

Mekanik ventilasyona bağlı olarak gelişen diafragma disfonksiyonunda serum ve doku düzeyindeki oksidatif strese teofilinin etkisi

[The effect of theophylline on oxidative stress in serum and tissues in mechanical ventilation-induced diaphragm dysfunction]

Kürşat Uzun¹,
Nihal Bakırcıalay Aydın¹,
Turgut Teke¹,
Sadık Büyükbaş²,
Kemal Başaralı²

Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları¹ ve Biyokimya² Anabilim Dalları, Konya

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Yrd. Doç. Dr. Turgut Teke

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı
42080 Meram-Konya
Telefon: 0 332 2236218
E-mail: turgutteke@selcuk.edu.tr

Kayıt Tarihi: 17 Nisan 2011; Kabul Tarihi: 5 Ağustos 2011
[Registered: 17 April 2011; 5 August 2011]

ÖZET

Amaç: Mekanik ventilasyona bağlı diafragma disfonksiyonunda (VBDD) oksidatif stresin rolü olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmada hayvan modelinde VBDD’unda diafragma ve sistemik oksidatif stresin rolünün ve teofilin uygulanmasının oksidatif stres üzerindeki etkisinin araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda 30 adet, sağlıklı erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 3 eşit gruba ayrıldı. Grup 1, Mekanik Ventilasyon (MV) uygulanmayan kontrol grubu; Grup 2, 24 saat süreyle MV uygulanan plasebo grubu; Grup 3, 24 saat süreyle MV ve teofilin uygulanan teofilin grubu olarak adlandırıldı. Her üç grupta diafragma, akciğer dokusu ve plazmada oksidatif stresi değerlendirmek için malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri ile ksantin oksidaz (XO) ve superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında plasebo grubunda diafragmada SOD (0,01–0,07 U/mg) ve XO (0,61–1,76 U/g) aktiviteleri ile NO (0,05–0,14 µmol/g) seviyesinde; akciğerde XO (0,36–2,26 U/g) aktivitesinde; plazmada SOD (2,06–5,24 U/mL) ve XO (7,76–14,04 U/mL) aktiviteleri ile MDA (0,35–1,09 nmol/L) seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık gösteren artışlar mevcuttu ($p<0,05$). Plasebo grubuyla karşılaştırıldığında teofilin alan grupta diafragmada sadece SOD (0,096 U/mg) aktivitesindeki artış ($p<0,05$); akciğerde sadece XO (0,39 U/g) aktivitesindeki azalma ($p<0,001$); plazmada ise MDA (0,36 nmol/L) seviyesindeki azalma ($p<0,001$) ve NO (22,3–29,7 µmol/L) seviyelerindeki artış ($p<0,05$) anlamlılık gösteriyordu.

Sonuçlar: Bu çalışmada sıçanlarda MV uygulanmasına bağlı diafragma oksidatif strese akciğer ve sistemik oksidatif streslerinin de eşlik ettiği ve bu oksidatif hasarın baskın olarak XO yoluyla ile olduğu gösterilmiştir. Ayrıca teofilin tedavisinin, oluşan bu oksidatif stresi SOD aktivitesini artırarak, XO aktivitesini baskılayarak hafiflettiği ortaya konulmuştur. Ancak bu konuyla ilgili daha çok sayıda ve moleküler düzeyde hayvan ve insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mekanik ventilasyon, solunum kasları, kas hasarı, oksidatif stres, teofilin

ABSTRACT

Introduction: The role of oxidative stress in mechanical ventilation induced diaphragm dysfunction (VIDD) was shown in various studies. In this animal model, we planned to evaluate the role of diaphragmatic and systemic stress on VIDD and the effect of theophylline application on the oxidative stress.

Material and methods: Thirty healthy male Sprague-Dawley rats were used. They were evenly divided into 3 groups as Group 1, control group (no application); group 2, placebo group receiving mechanical ventilation (MV); Group 3, theophylline group receiving both MV and theophylline. Malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels with xanthine oxidase (XO) and superoxide dismutase (SOD) activities were measured in all groups to evaluate the oxidative stress at diaphragm, lung tissue and plasma.

Results: SOD (0.01–0.07 U/mg) and XO (0.61–1.76 U/g) activities with NO (0.05–0.14 µmol/g) levels at diaphragm; XO (0.36–2.26 U/g) activity at lungs and SOD (2.06–5.24 U/mL) and XO (7.76–14.04 U/mL) activities with MDA (0.35–1.09 nmol/L) levels at plasma were significantly increased in placebo group ($p<0.05$) compared to control. Upon theophylline therapy, SOD (0.096 U/mg) activity at diaphragm and plasma NO (22.3–29.7 µmol/L) levels were significantly increased ($p<0.05$); whereas XO (0.39 U/g) activity at lungs and plasma MDA (0.36 nmol/L) levels were significantly decreased ($p<0.001$) compared to placebo group.

Conclusion: In this study, we showed that pulmonary and systemic oxidative stresses accompany MV application induced diaphragmatic oxidative stress in rats and this oxidative stress is predominantly occurs through XO pathway. Also it was demonstrated that theophylline alleviates this oxidative stress by increasing the SOD activity and repressing the XO activity. However, more animal and human studies at molecular level are needed on this subject.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest.

Key Words: Mechanical ventilation, respiratory muscles, muscle injury, oxidative stress, theophylline.

Giriş

Mekanik ventilasyon (MV) alveoler ventilasyonu sürdürmeyen hastalarda kan gazı dengesini devam ettirmek için kullanılan yaşam kurtarıcı bir tedavi yöntemidir. Ancak MV uygulanan hastaların yaklaşık %25'inde uzamış ventilatör desteği gerekmekte, bu durum ise enfeksiyon oranları, yoğun bakımda kalış süreleri, morbidite ve mortalite oranlarında artışa sebep olmaktadır [1]. Uzamış ventilatör desteği hem diafragma kasının kasılma gücünde azalma hem de atrofi ile sonuçlanmaktadır. Oksidatif stres MV'un neden olduğu bu diafragmatik disfonksiyona katkıda bulunan önemli bir sebeptir [2]. Yapılan deneysel çalışmalarda solunum kas güçsüzlüğüne neden olarak solunum kaslarında artmış oksidatif stres, protein sentezinin azalması ve proteolizinin artması gösterilmiştir [2-4]. Ayrıca antioksidan tedavinin bazı hayvan çalışmalarında ventilatöre bağlı diafragma disfonksiyonu (VBDD) ile ilişkili moleküler ve biyokimyasal değişikliklerin pek çoğunu düzelttiği gösterilmiştir [5,6].

Hayvan çalışmaları VBDD'nun 6 saat gibi kısa bir sürede geliştiğini göstermektedir [2,3]. Bunların önlenmesi için mekanik ventilasyon süresince solunum kas kütlelerini ve fonksiyonunu korumak için stratejiler geliştirilmiştir. Bunlar; diafragmanın çalışmasına olanak sağlayan uygun MV modları, çeşitli egzersiz yöntemleri, katabolik durumun stabilizasyonu ve farmakoterapi gibi yöntemleri içermektedir [7]. Ayrıca VBDD insidansını ve şiddetini azaltmak için beslenmenin, elektrolitlerin, kardiyak ve renal fonksiyonların düzene konulması önem arz etmektedir [8]. Farmakoterapik uygulamalar içerisinde yer alan profilaktik teofilinin uygulamasının diafragma güçsüzlüğünü önlediği ve diafragmatik yorulmuşluğu geriye döndürdüğü gösterilmiştir [9, 10].

VBDD'na oksidatif hasarın katkısının bilinmesine rağmen diafragmadaki oksidan ürünlerin hangi yolak veya yolaklarla üretildiği, sistemik bir oksidatif stresin diafragmadaki bu oksidatif hasara eşlik edip etmediği ve teofilinin bu oksidatif stres üzerine nasıl bir etki oluşturduğu halen tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada hayvan modelinde VBDD'nunda diafragmatik ve sistemik oksidatif stresin rolünün ve teofilin uygulamasının oksidatif stres üzerindeki etkisinin araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvanlar

Deney hayvanı olarak, biyomedikal araştırmalarda kullanılan başlıca tür olması, boyutlarının küçüklüğü ve bakımının kolaylığı nedeniyle sıçan tercih edildi. Bu amaçla, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkez (SÜDAM)'inde, SÜDAM tarafından hazırlanmış standart sıçan pellet yemi ve çeşme suyu ile *ad libitum* beslenen 30 adet, ortalama ağırlıkları 315–375 g. olan sağlıklı 4 aylık erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanlar seçildi. Bu çalışmaya başlamadan önce hayvanlar

3 hafta süresince 12 saatlik döngülerle ışık ve karanlıkta tutuldular. Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi şartlarında, Deney Hayvanları Etik Kurulunun 10/02/2006 tarih ve 01 sayılı kararı ile gerçekleştirildi.

Deneysel plan

Hayvanlar rastgele 3 eşit guruba ayrıldı.

Grup 1 (kontrol grubu): Akut olarak intraperitoneal anestezi uygulandı.

Grup 2 (MV grubu): Steril şartlarda intraperitoneal anestezi uygulandıktan sonra trakeostomi açılıp 24 saat boyunca monitörize edilerek MV'a bağlandı.

Grup 3 (MV+Teofilin Grubu): Steril şartlarda intraperitoneal anestezi uygulandıktan sonra trakeostomi açılıp 24 saat boyunca monitörize edilerek MV'a bağlandı ve teofilin infüzyonu yapıldı (15 mg/kg yükleme ve 0,05 mg/kg/saat sürekli idame).

Kontrol hayvanların protokolü

Bu hayvanlar çalışmadan önce mekanik olarak ventile edilmedi ya da uzun süre anesteziye maruz kalmadılar. Kontrol gurubundaki hayvanlar tartıldıktan sonra intraperitoneal olarak sodyum pentobarbital (50 mg/kg) uygulandı. Cerrahi düzeyde anestezi gerçekleştirildikten sonra deney hayvanlarından önce sistemik oksidatif stresi ölçmek için kan örneği tüplere alındı. Ardından batin cerrahi olarak açılarak diafragma çıkarıldı, sonra akciğer dokusu ve kostal diafragmanın segmentleri alınarak hızlı bir şekilde -80°C'de oksidatif hasarın analizini yapmak üzere saklandı. Alınan kan örnekleri de 1500 xg'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra, plazma endopodflara konularak -80°C'de saklandı.

Mekanik ventilasyon protokolü

Sepsis, diafragmatik kontraktıl disfonksiyonla ilişkili olduğu için dikkatli bir şekilde aseptik teknikler tüm cerrahi işlemler süresince takip edildi. MV için rastgele seçilen hayvanlar tartıldıktan sonra intraperitoneal sodyum pentobarbital (50 mg/kg) uygulandı. Cerrahi düzeyde anestezi sağlandıktan sonra hayvanlara trakeostomi açıldı ve küçük hayvan ventilatörü (SAR-830, IITC Life Science, A.B.D.) kullanılarak volüm kontrollü mekanik ventilasyon uygulandı. Tidal volüm 1 ml/100 g vücut ağırlığı, solunum hızı istirahatadaki erişkin sıçanların solunum sıklığını taklit etmek için 80/dk ayarlandı. İlave olarak pozitif ekspirum sonu basınç (PEEP) 1 cmH₂O işlem boyunca kullanıldı.

Bir arteryel katater kan basıncını sürekli ölçmek için karotid artere yerleştirildi. Bir venöz katater, izotonik salin infüzyonu uygulamak için femoral venin epigastrik dalına yerleştirildi. Sodyum pentobarbitalin sürekli infüzyonu (10 mg/kg/saat) ile MV periyodunda derin anestezi sağlandı. Kalp hızı, kan basıncı, korneal göz kapağı refleksi kontrolü gibi yöntemlerle anestezinin seviyesi monitorize edildi. Vücut ısısı bir ısıtma battanisi kullanılarak 37°C'de sürdürüldü. İlave olarak kalp hızı ve kalbin elektriksel aktivitesi iğne elektrotlar sub-

kutan olarak yerleştirilerek bir EKG aracılığıyla monitörize edildi. Vücut sıvı dengesi 2 ml/kg/saat IV serum fizyolojik solüsyonu uygulanması ile sürdürüldü. MV süresince sürekli idrar çıkışının takibi, havayolu mukusunun çıkarılması, gözlerin nemlendirilmesi, hayvanın döndürülmesi ve bacakların pasif hareketlerini içerir takip ve bakımlar yapıldı. Bu bakım saatlik aralıklarla uygulandı.

MV tamamlandığında hayvanların vücut ağırlığı yeniden tartıldı. Deney hayvanlarından önce sistemik oksidatif stresi ölçmek için kan örneği tüplere alındı. Ardından batin cerrahi olarak açılarak diafragma çıkarıldı ve önce makroskopik olarak anormallik olup olmadığı (renk değişikliği, kalınlaşma, hemoraji) gözden geçirildikten sonra akciğer dokusu ve kostal diafragmanın segmentleri çıkarılarak hızlı bir şekilde -80°C'de oksidatif hasarın analizini yapmak üzere saklandı. Alınan kan örnekleri de 1500 xg'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra, plazma endopodflara konularak -80°C'de saklandı.

Biyokimyasal değerlendirme

Tüm analizler 30 gün içinde gerçekleştirildi. Plazma ve doku örneklerinde superoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) ve ksantin oksidaz (XO; EC 1.17.3.2) aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri analiz edildi.

Malondialdehit (MDA) analizi: Tiobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu prensibine dayanan Wasowitz ve ark. [11] yöntemiyle çalışıldı. MDA seviyeleri, akciğer dokusu ve diafragma için nmol/g yaş doku, plazma için nmol/L olarak saptandı. MDA ölçümü için kullandığımız yöntemin en düşük saptama limiti (*limit of detection* – LOD) 0,1 nmol/L ve linearite sınırı (*limit of quantitation* – LOQ) ise 10 nmol/L idi.

Ksantin oksidaz (XO) analizi: Ksantin oksidaz aktivitesi Prajda ve ark. [12] yöntemine göre çalışıldı. XO aktivitesi, akciğer dokusu ve diafragma için U/g protein, plazma için U/mL olarak saptandı. XO ölçümü için kullandığımız yöntemde LOD 0,06 U/mL ve LOQ ise 20 U/mL idi.

Nitrik oksit (NO) analizi: Kolorimetrik kit yöntemi (Cat. No. CM780001, Cayman Chemical Company, ABD) göre değerlendirildi. Akciğer dokusu ve diafragma için µmol/g protein, plazma için µmol/L olarak saptandı. NO ölçümü için kullandığımız yöntemde LOD 2 µmol/L ve LOQ ise 35 µmol/L idi.

Superoksit dismutaz (SOD) analizi: Total (Cu-Zn ve Mn) SOD aktivitesi ölçümleri Sun ve ark. [13] yöntemine uygun olarak Durak ve ark. [14] modifikasyonuna göre gerçekleştirildi. Bu yöntemde SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur ve 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Enzim olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi–mor renk oluşmaktadır. Fakat ortamda SOD olduğunda NBT indirgenemeyip mavi–mor renk oluşmadığı durumda

ise, enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Enzim bulunmayan kör değeri ile enzim bulunan numune absorbans değerleri hesaba katılarak enzimin % inhibisyonu hesaplandı. NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi bir SOD ünitesi olarak kabul edildi. SOD aktivitesi; akciğer dokusu ve diafragma için U/mg protein, plazma için U/mL olarak saptandı. SOD ölçümü için kullandığımız yöntemde LOD 0,45 U/mL ve LOQ ise 5,06 U/mL idi. LOQ sınırının üzerindeki örnekler dilüsyon yapılarak çalışıldı.

İstatistiksel değerlendirme

Gruplardan elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarıldı. SPSS (11,0 for windows) programı ile istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. Tüm veriler ortalama ± SS olarak belirtildi. Gruplar arası biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılmasında one-way ANOVA ve post hoc Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak kabul edildi.

Bulgular

Hiçbir hayvan enfeksiyon yüzünden çalışmadan çıkarılmadı. Her iki deneysel grupta 24 saat MV uygulaması sonrasında hayvanların başlangıç ve son vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p>0,05). Bu sonuçlar sıçanlara uyguladığımız sıvı ve beslemenin yeterli olduğunu gösterdi. MV protokolümüzün dengeli sürdürmede başarılı olup olmadığını tespit etmek için MV periyodu boyunca monitorize ettiğimiz arteriyel kan basıncı ve kalp hızı fizyolojik aralık içinde sürdü.

Diaframadaki Oksidatif Stres

Kontrol, plasebo ve teofilin gruplarında diafragma dokusunda ölçülen oksidatif stres belirteçlerinin aktivite ve seviyeleri Tablo 1'de özetlenmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MV uygulanan plasebo grubunda (grup 2) SOD ve XO aktiviteleri ile NO seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık gösteren belirgin artış mevcuttu (p<0,05). MDA seviyesinde de artış eğilimi olmasına rağmen bu artış istatistiksel anlamlılık sınırları içerisinde değildi (p>0,05). Teofilin verilen grup 3'de ise MDA seviyesi ve XO aktivitesindeki artışın hafiflediği, SOD aktivitesi ve NO seviyesindeki artışın devam ettiği saptandı. Plasebo grubuyla karşılaştırıldığında teofilin alan grupta sadece SOD aktivitesindeki artış anlamlılık gösterirken (p<0,05), NO seviyesindeki artış ile MDA seviyesi ve XO aktivitesindeki azalma istatistiksel anlamlılık göstermiyordu (p>0,05).

Akciğer Dokusundaki Oksidatif Stres

Kontrol, plasebo ve teofilin gruplarında akciğer dokusunda ölçülen oksidatif stres belirteçlerinin aktivite ve seviyeleri Tablo 2'de özetlenmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MV uygulanan plasebo grubunda (grup 2) SOD ve XO aktiviteleri ile MDA ve NO seviyelerinde artış olmasına rağmen sadece XO aktivitesindeki artış istatistiksel anlamlılık gösteriyordu (p<0,05). Teo-

Tablo 1: Diafragma dokusundaki oksidatif stres belirteçlerinin gruplar arasındaki dağılımı

	Kontrol (ort. ± SS)	MV (ort. ± SS)	MV + Teofilin (ort. ± SS)
MDA (nmol /g yaş doku)	3.83 ± 0.54	5.78 ± 3.86	4.37 ± 2.19
NO (μmol/g protein)	0.05 ± 0.01	0.14 ± 0.09 ^a	0.24 ± 0.14
XO (U/g protein)	0.61 ± 0.46	1.76 ± 0.98 ^a	1.37 ± 0.52
SOD (U/mg protein)	0.010 ± 0,01	0.074 ± 0.02 ^a	0.096 ± 0.03 ^b

MDA: malondialdehit, NO: nitrik oksit, SOD: superoksit dismutaz, XO: ksantin oksidaz
^ap < 0.05: kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; ^b p < 0.05: MV grubuyla karşılaştırıldığında

Tablo 2: Akciğer dokusundaki oksidatif stres belirteçlerinin gruplar arasındaki dağılımı

	Kontrol (ort. ± SS)	MV (ort. ± SS)	MV + Teofilin (ort. ± SS)
MDA (nmol /g yaş doku)	6.06 ± 1.37	7.32 ± 2,27	5.51 ± 1.01
NO (μmol/g protein)	0.21 ± 0.05	0.28 ± 0.11	0,36 ± 0, 13
XO (U/g protein)	0.36 ± 1.16	2.26 ± 1.61 ^a	0.39 ± 0.23 ^b
SOD (U/mg protein)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.04

MDA: malondialdehit, NO: nitrik oksit, SOD: superoksit dismutaz, XO: ksantin oksidaz
^ap < 0.05: kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; ^bp < 0.001: MV grubuyla karşılaştırıldığında

filin verilen grup 3'de ise MDA seviyesi ve XO aktivitesindeki artışın hafiflediği, SOD aktivitesi ve NO seviyesindeki artışın devam ettiği saptandı. Teofilin verilen grupta XO aktivitesi kontrol grubunun XO aktivitesine yakın değerdeydi. Plasebo grubuyla karşılaştırıldığında teofilin alan grupta sadece XO aktivitesindeki azalma anlamlılık gösterirken (p<0,001), MDA seviyesindeki azalma, SOD aktivitesi ve NO seviyelerindeki artış istatistiksel anlamlılık göstermiyordu (p>0,05).

Sistemik Oksidatif Stres

Kontrol, plasebo ve teofilin gruplarında plazmada ölçülen oksidatif stres belirteçlerinin aktivite ve seviyeleri Tablo 3'de özetlenmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MV uygulanan plasebo grubunda SOD ve XO aktiviteleri ile MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlılık gösteren belirgin artış mevcuttu (p<0,05). NO seviyesinde de artış eğilimi olmasına rağmen bu artış istatistiksel anlamlılık sınırları içerisinde değildi (p>0,05). Teofilin verilen grup 3'de ise MDA seviyesi ve XO aktivitesindeki artışın hafiflediği, SOD aktivitesi ve NO seviyesindeki artışın devam ettiği saptandı. Teofilin verilen grupta MDA seviyesi kontrol grubununkine benzerdi. Plasebo grubuyla karşılaştırıldığında teofilin alan grupta MDA seviyesindeki azalma (p<0,001) ve NO seviyelerindeki artış (p<0,05) anlamlılık gösterirken, XO aktivitesindeki azalma ve SOD aktivitesindeki artış istatistiksel anlamlılık göstermiyordu (p>0,05).

Tartışma

İskelet kaslarında oksidatif stresin, kasın kasılma gücünde bozulmaya sebep olduğu iyi bilinmektedir. Birçok araştırmacı oksidatif stresin maksimum frekanslardaki uygulanan elektriksel uyarılara rağmen kasın kasılma gücünü azalttığını göstermiştir [15]. Teorik olarak serbest oksijen radikallerinin üretiminin kontraktıl kaslarda daha yüksek düzeylerde, hareketsiz kaslarda daha düşük düzeylerde olması beklenmesine rağmen, ilk olarak Konda ve ark. [16] hareketsiz iskelet kaslarında da oksidatif hasarın oluştuğunu ve bu hasarın kas atrofisine katkısı olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak kontrollü MV (KMV) modunda MV süresince hem sağ hem de sol diafragma kasılmaz ancak MV'a bağlı olarak akciğerlerin mekanik genişlemesi nedeniyle diafragmanın kas lifleri tekrarlayan pasif kısalmaya maruz kalırlar [17,18]. Günümüzde oksidan ürünün tipi ve üretim hızının, mekanik olarak inaktif ve pasif kısalan diafragma kasında, hareketsiz iskelet kaslarındakilere benzer olup olmadığı halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak son yıllarda yapılan birçok deneysel çalışmada KMV uygulanması sonucu gelişen VBDD gelişmesinde serbest oksijen radikallerinin önemli yeri olduğu gösterilmiştir [2,3,6,19,20]. Benzer olarak biz de kendi deneysel çalışmamızda kontrollü modda MV uygulamasının sıçan diafragmasında serbest oksijen radikallerinin üretimine neden olduğunu gösterdik. Ayrıca diafragmadaki oksidatif yangıya ilave olarak akciğer dokusunda ve

Tablo 3: Plazmadaki oksidatif stres belirteçlerinin gruplar arasındaki dağılımı

	Kontrol (ort. ± SS)	MV (ort. ± SS)	MV + Teofilin (ort. ± SS)
MDA (nmol /L)	0.35 ± 0.12	1.09 ± 0.18 ^a	0.36 ± 0.96 ^b
NO (µmol/L)	19.3 ± 8.6	22,3 ± 5,1	29.7 ± 4.5 ^c
XO (U/mL)	7.76 ± 1.29	14.04 ± 1.40 ^a	12.42 ± 1.44
SOD (U/mL)	2.06 ± 0.81	5.24 ± 0,70 ^a	5.76 ± 2.05

MDA: malondialdehit, NO: nitrik oksit, SOD: superoksit dismutaz, XO: ksantin oksidaz

^ap < 0.05: kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; ^bp < 0.001: MV grubuyla karşılaştırıldığında; ^cp < 0.05: MV grubuyla karşılaştırıldığında

plazmada da serbest oksijen türevlerinde artış olduğunu saptadık.

Günümüzde VBDD'nun oksidatif stresle direkt olarak ilişkili olduğu açık olarak ortaya konulmuştur. KMV, diafragmanın kas liflerinde oksidize proteinlerin artmasına sebep olur. VBDD gelişiminde bu artmış protein oksidasyonu önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü orta derecede oksidize olmuş proteinler proteazlar tarafından proteolitik bozulmaya daha fazla duyarlıdır [21,22]. Bu nedenle proteinlerin oksidatif modifikasyonu diafragma kas liflerinde protein yıkılışını hızlandırmakta ve bu proteolitik yıkım diafragma atrofisi ile sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda da MV uygulanan sıçanların diafragmasında kontrol grubuna göre XO aktivitesi ve NO seviyesindeki anlamlı artışın olması, MV'a bağlı diafragmadaki oksidatif hasarın protein oksidasyonu yoluyla olduğunu düşündürmektedir.

MV'a bağlı diafragmatik oksidatif hasardan sorumlu oksidan üretim yolları hala tam olarak bilinmemektedir. Whidden ve ark. [23] yaptıkları deneysel çalışmada MV'a bağlı olarak sıçanların diafragmasında XO aktivitesinin arttığını ve bir XO inhibitörü olan oksipürinolonun bu aktivite artışını hafiflettiğini, dolayısıyla XO yolağının diafragmatik oksidatif hasara önemli katkısının olduğunu vurgulamışlardır. Benzer şekilde Lawler ve ark. [24] sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, artmış XO aktivitesinin önemli derecede yorulmuş diafragmada seyirme ve düşük frekans gerilimini baskıladığını göstermişlerdir. Yine Vina ve ark. [25] yaptıkları bir çalışmada hem sıçanlarda hem de insanlarda artmış XO aktivitesinin yorucu egzersiz süresince doku hasarı ve serbest radikal üretiminden sorumlu olduğunu ispatlamışlardır. Ksantin oksidoredüktaz (XOR) pürin katabolizmasında rol oynayan hücre içi bir enzimdir. Bu enzim spesifik olarak hipoksantin ve ksantin ürik asite indirgenmesini katalize eder. XOR'ın ksantin dehidrogenaz (XDH) ve XO olmak üzere başlıca iki formu vardır. XDH pürin katabolizmasında elektron alıcı olarak NAD⁺'ı kullanırken XO elektron alıcı olarak moleküler oksijeni kullanır ve hipoksantin-ksantini ürik asit ve süperoksite indirger. Bu yolla iskelet kasında XO seviyesine bağlı olarak bir oksijen serbest radikali olan süperoksit seviyesi artar [26]. SOD enzimi süperoksit

radikalini zararsız hale getirir. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD'dır. Hücre içinde mitokondiride doğal olarak bulunan bir enzim olan SOD, süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidroksi peroksid formuna çevirir. Böylece hücresel bölmelerdeki süperoksit düzeylerini kontrol ederek önemli bir savunma sağlar [27]. Caillaud ve ark. [28] sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, iskelet kasıyla karşılaştırıldığında hem akciğer hem de diafragmada SOD ve glutasyon peroksidaz aktivitelerinin bazal değerden daha yüksek bulmuşlardır. Akciğer ve diafragmanın antioksidan kapasitesinin iskelet kas sisteminden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Supinski ve ark. [29] yaptıkları bir çalışmada, serbest radikal tüketicilerin (polietilen glikol emdirilmiş SOD) önceden uygulanmasının düşük frekans uyarısı ile oluşan diafragma yorgunluğunu önlediğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da, MV uygulanan sıçanların diafragmalarında XO ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak artmıştı. Bu sonuç ise diafragmadaki oksidatif stresin XO yolağı üzerinden süperoksit radikallerinin üretimini artışı ile sağlandığını desteklemektedir.

Çalışmamızda ekstraselüler örneklerde SOD ölçümü için kullanmış olduğumuz Sun ve ark.'nın [13] metodunda reaksiyonu durdurmak için kullanılan CuCl₂ peptit bağları ile reaksiyon verebilmektedir. Metoda bağlı yanlıktan kurtulabilmek amacıyla çalışmamızda ekstraselüler örneklerde SOD ölçümü için Durak ve ark.'nın [14] geliştirdikleri modifikasyonu kullandık. Ayrıca çalışmamız vaka ve kontrol grupları arasındaki farkı incelemektedir. Dolayısıyla, CuCl₂'ün sebep olacağı peptit bağlarına bağlı renklendirmeden her üç deney grubu da aynı oranda etkilenebileceği için metoda bağlı yanlıktan kurtulduğumuzu söyleyebiliriz.

Hem hayvan hem insan çalışmalarında teofilinin etkisi araştırıldığında diafragma kasında kasılma gücünü artırdığı gösterilmiş ve bu artmanın tam mekanizması açıklanamamıştır. Kemirgenlerde yapılan *in vitro* çalışmalarda teofilinin diafragma kasında kasılma gücünü düzelttiği ve yorgunluğa karşı koruyucu bir etki yapabileceği gösterilmiştir [30,31]. Teofilinin birçok etkisi ve yan etkisi olduğu iyi bilinmesine karşın, antioksidan bir özelliğe sahip olup olmadığı bilinmemektedir ve li-

teratür taramasında da antioksidan özelliğinin olduğunu gösteren verilere rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda, teofilin verilen sıçanlarda diafragma, akciğer dokusunda ve plazmada oksidatif stresin baskılandığını gözlemledik. Teofilin verilen grupta antioksidan bir enzim olan SOD aktivitesindeki artışın anlamlılık göstererek devam etmesi, XO aktivitesindeki artışın hafifleme eğiliminde olması, teofilinin diafragmadaki oksidatif stresi SOD üzerinden oluşmuş süperoksit radikalini temizleyerek ve XO aktivitesini baskılayıp süperoksit üretimini azaltarak hafifletmiş olabileceğini düşündürmektedir. Teofilin verilen sıçanlarda MV'a bağlı diafragmatik oksidatif stresin tam olarak bloke edilemediği gözlemlenmiştir. Bu durum verilen teofilin dozu ve teofilin verme süresiyle ilişkili olabileceği gibi, diafragmada serbest oksijen radikallerini üreten ve teofilin ile baskılanamayan aktif başka yolların olabileceğini akla getirmektedir. Çalışmamızda, MV uygulanan sıçanların hem diafragma dokusunda hem de akciğer dokusu ve plazmalarında NO seviyesinin arttığını saptadık. İlginç olarak, teofilin verilen sıçanlarda NO seviyesindeki bu artışın, diafragma, akciğer ve plazmanın her üçünde de devam ettiğini, XO gibi teofilin tarafından baskılanmadığını gözlemledik. Frank ve ark. [32] yüksek volümlü ventile olan sıçanların diafragmasında NO sentetaz aktivitesinin 3 kat arttığını göstermişlerdir. Zhu ve ark. [33] NO'in in vitro sıçan diafragmasının izometrik kasılmasını azalttığını bildirmişlerdir. Albertini ve ark. [34] yaptığı bir çalışmada endojen NO üretimini bloke eden L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester) uygulamasından sonra diafragmatik gücün zayıfladığını, ancak hem L-NAME hem de sodyum nitroprussid (NO'in bir vericisi) uygulandığında diafragmatik dayanıklılık kapasitesinde önemli bir azalma olduğunu saptamışlardır. Van Gammeren ve ark. [19] ise sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada 18 saatlik MV'un sıçanların diafragmalarında endotelial NO, NO sentetaz ya da nöronal NO sentetazın protein seviyelerinde bir artışa neden olmadığını göstermişlerdir. Çalışmamızda lipid peroksidasyonun önemli son ürünlerinden olan MDA seviyesindeki artışın MV uygulanan sıçanların diafragmasında kontrol grubuna göre anlamlılık göstermemesi, MV'a bağlı diafragmadaki oksidatif hasarda lipid peroksidasyonunun önemli bir yeri olmadığı fikrini vermektedir. MV'a bağlı diafragmadaki oksidatif streste lipid peroksidasyonunun rolü halen tartışmalı bir konu olup, her ne kadar genel fikir lipid peroksidasyonunun katkısı olduğu yönünde olsa da bu konuda henüz tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Çalışmamızla benzer olarak Caillaud ve ark. [28] sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada diafragmada MDA konsantrasyonlarının önemli derecede değişmediğini bildirirken, Supinski ve ark. [29] diafragma dokusunda serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan tiobarbiturik asit reaktif substanslarının azaldığını ve diafragma yorulğunun gelişme hızını azalttığını rapor etmişlerdir. Yine birçok deneysel çalışmada lipid peroksidasyonunun

MV'a bağlı diafragmadaki oksidatif strese katkısının olduğu bildirilmiştir [2-4,23]. Çalışmamızda MV uygulanan sıçanların diafragmalarında MDA seviyesinde artış olmamasına rağmen, plazma MDA seviyelerinde istatistiksel anlamlılık gösteren artış olmuştur.

Powers ve ark. [17] VBDD'nun başlangıçta hızla geliştiğini (12 saat) ve kasılma gücündeki bu bozulmanın ventilatörde geçen zamanla özellikle ilk 24 saatlik MV süresince ilerlediğini ortaya koymuşlardır. Bu nedenle bizim bu deneysel çalışmamızda, KMV süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu deneysel çalışmada sıçan modelini seçmemizin iki sebebi vardır. Birincisi erişkin sıçanların cerrahi işlemler için yeterli büyüklükte olmaları, ikincisi ve daha önemli olanı ise insan ve sıçan diafragmalarının anatomik özellikler, fonksiyon ve kas lifi tipi açısından benzer özelliklerde olmalarıdır [35,36]. Anestetik ilaç olarak sodyum pentobarbitalin seçilmesinin sebebi ise bu anestezi maddenin oksidatif hasarı artırıcı etkisinin olmadığını daha önceki çalışmalarla kanıtlanmış olmasıdır [3,17,37].

Sonuç olarak bu çalışmada birçok yeni ve önemli bulgular ortaya konulmuştur. Bunlar sırasıyla; 1- sıçanlarda 24 saatlik MV uygulanmasına bağlı olarak oluşan diafragmatik oksidatif strese, akciğer ve sistemik oksidatif stresler de eşlik etmektedir, 2- diafragmadaki oksidatif hasar ağırlıklı olarak protein oksidasyonu yoluyla olmaktadır, 3- diafragmadaki bu oksidatif hasar birden fazla yolakla olmaktadır, ancak bunlar içerisinde baskın olan XO yolağıdır, 4- teofilin hem diafragma dokusunda hem de akciğer dokusu ve plazmada oksidatif stresi baskılamaktadır, 5- teofilinin diafragmadaki oksidatif stresi SOD üzerinden oluşmuş süperoksit radikalini temizleyerek ve XO aktivitesini baskılayıp süperoksit üretimini azaltarak hafifletmiş olabileceği kuvvetle muhtemeldir. Ancak bu konuyla ilgili daha çok sayıda ve moleküler düzeyde hayvan ve insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Etik Konular

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi şartlarında, Deney Hayvanları Etik Kurulunun 10/02/2006 tarih ve 01 sayılı kararı ile gerçekleştirilmiştir.

Bilgi ve Teşekkür

Yazarlardan Nihal Bakırkalay Aydın ve Kemal Başaralı'nın güncel çalışma adresleri, sırasıyla Isparta Devlet Hastanesi Göğüs Hastalıkları Servisi, Isparta ve Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Diyarbakır'dır.

Bu çalışma 4. Ulusal Dahili ve Cerrahi Yoğun Bakım Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Tobin MJ. (2001) Advances in mechanical ventilation. *N Engl J Med* 344(26):1986-96.
- [2] Zergeroglu MA, McKenzie MJ, Shanely RA, Van Gammeren D, DeRuisseau KC, *et al.* (2003) Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J Appl Physiol* 95(3):1116-24.
- [3] Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, *et al.* (2002) Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 166(10):1369-74.
- [4] Shanely RA, Van Gammeren D, DeRuisseau KC, Zergeroglu AM, McKenzie MJ, *et al.* (2004) Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 170(9):994-9.
- [5] McClung JM, Kavazis AN, Whidden MA, DeRuisseau KC, Falk DJ, *et al.* (2007) Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *J Physiol* 585(Pt 1):203-15.
- [6] Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, *et al.* (2004) Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 170(11):1179-84.
- [7] Gayan-Ramirez G, Decramer M. (2002) Effects of mechanical ventilation on diaphragm function and biology. *Eur Respir J* 20(6):1579-86.
- [8] Vassilakopoulos T, Petrof BJ. (2004) Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 169(3):336-41.
- [9] Aubier M. (1986) Effect of theophylline on diaphragmatic and other skeletal muscle function. *J Allergy Clin Immunol* 78(4 Pt 2):787-92.
- [10] Aubier M, Murciano D, Viires N, Lecocquic Y, Palacios S, *et al.* (1983) Increased ventilation due to improved diaphragmatic efficiency during aminophylline infusion. *Am Rev Respir Dis* 127:148-54.
- [11] Wasowicz W, Neve S, Peretz A. (1993) Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 39(12):2522-6.
- [12] Prajda N, Weber G. (1975) Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett* 59(2):245-9.
- [13] Sun Y, Oberley LW, Li Y. (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34(3):497-500.
- [14] Durak I, Yurtarslanı Z, Canbolat O, Akyol O. (1993) A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta* 214(1):103-4.
- [15] Reznick AZ, Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-63.
- [16] Kondo H, Miura M, Nakagaki I, Sasaki S, Itokawa Y. (1992) Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 262(5 Pt 1):E583-90.
- [17] Powers SK, Shanely RA, Coombes JS, Koesterer TJ, McKenzie M, *et al.* (2002) Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J Appl Physiol* 92(5):1851-8.
- [18] Froese AB, Bryan AC. (1974) Effects of anesthesia and paralysis on diaphragmatic mechanics in man. *Anesthesiology* 41(3):242-55.
- [19] Van Gammeren D, Falk DJ, Deering MA, DeRuisseau KC, Powers SK. (2007) Diaphragmatic nitric oxide synthase is not induced during mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 102(1):157-62.
- [20] McClung JM, Whidden MA, Kavazis AN, Falk DJ, DeRuisseau KC, *et al.* (2008) Redox regulation of diaphragm proteolysis during mechanical ventilation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(5):R1608-17.
- [21] Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324(Pt 1):1-18.
- [22] Nagasawa T, Hatayama T, Watanabe Y, Tanaka M, Niisato Y, *et al.* (1997) Free radical-mediated effects on skeletal muscle protein in rats treated with Fe-nitrosotriacetate. *Biochem Biophys Res Commun* 231(1):37-41.
- [23] Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, Hudson MB, Smuder AJ, *et al.* (2009) Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol* 106(2):385-94.
- [24] Lawler JM, Cline CC, Hu Z, Coast JR. (1997) Effect of oxidant challenge on contractile function of the aging rat diaphragm. *Am J Physiol* 272(2 Pt 1):E201-7.
- [25] Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, *et al.* (2000) Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB life* 49(6):539-44.
- [26] Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 33(6):774-97.
- [27] Akkuş İ. (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, s. 32-61, Mimoza Yayın, Konya.
- [28] Caillaud C, Py G, Eydoux N, Legros P, Prefaut C, *et al.* (1999) Antioxidants and mitochondrial respiration in lung, diaphragm, and locomotor muscles: effect of exercise. *Free Radic Biol Med* 26(9-10):1292-9.
- [29] Supinski G, Nethery D, Stofan D, DiMarco A. (1997) Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue. *Am J Respir Crit Care Med* 155(2):622-9.
- [30] Viires N, Aubier M, Murciano D, Marty C, Pariente R. (1986) Effects of theophylline on isolated diaphragmatic fibers. A model for pharmacologic studies on diaphragmatic contractility. *Am Rev Respir Dis* 133(6):1060-4.
- [31] Kuei JH, Sieck GC. (1991) Chronic aminophylline administration. Effect of diaphragm contractility and fatigue resistance *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 144(1):121-5.
- [32] Frank JA, Wray CM, McAuley DF, Schwendener R, Matthay MA. (2006) Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(6):L1191-8.
- [33] Zhu X, Heunks LM, Ennen L, Machiels HA, Dekhuijzen PN. (2003) Role of nitric oxide in isometric contraction properties of rat diaphragm during hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 88(4-5):417-26.
- [34] Albertini M, Lafortuna C, Aguggini G. (1997) Effects of nitric oxide on diaphragmatic muscle endurance and strength in pigs. *Exp Physiol* 82(1):99-106.
- [35] Mizuno M. (1991) Human respiratory muscles: fibre morphology and capillary supply. *Eur Respir J* 4(5):587-601.
- [36] Powers SK, Demirel HA, Coombes JS, Fletcher L, Calliaud C, *et al.* (1997) Myosin phenotype and bioenergetic characteristics of rat respiratory muscles. *Med Sci Sports Exerc* 29(12):1573-9.
- [37] Shanely RA, Coombes JS, Zergeroglu AM, Webb AI, Powers SK. (2003) Short-duration mechanical ventilation enhances diaphragmatic fatigue resistance but impairs force production. *Chest* 123(1):195-201.