miura K, Soyama Y, Ishizaki M, Kido T, Naruse Y, Suwazono Y, Nogawa K. Shift work and the risk of diabetes mellitus among Japanese male factory workers. *Scand J Work Environ Health* 2005; **31**:179–183.
13. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS, Colditz GA. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurse's health study. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**:825–828.
14. Fujino Y, Iso H, Tamakoshi A, Inaba Y, Koizumi A, Kubo T, Yoshimura T. A prospective cohort study of shift work and risk of ischemic heart disease in Japanese male workers. *Am J Epidemiol* 2006; **164**:128–135.
15. Chen H, Schernhammer E, Schwarzschild MA, Ascherio A. A prospective study of night shift work, sleep duration, and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2006; **163**: 726–730.
16. Berger J. A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. *Pathologie Biologie* 2008; **56**:286–291.

17. Haus E, Smolensky M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* 2006; **17**:489–500.
18. Van der Helm-Van Mil AH, Van Someren EJ, Van den Boom R, Van Buchem MA, De Craen AJ, Blauw GJ. No influence of melatonin on cerebral blood flow in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**:5989–5994.
19. Rivkees SA. Developing circadian rhythmicity in infants. *Pediatrics* 2003; **112**:373–381.
20. Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res* 1996; **21**:200–213.
21. Stoschitzky K, Sakotnik A, Lercher P, Zweiker R, Maier R, Liebmann P, Lindner W. Influence of beta-blockers on melatonin release. *Eur J Clin Pharmacol.* 1999; **55**:111–115.
22. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol* 1986; **13**:19–30.
23. Sassin JF, Frantz AG, Kapen S, Weitzman ED. The nocturnal rise of human prolactin is dependent on sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; **37**:436–440.
24. Roky R, Obal Jr F, Valatx JL, Bredow S, Fang J, Pagano LP, Krueger JM. Prolactin and rapid eye movement sleep regulation. *Sleep* 1995; **18**:536–542.
25. Gala RR. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; **198**:513–527.
26. Berczi I. Immunoregulation by neuroendocrine factors. *Dev Comp Immunol* 1989; **13**: 329–341.
27. Bernton E, Bryant H, Holaday J, Jitendra D. Prolactin and prolactin secretagogues reverse immunosuppression in mice treated with cysteamine, glucocorticoids or cyclosporin-A *Brain Behav Immun* 1992; **6**:394–408.
28. Lavallo C, Loyo E, Paniagua R, Bermudez JA, Herrera J, Graef A, Gonzalez-Barcena D, Fraga A. Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; **14**:268–272.
29. Prigent H, Maxime V, Anane D. Clinical review: Corticotherapy in sepsis. *Critical Care* 2004; **8**:122-129.
30. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; **82**:47–95.
31. Skrzypinska-Gawrysiak M, Piotrowski JK, Bruchajzer E. The diurnal rhythm of hepatotoxic action of chloroform. *Int J Occup Med* 1995; **8**:115–121.
32. Schnell RC, Bozigian HP, Davies MH, Merrick BA, Park KS, McMillan DA. Factors influencing circadian rhythms in acetaminophen lethality. *Pharmacology* 1984; **29**:149–157.

33. Boughattas NA, Li XM, Filipski J, Lemaigre G, Filipski E, Bouzouita K, Belhadj O, Levi F. Modulation of cisplatin chronotoxicity related to reduced glutathione in mice. *Hum Exp Toxicol* 1996; **15**:563–572.
34. Hofman MA, Swaab DF. Living by the clock: the circadian pacemaker in older people. *Ageing Res Rev* 2006; **5**:33–51.
35. Tsai LL, Tsai YC, Hwang K, Huang YW, Tzeng JE. Repeated light-dark shifts speed up body weight gain in male F344. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **289**:212–217.
36. Balkancı ZC, Segili MA. Biyolojik ritimler ve anestezi. *Anestezi Dergisi* 2005; **13**:223–236.
37. Hofstra WA, De Weerd AW. How to assess circadian rhythm in humans. *Epilepsy Behavior* 2008; **13**:438–444.
38. Eming AS, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; **127**:514–525.
39. David M, Stephen J. Wound healing. *Modern Surgical Care*. 1998; **1**:1237-1247.
40. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; **77**:509-528.
41. Cohen IK, Diegelmann RF, Yager DR, et al. *Wound Care and Wound Healing. Schwartz, Principles of Surgery*. 7th edition, chapter 8; 1999; 263-295.
42. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental study on healing of colonic anastomoses. *J Surg Res* 1990; **48**:504-515.
43. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the Gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am* 1997; **77(3)**:549-565.
44. Switzer BR. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991; **2**:229-231.
45. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rew* 2005; **9(1)**:25-39
46. Bjorvatn B, Pallessen S. A practical approach to circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Med Rew* 2009; **13(1)**:47-60.
47. Santos RVT, Tufik S, De Mello MT. Exercise, sleep and cytokines: Is there a relation? *Sleep Med Rew* 2007; **11(3)**:231-239.
48. Başak PY, Ağalar F, Gültekin F, Eroğlu E, Altuntaş İ, Ağalar C. The effect of thermal injury and melatonin on incisional wound healing. *Ulus Travma Derg* 2003; **9(2)**:96-101.
49. Özdoğan M, Oruk I, Renda N, Kaynaroglu V, Baykal A. The effect of exogenous melatonin on experimental colonic anastomosis. *Acta Chir Belg* 2005; **105(3)**:302-305.
50. Bülbüller N, Doğru O, Yekeler H, Çetinkaya Z, İlhan N, Kirkil C. Effect of melatonin on wound healing in normal and pinealectomized rats. *J Surg Res* 2005; **123(1)**:3-7.

51. Soybir G, Topuzlu C, Odabaş O, Dolay K, Bilir A, Köksoy F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today* 2003; **33(12)**:896-901.
52. Nursal TZ, Yakupoğlu H, Renda N, Hamaloğlu E, Sayek İ, Onat D, Palaoğlu S, Enünlü T. Pinealectomy does not affect the healing of experimental colonic anastomoses. *J Invest Surg* 2002; **15(2)**:61-68.
53. Griбанov GA, Guseva VV, Volodina TV, Kozel'tsev VL, Bykov VA. Phospholipid composition of granulation and fibrous tissues in rats after local application of melatonin. *Bull Exp Biol Med* 2003; **135(1)**:46-47.
54. Drobnik J, Dabrowski R. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios* 1996; **85(340)**:51-58.
55. Pugazhenti K, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J Pineal Res* 2008; **44(4)**:387-396.
56. Moldofsky H, Lue FA, Davidson JR, Gorczynski R. Effects of sleep deprivation on human immune functions. *The Faseb Journal* 1989; **3**:1972-1977.
57. Dickstein JB, Moldofsky H. Sleep, cytokines and immune function. *Sleep Med Rev* 1999; **3(3)**:219-228.