

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

KRİTİK HASTALIK MİYOPATİSİ MODELİNDE PLAZMA VE  
KAS TNF- $\alpha$  DÜZEYLERİNİN MİYOPATİ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ  
VE ANTİ-TNF- $\alpha$  AJANLARININ KRİTİK HASTALIK MİYOPATİSİ  
TEDAVİSİNDEKİ YERİ

Dr. Amber EKER

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2010

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

KRİTİK HASTALIK MİYOPATİSİ MODELİNDE PLAZMA VE  
KAS TNF- $\alpha$  DÜZEYLERİNİN MİYOPATİ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ  
VE ANTİ-TNF- $\alpha$  AJANLARININ KRİTİK HASTALIK MİYOPATİSİ  
TEDAVİSİNDEKİ YERİ

Dr. Amber EKER

UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ersin TAN  
Prof. Dr. Sevim ERDEM ÖZDAMAR

ANKARA  
2010

## TEŞEKKÜR

Nöroloji asistanlığına başladığım ilk günden itibaren güvenini ve desteğini hep yanımda hissettiğim, her zaman görüşlerime değer veren ve daha motive şekilde çalışmalarına devam etmemi sağlayan Prof. Dr. Ersin Tan’a,

Tez çalışmamın her aşamasında çok büyük desteği ve emeği olan, kendisinden çok şey öğrendiğim ve örnek aldığım Prof. Dr. Sevim Erdem Özdamar’a,

Tezimin planlanması aşamasında tüm nezaketi ile beni kabul eden ve fikirleri ile yön veren Prof. Dr. Ayşen Akıncı Tan’a,

Tez çalışmalarım sırasında her zaman fikirleri ile beni yönlendiren, her durumda yardımı ve emeği ile yanımda olan Dr. Çağrı Mesut Temuçin’e,

Biyokimyasal çalışmaları gerçekleştiren Dr. Ebru Bodur’a,

Asistanlığa ve tez çalışmama ilk adımda yanımda olan, karşılıksız özverisi ve daha birçok özelliği ile tanımaktan mutluluk duyduğum Dr. Gül Yalçın Çakmaklı’ya,

En umutsuz olduğum anda cerrahi becerisi ile yaptığı müdahaleyle tezime hayat veren Dr. Tevfik Eker’e,

Nöromusküler Araştırma Laboratuvarı’ndaki çalışmalarım sırasında yardımları ve desteği için Sayın Bülent Çakır’a,

Tez çalışmam sırasında her sorunumda fikirleri ve yardımları ile içtenlikle yanımda olan Sayın Güliz Sayat’a,

Başta Vet.Hek. İlyas Onbaşılar ve Hüseyin Konukçu olmak üzere, Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Birimi ile Cerrahi Araştırmalar Birimi personeline,

İstatistik çalışmaları konusundaki yardımı nedeniyle Dr. Eda Öztürk’e,

Her birinden ayrı ayrı nöroloji ve doktorluk sanatı adına birçok şey öğrendiğim tüm hocalarıma ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, dostluklarıyla hep yanımda olan başta Dr. Gökçem Yıldız ve Dr. Özlem Çelebi olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında sonsuz destek, sevgi ve güvenleri ile hep yanımda olan anneme ve babama,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Etanersept’in temini için Pfizer İlaçları Ltd.Şti.’ne teşekkür ederiz.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 010D06101010

## ÖZET

**EKER A., Kritik Hastalık Miyopatisi Modelinde Plazma ve Kas TNF- $\alpha$  Düzeylerinin Miyopati Oluşumundaki Rolü ve Anti-TNF- $\alpha$  Ajanlarının Kritik Hastalık Miyopatisi Tedavisindeki Yeri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Uzmanlık Tezi. Ankara, 2010.** Kritik Hastalık Miyopatisi (KHM) yoğun bakımda 1 haftadan uzun süre kalış sonrası çeşitli risk faktörleri, en başta da sepsisle tetiklenen, yaygın ekstremit ve solunum kasları güçsüzlüğüne eşlik eden mekanik ventilatörden ayrılma güçlüğü ile karakterize bir klinik tablodur. Etkin bir tedavisi yoktur. Sepsis sırasında TNF- $\alpha$  artışı, kas yıkımını tetiklemekte ve kas uyarılabilirliğini azaltmaktadır. Bu bilgi bize sepsis sırasında oluşan KHM için TNF- $\alpha$ 'nın kritik molekül olduğunu ve KHM'nin TNF- $\alpha$  azaltıcı ajanlar pentoksifilin ve etanersept ile önlenebileceğini düşündürmüştür. KHM, çekal ligasyon ve ponksiyon (CLP) ile sepsisin tetiklendiği sıçanlarda incelendi. TNF- $\alpha$  seviyeleri plazma ve kastan operasyon sonrası 2. saatte ölçüldü. Sinir iletim çalışmaları 48. saatte uygulandı. Birleşik kas aksiyon potansiyelleri (BKAP) tibial sinir uyarımı ile kaydedildi. Bir gruba pentoksifilin (10mg/100gr,ip.), operasyondan 1 saat önce ve takip eden 6 gün boyunca verildi. Diğer bir gruba etanersept (0,4 mg/kg,sc.) operasyondan 1 gün önce verildi ve 72 saat sonra tekrarlandı. Altıncı gün histopatolojik tanı ve miyozin düzeyi ölçümü için kas biyopsileri alındı. Çalışma sonucunda, hem pentoksifilin hem de etanersept gruplarında mortalite oranı CLP grubundan daha düşük bulundu. Sadece CLP uygulanan grupta kas TNF- $\alpha$  düzeylerinin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptandı. Yine bu grupta BKAP amplitüdlere anlamlı şekilde düşük bulundu. Kas biyopsisindeki ana patolojik bulgular olan lif atrofisi ve bazofili artışı en şiddetli olarak CLP grubunda izlendi. Miyozin düzeyleri CLP ve CLP+Pentoksifilin gruplarında en düşük, CLP+Etanersept grubunda da kontrol grubu ile benzer saptandı. Bu çalışma TNF- $\alpha$  antagonizmasının septik sıçanlarda mortalite hızında bir artışa yol açmadan bu süreçte oluşan nöromusküler değişiklikleri önleyebileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kritik Hastalık Miyopatisi, TNF- $\alpha$ , Çekal Ligasyon Ponksiyon, Pentoksifilin, Etanersept

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 010D06101010

## ABSTRACT

**EKER A., Role of Plasma and Muscle TNF- $\alpha$  Levels on Critical Illness Myopathy in Septic Rat Model and The Effect of Anti-TNF- $\alpha$  Treatment on Critical Illness Myopathy, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Neurology. Ankara, 2010.** Critical Illness Myopathy (CIM) is characterized with generalized and respiratory muscle weakness, accompanied with difficulty of weaning from mechanical ventilation and occurs result of many risk factors mainly sepsis after 1 week intensive care stay. There is no effective treatment. During sepsis, TNF- $\alpha$  causes muscle breakdown, also influences muscle excitability. This knowledge has led us think that TNF- $\alpha$  might be the critical molecule for CIM and CIM can be prevented by TNF- $\alpha$  decreasing agents pentoxifylline and etanercept. CIM have been searched with septic rats, induced by cecal ligation and puncture (CLP). TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were measured in plasma and muscle at 2nd hour after operation. Nerve conduction studies (NCS) performed at 48th hour. Compound muscle action potentials (CMAP) were recorded by tibial nerve stimulation. In one group Pentoxifylline (10mg/100gr,ip.), was given 1 hour before the operation and for 6 days after. In the other group etanercept (0,4 mg/kg,sc.) was given 1 day before the operation and repeated after 72 hours. Muscle biopsies performed on 6th day for histopathologic diagnosis and for detecting myosin level. This research showed that, both pentoxifylline and etanercept reduced mortality. Increased TNF- $\alpha$  levels of muscle revealed statistically significant difference from other groups in CLP group. NCS investigations revealed early decrease in CMAP amplitudes in the same group. The main findings were fiber atrophy and basophilic fiber staining mainly and more severely in CLP group muscle biopsies. Myosin levels were lowest in CLP and CLP+Pentoxifylline group and similar with control group in CLP+Etanercept group. This study showed that TNF- $\alpha$  antagonism prevented the development of the neuromuscular changes in septic rats, and did not cause any increase in mortality rate.

**Key Words:** Critical Illness Myopathy, TNF- $\alpha$ , Cecal Ligation Punction, Pentoxifyphillin, Etanercept.

This study was supported by Hacettepe University Research Fund. Project No: 010D06101010

**İÇİNDEKİLER**

|                                                   | <b><u>Sayfa</u></b> |
|---------------------------------------------------|---------------------|
| TEŞEKKÜR                                          | ii                  |
| ÖZET                                              | iii                 |
| ABSTRACT                                          | iv                  |
| İÇİNDEKİLER                                       | v                   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR                           | viii                |
| ŞEKİLLER                                          | xi                  |
| TABLolar                                          | xiii                |
| I. GİRİŞ ve AMAÇ                                  | 1                   |
| II. GENEL BİLGİLER                                | 3                   |
| II.1. Kritik Hastalık Miyopatisi                  | 3                   |
| II.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji                    | 3                   |
| II.1.2. Patofizyoloji                             | 5                   |
| II.1.2.1. Membran Uyarılabilirliğinde             |                     |
| Değişmenin Mekanizmaları                          | 7                   |
| II.1.2.2. Kontraktil Proteinlerde                 |                     |
| Proteolizin Mekanizmaları                         | 8                   |
| II.1.2.3. Sepsisle Tetiklenen                     |                     |
| Kas Yetmezliğinde Diğer Hedefler                  | 10                  |
| II.1.3. Elektrofizyolojik Bulgular                | 11                  |
| II.1.4. Histopatolojik Bulgular                   | 14                  |
| II.1.5. Tedavi                                    | 17                  |
| II.2. TNF- $\alpha$                               | 18                  |
| II.2.1. TNF- $\alpha$ ve Kas                      | 21                  |
| II.2.1.1. Kontraktil Disfonksiyon                 | 22                  |
| II.2.1.2. TNF- $\alpha$ 'nın Katabolizmadaki Rolü | 23                  |
| II.2.1.3. Miyogenetik ve Kas Adaptasyonuna        |                     |
| Etkileri                                          | 26                  |

|                                                                                 | <b><u>Sayfa</u></b> |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| II.2.2. Anti-TNF- $\alpha$ Ajanlar                                              | 27                  |
| II.2.2.1. Pentoksifilin                                                         | 27                  |
| II.2.2.2. Etanersept                                                            | 28                  |
| II.3. Miyozin                                                                   | 30                  |
| II.4. Deneysel Sepsis Modelleri                                                 | 31                  |
| III. GEREÇ ve YÖNTEM                                                            | 32                  |
| III.1. Deney Hayvanları                                                         | 32                  |
| III.2. Model Oluşturulması ve Takibi                                            | 32                  |
| III.3. Pentoksifilin ve Etanersept Uygulanması                                  | 33                  |
| III.4. Elektronöromiyografik İnceleme                                           | 33                  |
| III.5. TNF- $\alpha$ 'nın Plazma ve Kasta Tayini                                | 33                  |
| III.5.1. Örneklerin hazırlanması                                                | 33                  |
| III.5.2. TNF- $\alpha$ tayini                                                   | 34                  |
| III.6. Miyozin Düzeyi Ölçümü                                                    | 35                  |
| III.6.1. Kas protein tayini                                                     | 35                  |
| III.6.2. Miyozin ağır zincir oranlarının incelenmesi                            | 35                  |
| III.7. Biyopsi İncelenmesi                                                      | 36                  |
| III.8. İstatistiksel Analiz                                                     | 37                  |
| IV. BULGULAR                                                                    | 41                  |
| IV. 1. Model oluşturulması                                                      | 41                  |
| IV. 2. Mortalite yüzdesi ve septik bulguların<br>takibinin değerlendirilmesi    | 41                  |
| IV.3. İkinci saat plazma ve kas TNF- $\alpha$ düzeylerinin<br>karşılaştırılması | 45                  |
| IV.4. Elektrofizyolojik bulguların değerlendirilmesi                            | 46                  |
| IV.5. Biyopsi bulgularının değerlendirilmesi                                    | 48                  |
| V. TARTIŞMA                                                                     | 57                  |
| VI. SONUÇLAR                                                                    | 64                  |

|                                                                               | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| VII. ÖNERİLER                                                                 | 65                  |
| VIII. KAYNAKLAR                                                               | 66                  |
| IX. EKLER                                                                     | 82                  |
| IX.1. EK 1: Deney Hayvanları Etik Kurulu onamı                                | 82                  |
| IX.2. EK 2: Deney hayvanlarında gözlenen septik<br>bulguların örnek resimleri | 83                  |



**SİMGELER VE KISALTMALAR**

|                    |                                    |
|--------------------|------------------------------------|
| ABD:               | Amerika Birleşik Devletleri        |
| Ach:               | Asetilkolin                        |
| AChR:              | Asetilkolin Reseptörü              |
| AIDS:              | Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu |
| AP-1:              | Aktive Edici Protein               |
| ATP:               | Adenozin Trifosfat                 |
| ATPaz:             | Adenozin Trifosfataz               |
| BKAP:              | Birleşik Kas Aksiyon Potansiyeli   |
| BSA:               | Sığır Serum Albumin                |
| Ca <sup>+2</sup> : | Kalsiyum iyonu                     |
| cAMP:              | Siklik Adenozin Monofosfat         |
| CK:                | Kreatin Kinaz                      |
| CLP:               | Çekal Ligasyon ve Ponksiyon        |
| cNOS:              | Temel Nitrik Oksit Sentaz          |
| COX:               | Sitokrom oksidaz                   |
| DIC:               | Yaygın Damar İçi Pıhtılaşma        |
| DNA:               | Deoksiribonükleik Asit             |
| DSAP:              | Duyu Sinir Aksiyon Potansiyeli     |
| ECL:               | Güçlendirilmiş Kimyasal Işıldama   |
| EDTA:              | Etilen Diamin Tetra Asetik Asit    |
| EKG:               | Elektrokardiyografi                |
| ELISA:             | Enzim Bağlı İmmün Test             |
| EMG:               | Elektromiyografi                   |
| ENMG:              | Elektronöromiyografi               |
| FADD:              | Fas ile ilişkili ölüm bölgesi      |
| FDA:               | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi      |
| GLUT 4:            | Glukoz Taşıyıcı 4                  |
| HCl:               | Hidroklorik                        |
| IFN:               | İnterferon                         |
| IGF:               | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü     |

IHC: İmmünohistokimya

I- $\kappa$ B: İnhibitör Kappa B

IL-1: İnterlökin 1

IL-6: İnterlökin 6

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

JNK: Jun-N-terminal kinazları

K<sup>+</sup>: Potasyum iyonu

kD: Kilo Dalton

KHN: Kritik Hastalık Nöropatisi

KHM: Kritik Hastalık Miyopatisi

L: Litre

LPS: Lipopolisakkarid

M: Mol

MAP: Mitojen Aktive Eden Protein

MHC: Miyozin Ağır Zincir

mRNA: Haberci Ribonükleik Asit

mTNF: Membranöz Tümör Nekrozis Faktör

MÜAP: Motor Ünite Aksiyon Potansiyeli

Na<sup>+</sup>: Sodyum iyonu

NaCl: Sodyum Klorür

NADH: Hidroksi Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NF- $\kappa$ B: Nükleer Faktör Kappa B

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

PAF: Platelet Aktive Edici Faktör

PGE2: Prostaglandin E2

pH: Hidrojen Gücü

RIP: Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz

RNS : Reaktif Nitrojen Ürünleri

ROS: Reaktif Oksijen Ürünleri

RYR: Riyanodin Reseptörü

SDH: Süksinat Dehidrojenaz

SDS-PAGE: Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SIRS: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu

SRF: Serum Cevap Faktörü

sTNF: Çözünür Tümör Nekrozis Faktör

TACE: Tümör Nekrozis Faktör Dönüştürücü Enzim

TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TNFR1: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1

TNFR2: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 2

TRADD: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör İlişkili Ölüm Bölgesi

TRAF2: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör İlişkili Faktör 2

Ubq: Ubikütin

V: Volt

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

## ŞEKİLLER

|                                                                                                              | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Şekil 1:</b> Steroid ve sepsisin $\text{Na}^+$ kanalı ve kas ineksitabilitesine etkisi                    | 8                   |
| <b>Şekil 2:</b> Sitokinler ve miyozin yıkımının mekanizmaları                                                | 9                   |
| <b>Şekil 3:</b> SIRS sırasında miyofibril yıkımı ve kontraktıl disfonksiyon mekanizmaları                    | 10                  |
| <b>Şekil 4:</b> Kritik hastalık miyopatisi elektrofizyolojik bulguları                                       | 13                  |
| <b>Şekil 5:</b> Kritik hastalık miyopatisi kas biyopsi örnekleri                                             | 15                  |
| <b>Şekil 6:</b> $\text{TNF-}\alpha$ aktifleştirilmesi ve reseptör bağlanması sonrası sinyalizasyon aşamaları | 18                  |
| <b>Şekil 7:</b> $\text{TNF-}\alpha$ homotrimerik yapısı                                                      | 19                  |
| <b>Şekil 8:</b> $\text{TNF-}\alpha$ reseptör sonrası sinyal basamakları                                      | 20                  |
| <b>Şekil 9:</b> $\text{TNF-}\alpha$ koagülan ve antifibrinolitik etkileri                                    | 21                  |
| <b>Şekil 10:</b> $\text{TNF-}\alpha$ 'nın reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri üzerinden etkileri            | 23                  |
| <b>Şekil 11:</b> $\text{TNF-}\alpha$ 'nın reaktif oksijen ürünleri ve transripsiyon faktörlerine etkisi      | 23                  |
| <b>Şekil 12:</b> Etanersept moleküler yapısı                                                                 | 29                  |
| <b>Şekil 13:</b> Miyozin protein yapısı                                                                      | 30                  |
| <b>Şekil 14:</b> Çekal Ligasyon ve Ponksiyon Prosedürü                                                       | 39-40               |
| <b>Şekil 15:</b> Yaşam çizelgesi                                                                             | 42                  |
| <b>Şekil 16-1:</b> Grupların 6 günlük kilo takip çizelgesi                                                   | 43                  |
| <b>Şekil 16-2:</b> Grupların 14 günlük kilo takip çizelgesi                                                  | 43                  |
| <b>Şekil 17:</b> Vücut sıcaklığı takip çizelgesi                                                             | 44                  |
| <b>Şekil 18:</b> $\text{TNF-}\alpha$ plazma ve kas düzeyleri                                                 | 45                  |
| <b>Şekil 19:</b> Grup II ENMG incelemesi örnekleri                                                           | 47                  |
| <b>Şekil 20:</b> Kas hematoksilen ve eozin boyama örnekleri                                                  | 50-51               |
| <b>Şekil 21:</b> Kas miyozin ağır zincir immünhistokimya ve NADH boyama örnekleri                            | 52                  |
| <b>Şekil 22:</b> Sinir biyopsisi örnekleri                                                                   | 53                  |

|                                                                                              | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Şekil 23-1:</b> Kas miyozin ağır zincir-hızlı formun<br>Western-Blot yöntemi ile tesbiti  | 54                  |
| <b>Şekil 23-2:</b> Kas miyozin ağır zincir-hızlı form yoğunluğunun<br>gruplara göre dağılımı | 54                  |
| <b>Şekil 23-3:</b> Kas TNF- $\alpha$ ve miyozin ağır zincir düzeyleri                        | 55                  |

**TABLolar**

|                                                                                  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Tablo 1:</b> Kritik Hastalık Miyopatisi Risk Faktörleri ve Etki Mekanizmaları | 6                   |
| <b>Tablo 2:</b> Çalışma planının zamansal özeti                                  | 38                  |
| <b>Tablo3:</b> Grupların mortalite yüzdeleri                                     | 42                  |
| <b>Tablo 4:</b> Septik bulguların takibi                                         | 44                  |
| <b>Tablo 5:</b> TNF- $\alpha$ plazma ve kas düzeyleri                            | 45                  |
| <b>Tablo 6:</b> ENMG incelemesi bulguları                                        | 46                  |
| <b>Tablo 7:</b> Altıncı gün kas biyopsisi bulguları                              | 49                  |
| <b>Tablo8:</b> Ondördüncü gün kas biyopsisi bulguları                            | 49                  |
| <b>Tablo 9:</b> TNF- $\alpha$ ve miyozin ağır zincir hızlı-form düzeyleri        | 55                  |
| <b>Tablo 10:</b> Çalışma bulgularının toplu tablosu                              | 56                  |

## I. GİRİŞ ve AMAÇ

Yoğun bakım ünitelerinde son yıllarda hastaların daha uzun yaşatılabilmesi nedeni ile bu hastalarda izlenen nöromusküler sorunlar da önem kazanmıştır. Kritik hastalık ve buna bağlı gelişen nöromusküler belirtiler, bir haftadan daha uzun süre yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda sık görülmektedir. Hastalarda kritik hastalık nöropatisi ve/veya miyopatisi izlenebilmektedir. Kritik hastalık miyopatisi ekstremiteler ve solunum kaslarında meydana gelen kuvvet kaybı ve bunlara eşlik eden mekanik ventilatörden ayrılma güçlüğü ile karakterizedir. Birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar; sepsis, septik şok, steroid kullanımı, çoklu organ yetmezliği, nöromusküler blokaj yapan ajanlar, immobiliteler, mekanik ventilasyon ve hiperglisemidir. Kritik hastalık miyopatisinde sonuç, kas uyarılabilirliğinde azalma ve kas yıkımıdır. Patofizyolojisine yönelik birçok görüş ve çalışma mevcuttur. Bu görüşler; sepsis ilişkili inflamasyon kaskadının tetiklenmesi ve bu kaskat aracılı doku hasarı gelişimi, sepsis sonucunda birçok organda mikrodamarlarda endotel bozukluğu oluşması, septik mikroemboliler gelişmesi, sodyum kanalı disfonksiyonu ilişkili kas uyarılabilirliğinde azalma oluşu, kas proteolitik sistemlerinin (ubikülin, kalpain) aktivasyonu, direkt steroid etkisi ve immobilitenin katkısı ile mitokondrial bir patoloji oluşu yönündedir. İyi tanımlanmış elektrofizyolojik ve biyopsi bulguları mevcuttur. Erken tanı için elektrofizyolojik ve biyokimyasal belirteçler saptamaya yönelik çalışmalar düzenlenmekle birlikte, günümüzde henüz hedefe yönelik etkin tedavi yaklaşımı yoktur. Yoğun bakımlarda pek de mümkün olmayacak şekilde yalnızca risk faktörlerinden kaçınılması önerilmektedir. Yaygın ekstremiteler güçsüzlüğü ve mekanik ventilatörden ayrılamama gibi ciddi kısıtlılık yaratan sonuçları olan bu durum için tedavi geliştirilmesine yönelik çalışmalar önemlidir.

TNF- $\alpha$ , akut inflamasyon sırasında makrofaj/monositler tarafından üretilen önemli bir inflamatuvar sitokindir. Hücre içi sinyal yollarını değiştirerek apoptoz ve nekroza yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca kaşektin olarak da adlandırılır. TNF- $\alpha$ 'nın sepsis sırasında ubikülin sistemini tetikleyerek kas yıkımına neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca TNF- $\alpha$ 'nın nitrik oksit sentezi üzerine ve membran sodyum kanallarına etkileri ile kas kontraktilesi ve uyarılabilirliğine katkısı olduğuna

yönelik çalışmalar mevcuttur. Kritik hastalık miyopatisi patofizyolojisinde öne sürülen hipotezler ile örtüşen bu durumlar TNF- $\alpha$ 'nın bu süreçte kritik molekül olması yönünde şüphe uyandırmaktadır. TNF- $\alpha$ 'nın kritik hastalık sürecinde inhibe edilmesi ile kritik hastalık miyopatisi gelişiminin önlenebileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak kritik hastalık sürecinde ortaya çıkan nöromusküler tutulum önemli bir morbidite nedenidir. Yıllar içinde kronik ve kritik süreçlerle sonlanan hastalıkların artışı ve yoğun bakımda kalma süresinin uzaması ile bu süreçte nöromusküler komplikasyonların gözlenmesi artmıştır. Önlemler dışında henüz hedefe yönelik bir tedavi seçeneği olmaması önemli bir sorundur. Tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi, hastalar için yatağa bağımlılık, mekanik ventilasyondan ayrılamama gibi önemli kısıtlılıklara neden olan bu durumun önlenmesi için gereklidir. Kritik hastalık sürecinde tetiklenen immün sistemin modülasyonunun tedavi sürecinde önemli bir hedef olabileceği düşünülmüştür.



## II. GENEL BİLGİLER

### II.1. Kritik Hastalık Miyopatisi

#### II.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Kritik hastalık ve kritik hasta; medikal olarak stabil olmayan yoğun derecede monitörizasyon ve tedavi hizmetlerini gerektiren durum ve hasta olarak tanımlanır (1). Günümüzde en sık sebebi sepsis, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve çoklu organ yetmezliğidir. SIRS; vücut ısısının  $38^{\circ}\text{C}$ 'den yüksek veya  $36^{\circ}\text{C}$ 'den düşük olması, kalp hızının 90/dk'dan daha fazla olması, solunum sayısının 20/dk'dan daha fazla veya arteriyel karbondioksit basıncının 32 mmHg'dan daha düşük olması, lökosit sayısının  $12000 / \text{mm}^3$ 'den yüksek veya  $4000 / \text{mm}^3$ 'den düşük sayıda olması, veya genç hücre formunun %10'dan fazla bulunması ile tanımlanır. Sepsis de bu tabloya kanıtlanmış enfeksiyonun eşlik etmesidir (2).

Son yıllarda daha iyi tanınan bir tablo haline gelen kritik hastalık ile ilişkili nöromusküler tutulum ilk kez akut astım atağı ile başvuran ve yüksek doz kortikosteroid ve nöromusküler bloke edici ajan kullanılan bir hastada rapor edilmiştir (3).

Kritik hastalık ilişkili nöromusküler tutulum ekstremiteler ve solunum kaslarında meydana gelen kuvvet kaybı ve bunlara eşlik eden mekanik ventilatörden ayrılma güçlüğü ile karakterizedir. Bir haftadan daha uzun süreli yoğun bakım ünitesinde kalış sonrası geliştiği düşünülmektedir (4-6).

Kritik hastalık ilişkili nöromusküler tutulumlar olan polinöropati ve miyopatinin hastaların büyük çoğunluğunda birlikte bulunduğu inanılmaktadır. Farklı patofizyolojiye sahip iki ayrı hastalık mı yoksa aynı patolojik mekanizmanın farklı manifestasyonları mı olduğu net değildir ancak her ikisinin de öncelikle sepsisle tetiklendiği bilinmektedir (7). Birçok çalışmada da nöropati ve miyopati ayrımı yapılmadan nöromiyopati olarak ifade edilmiştir. Kritik hastalık nöromiyopatisinin yoğun bakımda 1 haftadan uzun süre kalan hastalar arasında %33'den %57'e değişen sıklıkta izlenebildiği ancak sepsis veya SIRS varlığında sıklığının %68'den %100'e kadar arttığı bildirilmiştir (8-12). Erişkin 1421 hastanın bilgilerini içeren, birçok değişken sonucun olduğu, önceki 24 çalışmanın sonuçlarının değerlendirildiği bir sistematik derlemede kritik hastalarda (sepsis,

çoklu organ yetmezliği veya 7 günden uzun mekanik ventilasyon süresi olan) nöromusküler tutulumun ortalama prevalansı %46 (%95-güvenlik aralığı %43–49) olarak hesaplanmıştır (13). Daha çok nöropatik değişikliklerin de birlikte incelendiği prospektif gözlem çalışmalarında hastalarda elektrofizyolojik anormallikler %47'den %90'a değişen sıklıklarda rapor edilmiştir. Histolojik incelemelerde de miyopatik değişikliklerin sıklığı %48 ile %96 arasında saptanmıştır (14,15).

Yoğun bakım ilişkili yaygın güçsüzlüğü olan hastaların büyük kısmı uzun yıllar 'Kritik Hastalık Nöropatisi' (KHN) olarak adlandırılmıştır. Ancak son dönemdeki birçok elektrofizyolojik ve patolojik incelemede esas patolojinin kasta olduğu ve kritik hastalık miyopatisine sahip hastaların bir kısmının nöropati başlığı altında sınıflanmış olabileceği düşünülmektedir (16,17). Bu nedenle 'Kritik Hastalık Miyopatisi'nin (KHM) gerçek sıklığını geçmiş çalışmalara bakarak belirlemek güçtür.

Kritik hastada nöromusküler tutulum gelişmesi için birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar; sepsis, septik şok, steroid kullanımı, çoklu organ yetmezliği, nöromusküler blokaj yapan ajanlar, immobilité, mekanik ventilasyonun süresi, hiperglisemi, kadın cinsiyet ve ileri yaştır. En önemli risk faktörü sepsisin süresi ve şiddetidir (10,18).

Gelişen teknolojiler ve medikal tedaviler ile günümüzde hastaların yoğun bakımlarda yaşamda kalma hızları artmıştır. Birçok hastanın yoğun bakımda kalış süresi 1 haftanın üzerindedir. Bunun sonucunda SIRS ana yatış nedeni olabileceği gibi yoğun bakımda yatışın komplikasyonu olarak da oluşabilmektedir. ABD'de yılda 500,000 sepsis vakası bildirilmektedir. Ayrıca takiplerinde mortalite izlenmeyen ve taburcu edilebilen kritik hastalık nöromusküler tutulumuna sahip yoğun bakım hastalarının yarısından azının uzun dönemde ambulator olarak olabildiği gözlemlenmiştir (19).

Bu hastaların klinik özellikleri; kranial sinirlerde patolojinin eşlik etmediği, bilateral alt ve üst ekstremitelerde simetrik flask paralizi, derin tendon reflekslerinin kaybı ile mekanik ventilatörden ayrılma güçlüğü, ayrılanlarda tekrar entübasyon ihtiyacı olması, hipoksi ve hiperkapnidir (20). Kritik hastalık miyopatisi tanısında

kullanılan özel bir biyokimyasal laboratuvar testi yoktur. Biyokimyasal incelemelerde genelde akut nekrotizan formu hariç serumda kreatin kinaz (CK) yüksekliği gözlenmez. Bu hastalığın ana patolojisinin nekrotik bir süreç olmadığını gösterir. Kritik hastalık miyopatisi kas miyozininin seçici proteolizi ile giden primer bir miyopatidir (16).

### II.1.2. Patofizyoloji

Son yıllarda kritik hastalık miyopatisinin daha önceden inanıldığı gibi sadece immobilité ile ortaya çıkmadığı, altta çok kompleks ve birçok sistemi ilgilendiren patolojiler olduğu saptanmıştır (21). Akut olarak ortaya çıkması kullanmama atrofisinden farklı mekanizmalar ile oluştuğunu düşündürmektedir. Risk faktörleri iyi tanımlansa da patolojik mekanizması ile ilgili bilgiler kompleks yollarla nedeni ile henüz yeterli değildir. Bilinen önemli risk faktörlerinin kas üzerine etkileri Tablo1’de özetlenmiştir.

Patofizyolojiye yönelik hipotezler öne sürebilmek kas kasılmasının basamaklarını anlamaktan geçer. Kas kasılması kompleks seri sinyallerin devamı ile yürütülür. Asetilkolinin nöromusküler son plâğa bağlanması sonucu voltaj bağımlı  $Na^+$  ve  $K^+$  kanallarının aktivasyonu ile aksiyon potansiyeli oluşur. Oluşan aksiyon potansiyeli sarkolemma ve t-tübüller boyunca iletilir. Bunun sonucunda t-tübüllerinde bulunan  $Ca^{+2}$  kanalı, dihidropiridin reseptörü aktive olur. T-tübüllerdeki dihidropiridin reseptörleri ile sarkoplazmik ryanodin kanalları arasında protein-protein çiftlenmesi meydana gelir. Sarkoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  iyonları salınır. Miyoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artışı ile  $Ca^{+2}$ , troponin C’ye bağlanır ve tropomiyozin molekülünün pozisyonu değişir. Miyozinin aktin üzerinde bağlanacağı yer serbest kalır. Sitoplazmadaki serbest  $Ca^{+2}$  iyonları ayrıca miyozinde bulunan ATPaz enzimini aktive eder. Aktif duruma geçen ATPaz, ATP’nin hidroliz yoluyla parçalanarak enerji açığa çıkmasını sağlar. Bu enerji, kontraksiyon enerjisi olarak kullanılır. Bu yolla aktin üzerine bağlanan miyozin, aktin üzerinde ilerleyerek (kayan filamanlar teorisi) kontraksiyonu gerçekleştirir. Kalsiyum bu sistemde ana mesajcıdır ve bu süreçler için ATP’nin varlığı önemlidir(22,23). Herhangi bir basamakta etkilenme olması kas güçsüzlüğü ile sonuçlanır.

Son dönemdeki çalışmalar, yaygın kas güçsüzlüğü ile giden kritik hastalık miyopatisinde en önemli patolojik mekanizmaların membran uyarılabilirliği ve kontraktıl proteinlerdeki etkilenme olduğunu vurgulamaktadır (7,24).

**Tablo 1:** Kritik Hastalık Miyopatisi Risk Faktörleri ve Etki Mekanizmaları

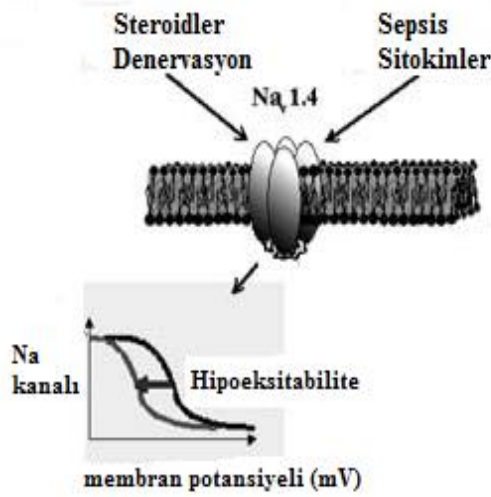
| Risk Faktörü           | Öne Sürülen Mekanizma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kortikosteroidler      | Ubikütün-proteozom sistemi aktivasyonu<br>IGF etkisinin azalması: Daha az miyozin sentezi<br>Artmış protein döngüsü<br>Tip 2 lif atrofisi<br>Fas-Fas ligandı indüksiyonu ile apoptoz                                                                                                                                                                                                                                        |
| Nöromusküler Blokörler | Denervasyon<br>Jüvenil AChR artmış regülasyonu ve cevapsızlıkta artış<br>Plazma membran hipoeksitabilitesi<br>Embriyonik Na <sup>+</sup> kanalı izoformlarının (Nav1.5) ekspresyonu<br>Artmış steroid sensitivitesi<br>ACh presinaptik ekzositoz ve salınımında bozukluk                                                                                                                                                    |
| Sepsis/SIRS            | Sitokin aracılı olarak ubikütün-proteozom sistemi aktivasyonu (TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\delta$ )<br>Katabolik metabolizma: Hepatik glukoneogenez için kas proteinlerinin mobilizasyonu<br>Bozulmuş kas onarım mekanizması (ör. MyoD-inhibisyonu)<br>Bioenerjitik azalım (ATP depleasyonu)<br>Mitokondrial disfonksiyon (apoptoz-tetikleyici: Sitokrom C)<br>Edinilmiş kanalopati (ör. RYR, Na <sup>+</sup> 1 kanalları) |

### II.1.2.1. Membran Uyarılabilirliğinde Değişmenin Mekanizmaları

KHM'de kasın hipo/ineksitabilitesi, sepsis ve steroidlerin membran iyon kanallarını etkilemesi ile oluşur (Şekil 1) (19). Bu etki sepsisin çok erken dönemlerinden itibaren gözlenmektedir. Sepsis oluşması sonrası bir saat içinde membran istirahat potansiyellerinde azalma olduğu not edilmiştir (25,26). Sepsisin başlangıç fazında yoğun inflamatuvar aktivite ön plandadır. Özellikle TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 çok yüksek seviyelerdedir. Bu sitokinler hipotalamik-hipofizer aksı stimüle ederler ve dolaşan glukokortikoid seviyeleri artar. Sonuçta immün cevap ve daha fazla proinflamatuvar sitokin salgılanması baskılanır. Çok ağır sepsis veya septik şokta yoğun sitokin salınımı, ayrıca eşlik eden adrenal yetmezlik oluşu sitokin/glukokortikoid oranının takip eden dönemlerde ters dönmesini engeller. Sepsis ile endojen veya ekzojen kaynaklı olsun steroidlerin, membran üzerine etkileri benzerdir. Bu etkiler çeşitli invivo ve invitro araştırmalar ile gösterilmiştir. Yüksek doz steroid verilen ve denervasyon ile kritik hastalık myopatisi modeli oluşturulan bir deneyde Na<sup>+</sup> ineksitabilitesi ile ilgili önemli sonuçlar elde edilmiştir (27-29). İstirahat potansiyelleri depolarize olurken, membran rezistansında azalma ve Na<sup>+</sup> akım amplitüdlerinde %50 azalma izlenmiştir (30). Ayrıca denervasyon embriyonik Nav1.5 kanal izoformlarının da belli bir oranda kasta artmasına neden olur. Bu durum hiperpolarizasyon yönünde kaymayı daha da arttırır. Sonuçta membran eksitabilitesinin belirgin azalması ile kas lifleri aksiyon potansiyeli üretemeyecek duruma gelir (31-34). Ancak Na<sup>+</sup> kanalı elde edilebilirliğinde azalmanın tam olarak lif ineksitabilitesini açıklamadığı, ayrıca henüz tam olarak bilinmeyen mekanizmalar ile direkt kanallardan geçişe etkileri ile de sepsis ve steroidlerin ineksitabiliteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (7). Ayrıca daha yavaş şekilde gelişen inaktivasyon da mevcuttur. Voltaj bağımlı Na<sup>+</sup> kanalı inaktivasyonu, gen ekspresyonunda değişiklikler ve posttranslasyonel modifikasyonlar ile devam ettirilmektedir. Sepsis durumunda da tablo benzerdir. Memelilerde septik şoktan sonra belirgin depolarizasyon ile aksiyon potansiyeli amplitüdlerinde düşme olduğu gösterilmiştir (26,35). Yüksek dozlarda endotoksin maruziyeti sonrası TNF- $\alpha$ 'nın plazma konsantrasyonlarında artışı ile iskelet kasında yaklaşık 15 mV'luk

depolarizasyon meydana gelmektedir (36). İlginç olarak kritik hastalık miyopatisine sahip bireylerin serumlarının invitro olarak iskelet kasına eklenmesi ile dakikalar içinde akut depolarizasyon gözlenmiştir. Sepsis durumunda akut dönemde depolarizasyonla birlikte kompensatuar olarak hızlı  $\text{Na}^+$  kanalı sağlama ile bir hipereksitabilite dönemi olduğu ancak sonuçta bu kompanzasyonun yetmediği ve hipoeksitabiliteye dönüşün gerçekleştiği düşünülmektedir (37).

Özet olarak sepsis ve steroidlerin etkisi ile istirahat membran direncinde depolarizasyon,  $\text{Na}^+$  kanalı sayısı elde edilebilirliğinde azalma,  $\text{Na}^+$  kanallarında voltaj bağımlı inaktivasyon meydana gelmekte ve kas uyarılabilirliğinde azalma ortaya çıkmaktadır. (4,38).

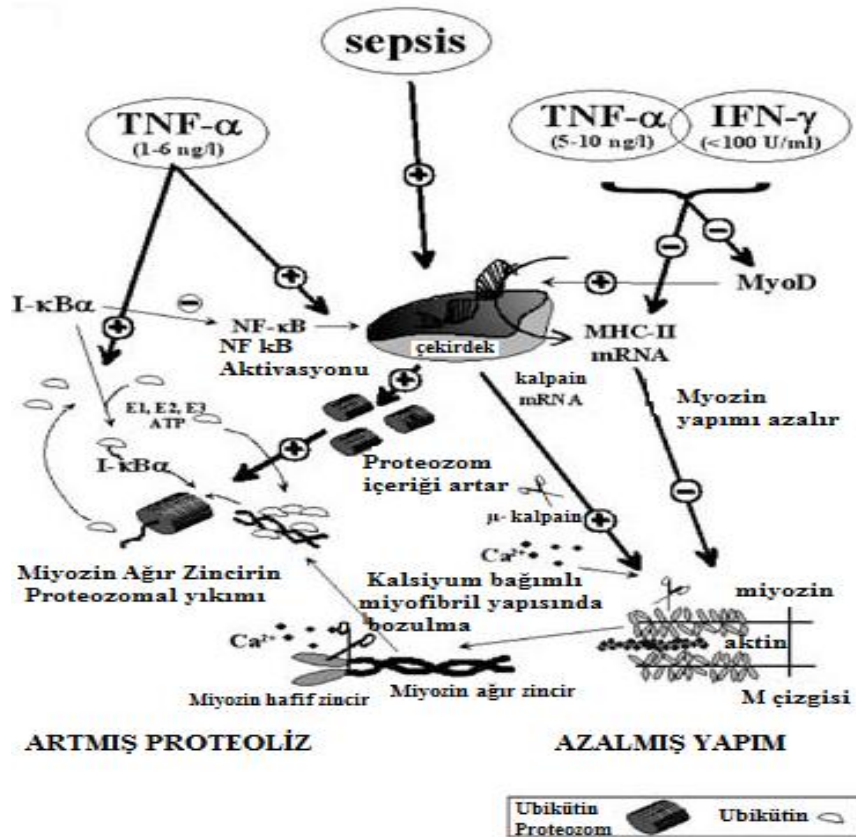


**Şekil 1:** Steroid ve sepsisin  $\text{Na}^+$  kanalı ve kas ineksitabilitesine etkisi

#### II.1.2.2. Kontraktil Proteinlerde Proteolizin Mekanizmaları

Septik kasta diğer miyofibriler proteinler (ör. Troponin-T, tropomiyozin, aktin) etkilenmezken seçici olarak kalın filaman yıkımı gözlenmektedir. Miyozin ağır zincirleri, erişkin kasta miyofibriler proteinlerin %40'ını oluşturmaktadır. Seçici miyozin ağır zincir etkilenmesinin neden olduğu halen bilinmemektedir. Ancak nasıl yıkıldığına dair bilgiler çoktur. Bu süreçte birçok karmaşık yolak yer alır. Bu yollar sitokinler, özellikle de  $\text{TNF-}\alpha$  tarafından tetiklenmektedir. Yıkım yollarından biri kalsiyum bağımlı, kalpainlerdir (39,40). Kritik hastalık ile tetiklenen miyopatide atrofik liflerde erken dönemde kalpain artışı gösterilmiştir (39).

Bir kalsiyum antagonisti olan dantrolen tarafından septik sıçanlarda kalpain aracılı yıkım etkisinin geri döndürülebildiği gösterilmiştir. Diğer bir yıkım yolağı da ubikütün-proteozom sistemidir. Erken dönemde kalsiyum aracılı olarak başlayan mekanizmalar ile miyofibrillerde disintegrasyon oluşmakta ve sonraki aşamalarda bu miyofibriller ubikütün-proteozom sisteminin hedefi haline gelmektedir (41). Sitokinler ve özellikle TNF- $\alpha$  ile tetiklenen NF- $\kappa$ B ve ubikütün-proteozom sisteminin sepsisteki esas kas yıkımından sorumlu yolak olduğu düşünülmektedir (42-47). Tüm bu yollar ATP bağımlıdır. Sepsis sırasında oluşan ATP depleksiyonundan da etkilenmektedir (Şekil 2 ve 3). Ayrıca NF- $\kappa$ B, mitokondrial disfonksiyonun sonucunda ve TNF- $\alpha$  direkt etkisi ile oluşan reaktif oksijen ürünleri (ROS) etkisiyle de aktive olmaktadır (48,49). Bu yıkım yanında sepsis sırasında özellikle TNF- $\alpha$ 'nın yüksek düzeyleri ve IFN- $\delta$  etkisi ile miyozin ağır zincir yapımının da azaldığı bilinmektedir. Sitokinler bu transkripsiyon inhibisyonunu miyojenik farklılaşma faktör MyoD aracılı olarak yapmaktadırlar. Steroidler de direkt olarak ubiquitin-proteozom ATPaz mRNA aktivitesi ile kas nekrozu ve apoptozunu artırırlar (50,51).

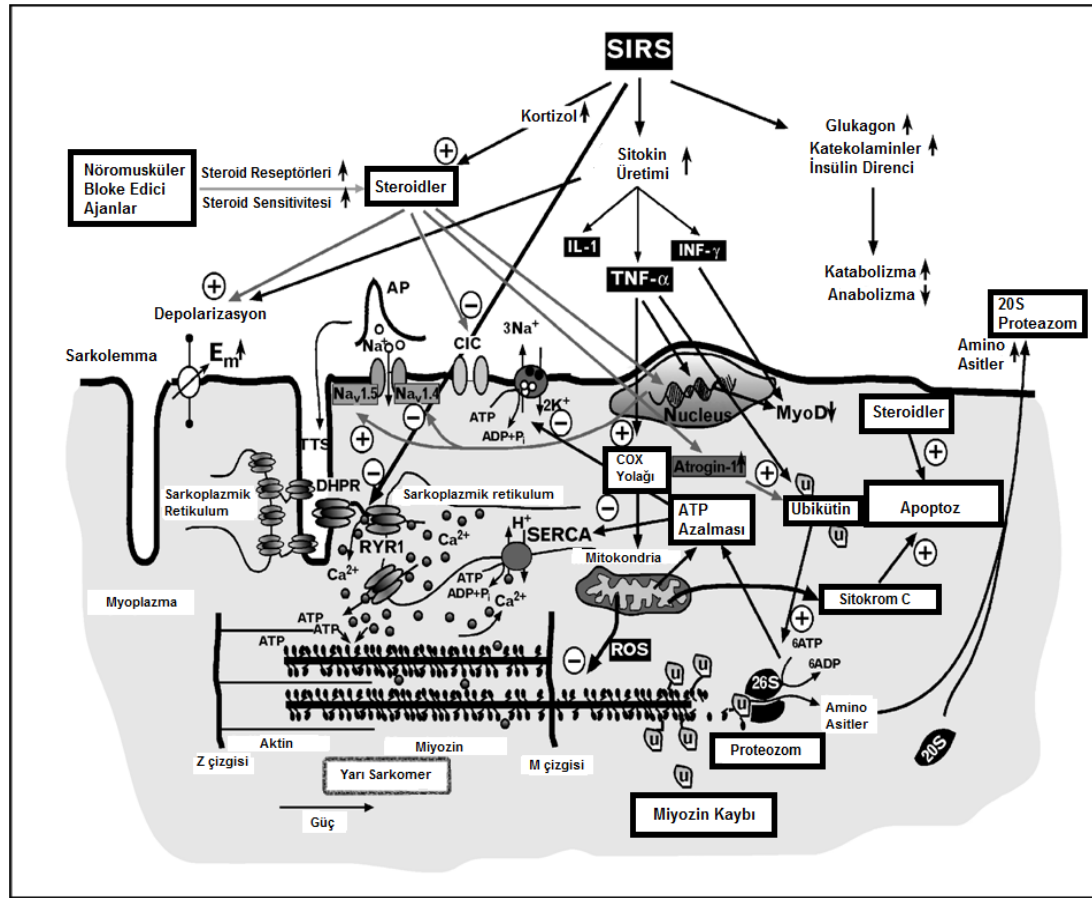


**Şekil 2:** Sitokinler ve miyozin yıkımının mekanizmaları

### II.1.2.3. Sepsisle Tetiklenen Kas Yetmezliğinde Diğer Hedefler

İnsülin direnci sonucu oluşan biyoenerji yetmezliği, sitopatik hipoksi, dislipidemi, artan ROS nedeni ile antioksidatif kapasitede azalma, mitokondrial disfonksiyon, hormonal düzenlenmenin bozulması ve mikrodolaşımdaki değişiklikler sepsisin kas üzerindeki diğer etkileridir (7,52,53).

Sonuç olarak nöromusküler bloke edici ajanlar ve steroidlerin katkısı olmakla birlikte kritik hastalık miyopatisi oluşumunda kas üzerinde birçok yolağa etkileri nedeni ile sepsis en önemli risk faktörüdür. İnflamatuvar mediatörler aracılığı ile oluşan voltaj bağımlı iyon kanalı ilişkili membran eksitabilitesinde etkilenme,  $\text{Na}^+$  kanallarının inaktivasyonu ile oluşan edinilmiş kanalopati, intraselüler protein sinyalleri sonucunda miyozin proteini başta olmak üzere kas proteinlerinin yıkımı en ön plana çıkarılan mekanizmalardır (24,33,54).



Şekil 3: SIRS sırasında miyofibril yıkımı ve kontraktıl disfonksiyon mekanizmaları



### II.1.3. Elektrofizyolojik Bulgular

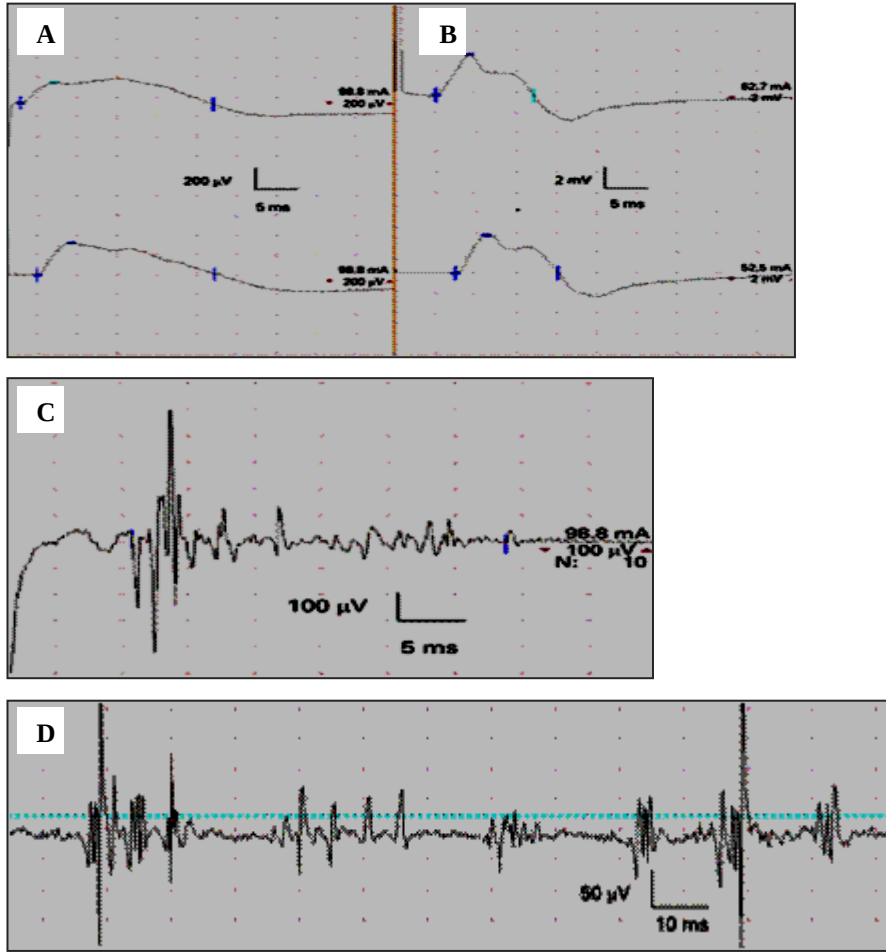
Sinir iletim çalışmalarında genellikle düşük amplitüdlü, iletim bloğu göstermeyen ve süreleri uzun birleşik kas aksiyon potansiyelleri (BKAP) elde edilir. Duyusal sinir iletim çalışmalarının normal olması beklenir, ama eşlik eden nöropati durumunda veya ekstremitelerde ödem varsa düşük amplitüdlü duyusal potansiyeller de saptanabilir. Hasta sedatize edilmemişse veya ensefalopati tablosu yoksa iğne EMG çalışmasında istemli kasıda kısa süreli, küçük amplitüdlü, polifazik motor ünite aksiyon potansiyelleri (MÜAP) ve erken giriş aktivitesi izlenir. İstirahat halinde yapılan incelemede pozitif keskin dalgalar ile fibrilasyon potansiyelleri saptanabilir (4,16,55). Spontan potansiyeller nöropati olgularında da görülebileceği için istemli kası yapamayan hastalarda nöropati-miyopati tanılarının elektrofizyolojik ayırımında direkt kas uyarımı tekniğinin de elektrofizyolojik incelenmeye eklenmesi miyopati ve nöropati ayırımının daha duyarlı olarak yapılmasını sağlamaktadır. Direkt kas ve sinir uyarımı ile elde edilen BKAP amplitüdlerinin oranına göre etkilenebilir sinir veya kas ağırlıklı mı olduğu yönünde güvenilir yorum yapılabilir (56-59). Ayrıca miyopati hakim olgularda BKAP distal latansında uzama olmaması, duyu sinir aksiyon potansiyelinde (DSAP) patoloji gözlenmemesi nöropatiden ayırım için yardımcıdır. Mekanik ventilatörden ayrılamayan hastalarda frenik sinirin sinir iletim çalışmaları ve diyafram kasları ile göğüs duvarı kaslarının iğne EMG incelemeleri KHM tanısından şüphe edilen hastalarda uygulanabilecek diğer elektrofizyolojik yöntemlerdir. Frenik sinir çalışmasında BKAP’de amplitüdde düşme veya kayıp ile diyafram iğne EMG’sinde denervasyon potansiyelleri izlenir. Kritik hastalık ilişkili güçsüzlükte miyopatinin daha ön planda olduğunu destekler birçok elektrofizyolojik çalışma vardır (58). Ayrıca daha önceki inancın aksine BKAP’de düşüklük ve özellikle sürede uzama motor aksonal nöropatinin bulgusu değil miyopatinin ve kas uyarılabilirliğinde azalmanın bulgusu olarak yorumlanmaktadır (27). Direkt kas uyarımı tetkiki ile bu bilgi desteklenmektedir. Sinirlerin ardısıra uyarımı ile elde edilen yanıtlarda kritik hastalık nöromusküler tutulumunda, nöromusküler kavşak patolojisini düşündürür bulgular elde edilmemiştir (60). Elektrofizyolojik incelemelerde bulguların sepsis sonrası çok erken dönemde ortaya çıktığı hem insanlarda yapılan incelemelerde hem de hayvan deneylerinde gözlenmiştir.

Elektrofizyolojik incelemelerde 72 saat içinde %50 hastada nöromusküler disfonksiyonu yansıtan elektrofizyolojik bulgular izlendiği belirtilmiştir (59). Erken dönemde bu elektrofizyolojik değişikliklerin ortaya çıkması sepsisin mortalitesi ile de korele bulunmuştur (61). Yirmibeş hastalık başka bir çalışmada yine 72 saat içinde hastaların çoğunda (%76) kritik hastalık polinöropatisi gözlenmiştir (62). Daha küçük bir çalışmada da sepsisten sonra 2. gün gibi erken dönemde nöromusküler bulguların ortaya çıktığı belirtilmiştir (63). Septik modellerde ise sinir iletim çalışmalarında ilk bulguların 24. saatte gözlemlendiği ve 48. saatte belirginleştiği belirtilmiştir (64). Ancak tüm bu çalışmalarda da miyopati ve nöropati ayrımı yapılmamıştır. Miyopati ve nöropatiyi ayrı tutarak yapılan bir başka çalışmada septik hastalar yoğun bakım ünitesine (YBÜ) yatışın ilk 72 saatinden sonraki 10 güne kadar değerlendirilmişlerdir. Sinir iletim çalışmalarında bozukluk ilk 72 saatte %63 hastada saptanmıştır. Bunların da inceleme anında %71'inde KHM ve KHP'nin birlikte bulunduğu, %10'unda miyopati olduğu belirtilmiştir. Erken dönemde sinir iletim çalışmasında bozukluk saptanmasının mortalitede artış ile anlamlı ilişki içinde olduğu saptanmıştır (61).

Son yıllarda ayrıntılı elektrofizyolojik incelemeler ile erken dönemde ortaya çıkan elektrofizyolojik anormalliklerin birçok hastada, baştan beri ana patoloji olarak düşünülen duysal ve motor liflerde aksonal tutulumdan farklı olarak kas etkilenimi ile giden ana bir patoloji ile ilişkili olduğunu savunulmaktadır (65). Bu savunulan kas patolojisi kas uyarılabilirliğinde azalmaz. Bu etkilenmenin uzun bir süreçte geliştiği bilinen aksonal etkilenimden, çok daha erken ortaya çıktığı ve temel patoloji olduğu düşünülmektedir. Bunu yansıtan en önemli elektrofizyolojik bulgu da erken dönemde ortaya motor liflerde birleşik kas aksiyon potansiyeli amplitüdünde azalma ve süresinde uzamadır (60,65). Bu bulgu kas yorgunluğu sırasında da gözlenir ve enerji bağımlı  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  gradientinde disfonksiyon ile ilişkilendirilir (66). Erken dönemde kritik hastalıkta oluşan bu elektrofizyolojik değişiklik birçok invivo çalışma ile  $\text{Na}^+$  kanalı disfonksiyonu sonucunda gelişen membran ineksitabilitesiyle açıklanmıştır. Geri dönüşlü elektrofizyolojik değişikliklere normal biyopsi bulgularının eşlik etmesi elektrofizyolojik incelemelere erken dönemde yansıyan kasta uyarılma problemi ile ilişkili bir etkiyi desteklemektedir (16,67). Sepsisteki hastaların kaslarına yapılan P31

nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopi incelemesinde de sadece denervasyon ile ilişkilendirilemeyecek şekilde kaslarda biyoenerjetik rezervde azalma izlenmiştir (68). Ayrıca sepsis oluşturulmuş sıçanlarda benzer şekilde geri dönüşümlü EKG amplitüd düşüklükleri de bildirilmektedir (69)

Elektrofizyolojik incelemeleri yoğun bakım şartlarında uygulamak bazı kısıtlılıklar taşımaktadır ancak noninvaziv bir yöntem olan EMG, kritik hastalık nöromusküler tutulumundan şüphe durumunda ilk tercih edilecek tetkiktir.



**Şekil 4:** Kritik hastalık miyopatisi elektrofizyolojik bulguları

Normal kontrol **(B)** ile karşılaştırıldığında, kritik hastalık miyopatisinde **(A)** küçük amplitüdlü ve uzamış süreye sahip birleşik kas aksiyon potansiyelleri izlenir.

Direkt kas uyarımında **(C)** kas lifi iletim hızında geniş bir aralıkta yayılım izlenir. (en yavaş: 1.2 m/s; en hızlı: 3.9 m/s; hızlı/yavaş oranı: 3.25).

İğne EMG **(D)** incelemesinde küçük amplitüdlü ve kısa süreli miyopatik potansiyeller gözlenir. (Kaynak 70'ten alınmıştır.)

#### II.1.4. Histopatolojik Bulgular

Kas biyopsisi tanı sırasında invaziv bir yöntem olduğu için rutin pratikte genellikle tercih edilmez. Bu konudaki bilgiler daha çok hayvan çalışmaları ve otopsi çalışmalarından elde edilmiştir. KHM’de görülen genel histopatolojik bulgular kas lifi çap farklılıkları, lif atrofisi ve kalın filaman miyozin kaybıdır. Raporlar en sık olarak tip 2 lif atrofisi olduğunu daha az olarak da sıra ile her iki lif tipinde atrofi ve tip 1 lif atrofisinin de izlenebileceğini belirtmektedir (25). İnflamatuvar değişikliklere rastlanmaz (57,71). Nekroz ve vakouler değişiklikler ise çok nadiren gözlenir (4).

Kritik hasta kas biyopsilerinde nadiren nöropati ile ilişkili denervasyon bulguları (angüler atrofik lifler) da izlenebilir. Ayrıca bir otopsi çalışmasında sinir biyopsisi incelemesinde distalde daha belirgin lif kaybı, primer aksonal dejenerasyon gözlemlendiği, inflamasyon izlenmediği belirtilmiştir (16).

Daha önceki çalışmalardan elde edilen bilgiler ile ‘Kritik Hastalık Miyopatisi’ histopatolojik olarak 4 grupta sınıflanır (4).

Bu gruplar;

- 1- Kalın Filaman (miyozin) Kaybı
- 2- Kaşektik Miyopati
- 3- Akut Rabdomiyoliz
- 4- Akut Nekrotizan Miyopati’dır.

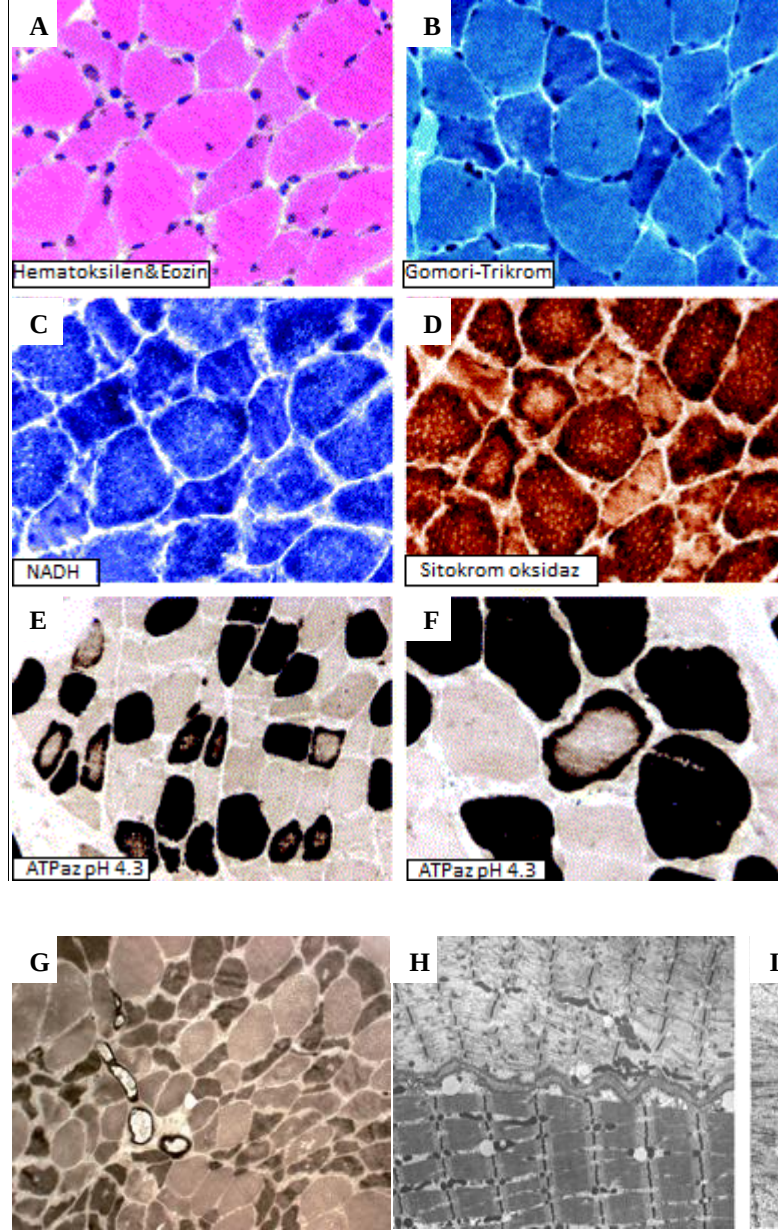
En yaygın formu ‘Kalın Filaman Kaybı’ formudur. Miyozinin seçici kaybı KHM için karakteristik olarak tanımlanır ve kalın filaman kaybı formunun KHM’ni temsil ettiği belirtilir (72). Miyozin kaybı genelde difüzdür ancak yamalı da olabilir. Diğer miyofibrillerde etkilenme izlenmez (16,39,60).

İmmünohistokimyasal çalışmalarda miyozin, NADH, ATPaz, SDH, COX boyaları ile kas lifi tiplerine göre atrofi farkı gösterilmektedir.

Elektron mikroskopi çalışmalarında nekrozda erken dönemde izlenen plazma membranı yıkımı, kalın filamanlara eşlik eden erken aktin filaman kaybı ile Z diskinde bozulmadan farklı olarak kalın filamanlarda seçici yıkım ile iskelet kası Z disklerinde korunma ve A bandında disintegrasyon dikkati çekmektedir. (39)

Sonuç olarak kritik hastalık miyopatisi histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerinde seçici miyozin yıkımı önemlidir. Hızlı kasılan kaslarda yavaş kasılanlara göre, tip 2 liflerde tip 1 liflere göre ve hızlı miyozin ağır zincirde , yavaş miyozin ağır zincire göre daha fazla yıkım izlenmektedir.

**Şekil 5:** Kritik hastalık miyopatisi kas biyopsi örnekleri



**Şekil 5:** A (Hematoksilen&Eozin) ve B (Gomori-Trikrom): Bazı liflerde atrofi sonucu çap farklılıkları. C (NADH) , D (COX), E (ATPaz pH 4.3), F (ATPaz pH 4.3)'de Tip 2 liflerde atrofi. G (Miyozin hızlı zincir IHC) ile H ve I'daki elektron mikroskopi incelemesinde miyozin kalın filaman kaybı.(Kaynak 70'ten alınmıştır.)

Bu bilgiler ışığında ‘Kritik Hastalık Miyopatisi’ için ana tanısal özellikler;

- 1- İki veya daha çok sinirde DSAP amplitüdlerinin normal alt limitin %80 üstünde olması
- 2- İğne EMG’de kısa süreli ve küçük amplitüdlü MÜAP’ler, erken veya normal giriş aktivitesi olması (fibrilasyon potansiyelleri var veya yok)
- 3- Ardısıra uyarımda dekremental yanıt gözlenmemesi
- 4- Kas histopatolojik incelemesinde miyozin kaybı ile miyopati bulguları olması

Destekleyici özellikler:

- 1- BKAP amplitüplerinde iki veya daha fazla sinirde blok olmadan % 80’den fazla düşme olması
- 2- CK’da yükselme
- 3- Kas uyarılabilirliğinde azalmanın gösterilmesi

Kesin tanı için 4 ana özellik gereklidir. Üç ana, 1 veya daha fazla destekleyici özellik varsa muhtemel, ana özelliklerden 1. ve 3. veya 2. ve 3. ana özelliğin yanında 1 veya daha fazla destekleyici özellik olması ile olası kritik hastalık miyopatisi tanısı konur (72).

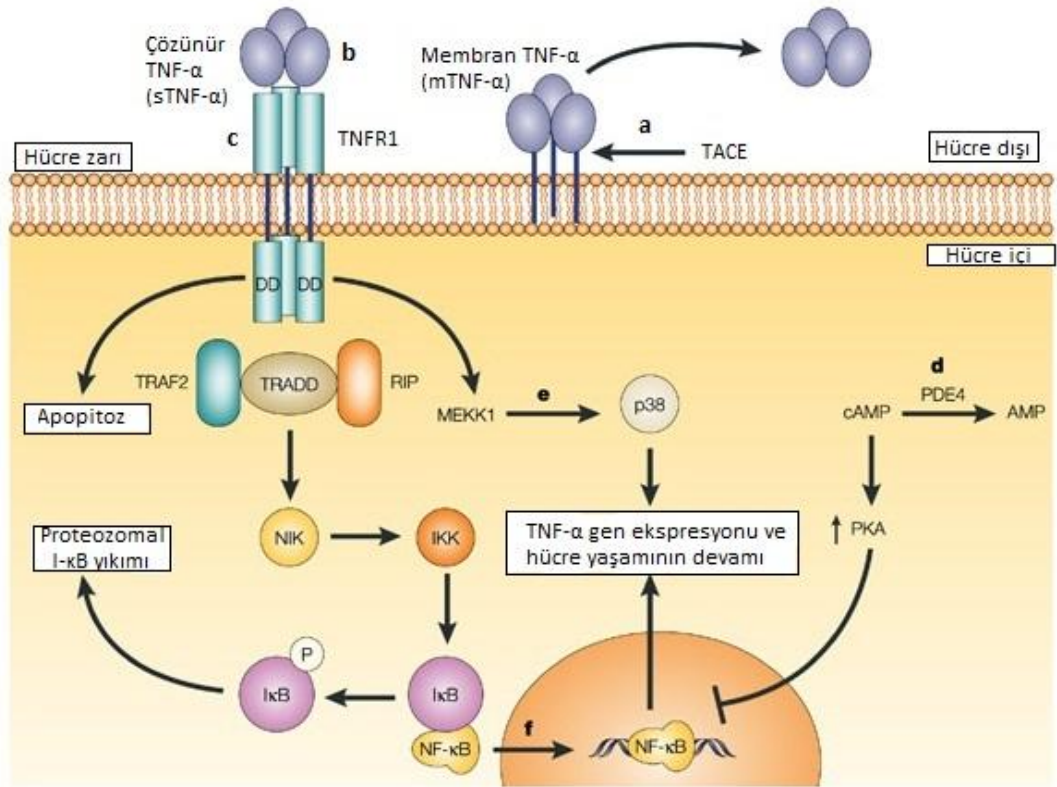
### II.1.5. Tedavi

Günümüzde kritik hastalık miyopatisinin etkin bir tedavisi yoktur. Erken dönemde fizyoterapi uygulanması, sıkı kan şekeri kontrolü, nöromiyopatik ilaçlardan özellikle steroid ve nöromusküler blokör ajanlardan kaçınılması ve en önemlisi sepsisin kontrolü önerilmektedir (73). Hiperglisemiden kaçınmak için agresif insülin tedavisinin koruyucu olduğu gösterilmiştir (74). Adrenal yetmezliği önleyecek stres dozunda steroid kullanımının zararlı olmadığı düşünülmektedir. Ciddi sepsis için aktive protein C kullanımı desteklenmektedir. Beslenme desteği içinde glutamin, arjinin veya omega 3 yağ asitlerine yer verilmesini öneren çalışmalar ile antioksidan, fosfodiesteraz inhibitör kullanımının faydalarını belirtir yayınlar mevcuttur (75). İmmobilizasyondan bağımsız primer miyopati olması nedeni ile kas egzersizlerinin tedavi edici yönü olmadığı, destekleyici olduğu belirtilmiştir (76). En önemli riskin sepsis olduğu düşünülen bu tablo için sepsisin önüne geçilmesi önerilse de bu birçok durumda olası değildir. Bu nedenle sepsis sırasında tetiklenen immün sistemin modülasyonu üzerinde bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla TNF- $\alpha$  antagonistleri, IL-1 antagonistleri, PAF antagonistleri ve N-asetilsistein kullanılmıştır. Çalışmalar fayda açısından değişken sonuçlar içermektedir (77-80).

Özellikle sepsis ile tetiklenen ve miyozin ağır zincir yıkımı ile sonlanan kritik hastalık miyopatisinin kompleks kaskadında daha hedefe yönelik tedavilere ihtiyaç vardır.

## II.2. TNF- $\alpha$

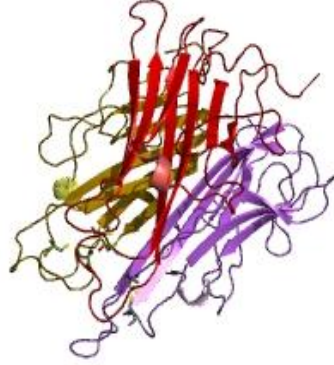
TNF- $\alpha$  birçok fonksiyonu olan proinflamatuvar polipeptid yapıda bir sitokindir. Kaşektin olarak da anılmaktadır. 1985'te Beutler endotoksine maruz kalan hücreler tarafından üretilen ve kaşeksiye yol açan bir molekül tesbit etmiş ve bunu kaşektin olarak adlandırmıştır (81). 1986'da Caput, kaşektin ve TNF- $\alpha$ 'nın aynı molekül olduğunu belirtmiştir (82). TNF- $\alpha$ 'nın immün cevapları ve antitümör etkileri tetiklemesi yanında lipid metabolizması, koagülasyon, insülin direnci, endotelial fonksiyon ile farklılaşma ve apoptoz süreçlerinde önemli rolü vardır. Makrofaj ve lenfosit başta olmak üzere çeşitli immün ve somatik hücrelerde sentezlenir. TNF- $\alpha$  prohormon şeklinde membrana entegre halde bulunur. Uyarılara yanıt olarak membrana bağlı mTNF, TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından yıkılır ve olgun, çözünür form sTNF oluşur (Şekil 6).



**Şekil 6:** TNF- $\alpha$  aktive edilmesi ve reseptör bağlanması sonrası sinyalizasyon aşamaları (Kaynak 83'ten alınmıştır.)



Oluşan çözünür moleküllerden üçü bir araya gelerek aktif homotrimerik yapıyı oluşturur (Şekil 7).

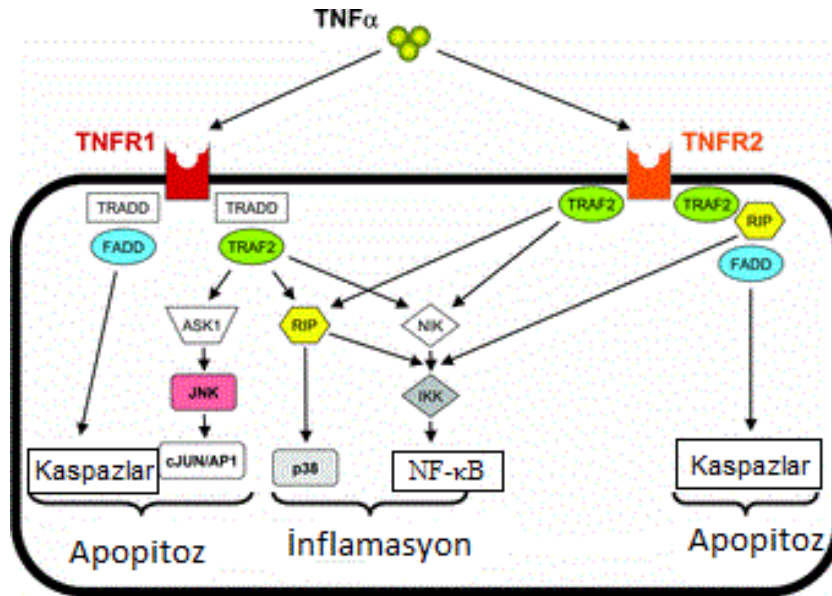


**Şekil 7:** TNF- $\alpha$  homotrimerik yapısı

TNF- $\alpha$  normalde kanda düşük miktarlarda bulunmaktadır. TNF sentez ve salınmasını uyaran birçok faktör vardır. Uyarı sonucu yarım saat içinde TNF- $\alpha$  ekspresyonu başlar ve 90-120 dk arasında en üst seviyeye ulaşır. Dört saat içinde de düzeyi IL-1 ve IL-6 ile inhibe edilmesi sonucu belirgin olarak düşer. Gram pozitif bakteriler, mantarlar, parazitler, virüsler, kompleman aktivasyon ürünleri, sitokinler ve TNF- $\alpha$ 'nın kendisi salınımı uyarır (77). Sepsis, kanser ve romatolojik hastalıklarda seviyesi belirgin şekilde yükselir. Yüksek dozda TNF- $\alpha$  enjeksiyonu da septik şoka neden olmaktadır.

TNF- $\alpha$ 'nın fonksiyon göstermesi için bağlandığı reseptör aileleri vardır. Molekül ağırlıklarına göre isimlendirilmiş en önemli 2 adet reseptörü p55 reseptörü (TNFR1) ve p75 reseptörüdür (TNFR2). Her ikisi de kasta eksprese edilmektedir. Reseptör-ligand bağlanması ile postreseptör kompleks sinyal basamakları aktivasyonu başlatılır (84). Bu yollar hücre tipine göre farklılık gösterirler. TNFR1 birçok biyolojik etkinin başlamasından ayrıca kas katabolizması ve kontraktil disfonksiyonundan sorumlu ana reseptördür (85). TNF- $\alpha$ 'nın reseptörü TNFR1 ile birleşmesi sonucu önemli proteinler içeren (TRADD, TRAF2, RIP, FADD) proksimal reseptör kompleksinin oluşumu başlar (Şekil 1-3). TNF- $\alpha$ 'nın reseptörü ile bağlanması ile tetiklenen en az 3 önemli sinyal yolağından bahsedilebilir. Birinci yolak, Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD) aracılı olarak kaspazları tetikleyerek

apoptoza yol açmaktadır. İkinci yolak Jun-N-terminal kinazları (JNK) ve transkripsiyon faktörü AP-1'i aktive ederek yine apoptoza yol açar. Üçüncü yolak TNF- $\alpha$  transkripsiyonu kontrolündeki ana mediatör olan ve inflamasyona da katkıda bulunan NF- $\kappa$ B'yı aktive eder (Şekil 6-8).



**Şekil 8:** TNF- $\alpha$  reseptör sonrası sinyal basamakları (Kaynak 86'dan alınmıştır.)

TNF- $\alpha$  gen transkripsiyonu, transkripsiyon faktörleri, protein kinazlar, protein fosfatazlar, kaspazlar yanında reaktif oksijen ürünleri (ROS), reaktif nitrojen ürünleri (RNS) ve mitokondrial proteinler ile de ilişkilidir.

TNF- $\alpha$ 'nın aktif homotrimerik yapısı hücre zarına füzyon yaparken sodyum girişine de neden olur. Bu da membran potansiyellerine katkıda bulunur. Ayrıca hücre içi kalsiyum düzeylerine de etki ederek azaltır. Trombomodülin sentezini azaltarak endotel hücreindeki antikoagülan etkinliğini engeller ve ekstrinsik yoldan pıhtılaşmayı başlatır. Plazminojen aktivatörlerini de azaltarak antifibrinolitik etki gösterir. Tüm bunların sonucu yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC) meydana gelir.



edilmektedir (88-92). İskelet kasında ayrıca hem TNFR1 hem de TNFR2 bulunmaktadır. Bu reseptörlere hem çözünür hem de lokal TNF- $\alpha$  etki etmektedir.

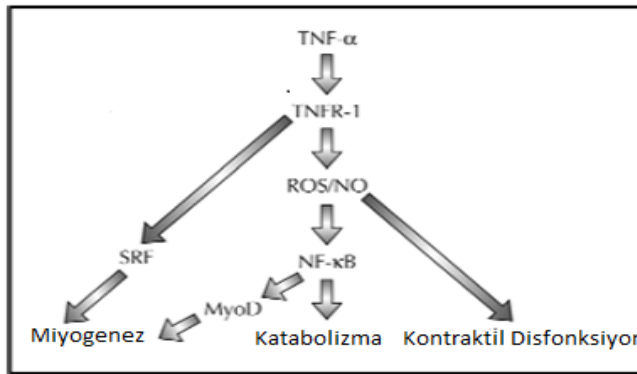
### II.2.1.1. Kontraktil Disfonksiyon

İnflamasyon durumunda çoğu zaman kas disfonksiyonu belirgin protein kaybı olmadan da oluşmaktadır. Kontraktil disfonksiyon akut olarak TNF- $\alpha$  stimülasyonu ile oluşur. TNF- $\alpha$  artışı ile saatler içinde, membran istirahat potansiyelinde azalma sonucu aksiyon potansiyeli oluşturmama ve güçte azalma ortaya çıkmaktadır (25). TNF- $\alpha$ 'nın kontraktil disfonksiyona neden olduğu uzun süredir bilinmektedir. Hücre membranında, kasta ise sarkolemmada depolarizasyona neden olduğu, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının sekresyonunu azalttığı daha önce gösterilmiştir (36). Ancak buradaki esas mekanizma olarak TNF- $\alpha$ 'nın redoks yoluna etkileri ile kas kontraksiyonunu etkilediği bilgileri daha sonradan gelmiştir. Deneysel olarak endotoksemi ile TNF- $\alpha$  ekspresyonunun ve oksidatif hasarın indüklendiği ve sıçan diyaframında kontraktil disfonksiyon ortaya çıktığı gösterilmiştir (93-95). TNF- $\alpha$  ayrıca NO artışını PAF aracılı olarak da etkileyerek kasta kontraktil disfonksiyona katkıda bulunmaktadır (96). Bu etkisini akut olarak ve çok yüksek seviyelere çıkmadan da yapmaktadır. Diyafram, ekstansör digitorum longus, gastroknemius gibi tip 2 lif yoğunluğu fazla, hızlı kasılan kaslarda bu etkileri daha belirgindir (97,98). Bu kas gruplarında ayrıca daha fazla NOS bulunmaktadır (99). Kaslar iNOS ve cNOS içermektedirler. TNF- $\alpha$ , PAF aracılı NO artışını daha çok cNOS üzerinden sağlamaktadır. TNF- $\alpha$ 'nın patolojik yüksekliklerinde NO üretimine iNOS da katılmaktadır. Kontraktil disfonksiyon TNF- $\alpha$ , PAF düzeyi ve NOS aktivitesi ile koreledir (100). NO sentaz inhibitörleri, PAF sentez inhibitörleri veya antagonistleri ve antioksidan tedaviyle kontraktil disfonksiyon geri döndürülebilmektedir (91,101,102). Reaktif oksidatif ürünler hem miyofilamanlar üzerine etkileri ile kontraktil fonksiyonu etkileyerek hem de transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu etkileyerek TNF- $\alpha$  artışı ile giden durumlarda kas disfonksiyonuna neden olur (Şekil 11-12) (78,103). Bir inflamasyon sırasında her iki sistem de tetiklenmektedir. Bu iki sistem sonuç olarak redoks duyarlı kinazların aktivasyonu, hücre içi kalsiyum regülasyonu, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve gen ekspresyonunu etkiler.

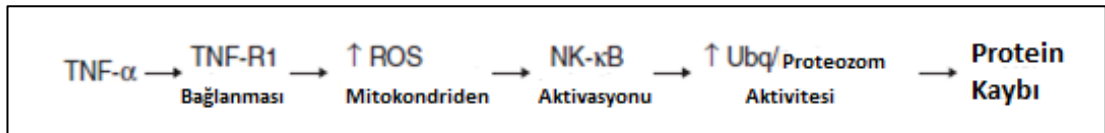
TNF- $\alpha$  intraselüler kalsiyum konsantrasyonunun artmasını engelleyerek de kas kasılmasında disfonksiyona yol açmaktadır.

Sepsis sırasında ve çeşitli kalp yetmezliği durumlarında kalp kası da iskelet kası gibi TNF- $\alpha$ 'nın endojen bir kaynağı haline gelmekte ve TNF- $\alpha$ 'nın katkıları ile kontraktilite disfonksiyon daha da ilerlemektedir (104,105)

**Şekil 10:** TNF- $\alpha$ 'nın reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri üzerinden etkileri



**Şekil 11:** TNF- $\alpha$ 'nın reaktif oksijen ürünleri ve transripsiyon faktörlerine etkisi



#### II.2.1.2. TNF- $\alpha$ 'nın Katabolizmadaki Rolü

TNF- $\alpha$ 'nın sepsiste özellikle miyofibriller yıkım üzerine etkisi olduğu uzun süredir bilinmektedir ancak mekanizmalar üzerine çalışmalar yenidir (106). Miyoblast farklılaşmasını ve satellit hücrelerin rejeneratif cevabını azaltarak veya apoptozu tetikleyerek katabolizmada rol oynar. Apoptozda direkt ve indirekt mekanizmalar ile rol aldığını gösteren çalışmalar vardır.

TNF- $\alpha$  indirekt olarak insülin, glukokortikoidler gibi hormonlar üzerindeki etkileri ile kas büyümesinin engellenmesine, IL-1, PGE2 gibi diğer katabolik sitokinlerin sentezine katkıları ve anoreksiye tetiklemesi ile kas katabolizmasına katkıda bulunmaktadır. Ancak en önemli yıkım direkt etkileri sonucunda oluşmaktadır (107).

Direkt yolla TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B'yı regüle eden genlerin ekspresyonunu etkileyerek protein kaybını indükler (108,109). NF $\kappa$ B redoks sensitif bir transkripsiyon faktörüdür. ROS'in mitokondrideki elektron transport zincirindeki primer alanı ubikinondan elektron transportu ile TNF- $\alpha$ / NF $\kappa$ B sinyal yolağı düzenlenir (110,111). Bu yolağın ROS tarafından düzenlenmesi tüm hücelere özgü değildir, spesifik dokularda bulunur (111,112). Kas da bu dokulardan biridir. TNF- $\alpha$  iskelet kasında NF $\kappa$ B'nin aktivasyonu ve translokasyonunda önemlidir (113,114).

NF $\kappa$ B bir transkripsiyon faktörüdür. Gen ekspresyonunun arttırılması veya baskılanmasında görevlidir. Kas hücreleri sitoplazmalarında inaktif heterotrimerik kompleks olarak bulunur. DNA'ya bağlanan proteinler p50 ve p65 ile inhibitör protein I- $\kappa$ B'den oluşur. TNF- $\alpha$ , ubikütinin I- $\kappa$ B ile bağlanmasını ve sonrasında 26S proteozom tarafından I- $\kappa$ B yıkımını tetikler. NF $\kappa$ B aktive olur ve miyotüp nükleusuna yer değiştirir (Şekil 2) (42-44). NF $\kappa$ B hem TNFR1, hem de TNFR2 tarafından uyarılabilmektedir. Ancak TNF- $\alpha$  esas olarak TNFR1 aracılığı ile kas protein yıkımına rol açmaktadır. Bu yolak redoks sensitiftir. Bu süreçte mitokondrial elektron transport zincirinden kaynaklanan ROS'ler aracılık eder (49). Proteozom inhibitörleri, antioksidanlar deneysel sepsis modellerinde rodent kasında protein yıkımını engellemiştir (48,49,115). Etkileri uzun süreli olsa da TNF- $\alpha$  artışı ile doz bağımlı olarak hızlı şekilde I- $\kappa$ B alfa fosforilasyonu ve proteozomal yıkım sonucu aktifleşen NF $\kappa$ B düzeyi TNF- $\alpha$ 'ya maruz kalma sonrasında 30 dakika içinde hücre nükleusunda hızla yükselir. Bu geçici uyarı ile gen ekspresyonu değişikliği de ortaya çıkar ve uzun süreli kas protein seviyelerinde değişiklikler meydana gelir (113). Akut dönemde redoks reaksiyonları ile ortaya çıkan kontraktıl disfonksiyonun aksine NF $\kappa$ B ile tetiklenen protein kaybı sepsisin yine erken döneminde başlar ve kronik TNF- $\alpha$  yüksekliği devam ederse etkileri çok uzun döneme yayılır. Proteinlerden özellikle miyofibrillerde ve miyozinde kayıp olmaktadır. Deneysel hayvan çalışmalarında kronik olarak TNF- $\alpha$  maruz kalma kas kitlesinde ciddi kayıba yol açmıştır (116-118). TNF- $\alpha$  ile indüklenen bu süreçte kas hücresi ölümü yerine miyotüplerde küçülme ve toplam protein ile kas spesifik protein içeriğinde azalma olur ve tipik lif atrofi gelişir. Nekroz oluşmadığı için kas spesifik enzimlerde yükselme olmaz.

NFκB'nın ayrıca birçok kompleks farklı aktivitesi de vardır. Myo D, siklin D, kalpain3, MAP kinaz p38 ile miyogenezin regulasyonunda rol alırken RIP2, TRAF2, TRADD ile tetiklenen yollar ile de miyogenezi negatif yönde tetikler (119). İnflamasyon yollarının tetiklendiği sepsis, kanser, AIDS, kalp yetmezliğinde kas atrofisi güçlü şekilde NFκB seviyeleri ile koreledir. Kullanmama atrofisi ve yaşlanma ilişkili atrofide seviyeleri, müsküler distrofilere distrofik sürecin tetiklenmesine katkısı, miyogenezdeki rolü ile inflamatuvar miyopatilerde NFκB'ya karşı gelişen immünreaktivite daha önce çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucu ortaya çıkan bilgiler ışığında birçok kas hastalığında farmakolojik olarak NFκB müdahalesi hedeflenmiştir. TNF-α basamağı da bu müdahale hedeflerinden biridir. Bu amaçla TNFα antikorları ve sentez inhibitörleri kullanılmıştır.

Kasta birçok yolk protein yıkımında görevlidir. Bunlar ekstraselüler protein yıkımından sorumlu lizozomlar, doku hasarı, nekroz ve otolizden sorumlu kalsiyum ile aktive olan kalpain sistemi, programlanmış hücre ölümü olan apoptozda önemli kaspazlar , IL-beta dönüştürücü enzimler ve hücresel proteinlerin yıkımından sorumlu ubikütin-proteozom sistemidir. Ubikütin-proteozom sistemi birçok kompleks enzim kaskadına sahiptir (26S proteozom vb.) ve birçok protein substratı vardır. Bu proteinler içinde hücre siklusu proteinleri, büyüme regülatörleri olabileceği gibi mutasyonlu veya posttranslasyonel hasara uğramış proteinler de vardır. Sepsiste de miyofibril yıkım sürecinde polimerik ubikütin zincirleri ile işaretlenen protein, ATP bağımlı bir süreç olan 26 S proteazom kompleksi ile yıkılır. Aktin ve miyozinin işaretlenmesi, kalsiyum bağımlı ve kalpainle aracılık edilen reaksiyonlar ile miyofilamentlerin Z disklerinden salınması ve N terminallerinin destabilize olması sonucu olmaktadır. İşaretlenen filamanlar ubikütin enzimleri tarafından bağlanma hedefi haline gelmektedir. Ubikütin-proteozom proteolitik yolağının özellikle endotoksemide iskelet kası yıkımında önemli ve ana bir rolü olduğu yönünde çalışmalar vardır (120). Lizozomal ve kalsiyum bağımlı proteolitik yollar iskelet kası yıkımında çok önemli bir rol oynamazlar. Ancak birbirleriyle ve özellikle ubikütin-proteozom sistemi ile etkileşim halindedirler. Kalsiyum antagonistlerinden dantrolen ve proteozom inhibitörleri ile miyofibriller yıkımın engellendiğini gösteren çalışmalar vardır.



Endotoksemi sırasında total protein yıkımının ve daha spesifik olarak miyofibriller proteolitik yıkımın 2. saatten itibaren başladığı ve 6. saatte en yüksek seviyelere ulaştığı çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca bunlar ile paralel olarak ubikütin mRNA'da da deneysel sepsis modellerinde TNF- $\alpha$  ile ilişkili olarak artış saptanmış ve ubikütin-proteozom proteolitik yolağın iskelet kası yıkımında önemli ve ana bir rolü olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulguların daha belirgin olarak hızlı kasılan kaslarda ortaya çıktığı belirtilmiştir (120,121).

Yükselen TNF- $\alpha$  seviyeleri ayrıca IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  ve diğer katabolik sitokinlerin salınımını arttırmaktadır. TNF- $\alpha$  ile IL-1 sinerjistik olarak çalışır. Kronik IL-1 artışı da negatif nitrojen dengesi, vücut kitlesi kaybı, kas kaybı ile ilişkilidir. Farklılaşmış kasta IL-1, TNF- $\alpha$ 'nın kas protein kaybı, kontraktıl fonksiyon etkilerini güçlendirir.

Ayrıca TNF- $\alpha$  indirekt etkileri ile insülinin kastaki etkilerine karşı koyarak da katabolizmayı tetikleyebilir. TNF- $\alpha$ 'nın kastaki düzeyinin artışı insülin direncine neden olmaktadır (107,122,123)

### **II.2.1.3. Miyogenetik ve Kas Adaptasyonuna Etkileri**

TNF- $\alpha$ 'nın immatür hücreler üzerinde ise miyogenetik etkileri mevcuttur. TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B sinyal yolağı ile farklılaşmada rol oynamaktadır. NF $\kappa$ B miyoblast hücre siklusunu Siklin D1 gen aracılığı ile stimüle eder ve miyoblast farklılaşması ve proliferasyonu için gerekli olan 'Serum Cevap Faktörün' (SRF) aktivitesini güçlendirir. NF $\kappa$ B ayrıca miyoblast füzyonu ve kas spesifik proteinlerden miyozin ağır zincir, kaveolin 3 gibi proteinler ile GLUT 4'ün gen ekspresyonunda gereklidir. TNF- $\alpha$  sağlıklı insan kasında da sentezlenmektedir. Egzersiz ile ve travma sonrası da artışı olmaktadır. Rejenerasyonda görevli satellit hücre aktivasyonunda önemlidir (124).

Distrofik farelerde TNF- $\alpha$  yokluğunda kas kütlelerinin azaldığı (125), TRAF 2 eksikliği olan sıçanların vücut kitlelerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Farklılaşma döneminde TNF- $\alpha$  yüksekliği miyotüplerin normal farklılaşmasında önemlidir (126).

Erken dönemde yüksekliği ile miyogenetik etkileri ön planda iken geç dönemde miyozin yıkımına neden olur.



### II.2.2. Anti-TNF- $\alpha$ Ajanlar

| TNF salınımını azaltanlar | TNF alfa yıkımı | TNF alfa blokörleri                                                                   |
|---------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Pentoksifilin             | Talidomid       | Etanersept<br>İnflksimab<br>Adalimuab<br>Lenersept<br>Certolizumab pegol<br>Golimumab |

#### II.2.2.1. Pentoksifilin

Bir metilksantin derivesi olan pentoksifilin intraselüler cAMP düzeylerini arttıran selektif olmayan bir fosfodiesteraz inhibitörüdür. Yeterli doku perfüzyonunun sağlanamadığı çeşitli periferik vasküler hastalıklarda kullanılmaktadır. Ancak son dönemlerde yoğun bakımlarda septik hastaların tedavisinde kullanılmış, özellikle TNF- $\alpha$  düzeylerinde azalma ile mortalitede azalma (127-130) ve sepsis skorlarında düzelme izlenmiştir. Kanseri, sepsis, sinir hasarı gibi durumlardaki kas atrofisini önlemeye olan etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (131). Ayrıca pentoksifilinle tedavi ile anoreksinin, vücut kilo kaybı ve kas protein yıkımının azaldığı gözlenmiştir (132-134). Bunu da esas olarak *invivo* ve *invitro* lipopolisakkaridle indüklenen TNF- $\alpha$  salınımını azaltarak yaptığı belirtilmiştir. TNF- $\alpha$  sentezi intraselüler siklik nükleotidler tarafından yürütülür. cAMP'yi arttıran ajanlar, örneğin fosfodiesteraz inhibitörlerinden pentoksifilin TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunu azaltmaktadır (135). Ayrıca pentoksifilin NF $\kappa$ B ve ubiquitin üzerine inhibitör etkileri de vardır (136-138). Sepsiste TNF- $\alpha$  aracılı diyafram kontraktilitesinin azalmasını engellediği gösterilmiştir (139). Duchenne Musküler Distrofi'de devam eden faz II çalışma mevcuttur (140).

Pentoksifilin sepsiste ana olarak yol açtığı TNF- $\alpha$  azalması yanı sıra IL-1 $\beta$  ve IL-6 'da da azalmaya neden olmaktadır. Bu sitokinlerin de negatif nitrojen dengesi ve anoreksiye olan etkilerini antagonize edebilmektedir. Ayrıca peritonit

oluşturulmuş modellerde membran stabilizasyonunu sağlamakta ve hücre içi ve dışı elektrolit dağılımını düzenlemektedir (141). Vazodilatasyon yapma ve ertirosit ile trombositlerde agregasyonu azaltıcı etkileri de vardır.

Pentoksifilin TNF- $\alpha$  inhibisyonu yanında, fosfodiesteraz inhibisyonu ile cAMP artışı ve fosfokinaz A aktivitesinde artışa da neden olur. Bu mekanizma ile de direkt olarak kas yıkımını azalttığı düşünülmektedir (142). İskelet kasında yıkımda önemli kalsiyum bağımlı kalpainler de bu kinazın hedeflerindendir. Bu yönü ile de kas yıkımını azaltmaya katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca yine bu yolak ile kontraktiliteye de etki edebilmektedir (131).

#### **II.2.2.2. Etanersept**

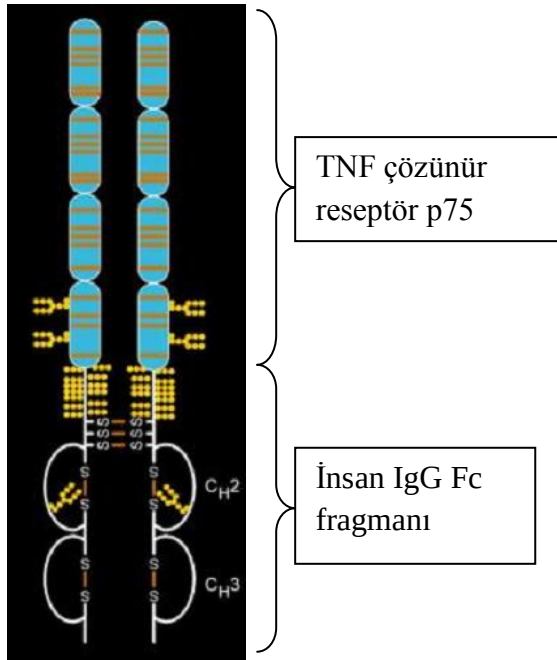
İlk olarak Mayıs 1998’de kullanımı onaylanan TNF- $\alpha$  blokörüdür. Etanersept çözünür TNF reseptör füzyon proteinidir. TNF çözünür reseptör p75 ve insan IgG Fc fragmanından oluşur. Burada TNF çözünür reseptör p75, TNF- $\alpha$  bağlanan kısmıdır. TNF- $\alpha$ ’ya yarışmalı olarak bağlanarak hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını engeller.

TNF- $\alpha$  blokörlerinin FDA tarafından onaylanan kullanım alanları romatoid artrit, poliartiküler idiopatik erken başlangıçlı artrit, psöriatik artrit, ankilozan spondilit, plak psöriazis, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit’tir. TNF- $\alpha$  blokörlerinin bilinen bazı yan etkileri vardır. Bunlar içinde de en önemlisi immünsüpresan aktivitesi nedeniyledir. Bu güne kadar bu ilaçların kullanımı sırasında bildirilmiş yan etkiler; demiyelinizan santral sinir sistemi olayları ve nöbetler gibi nörolojik olaylar, otoimmün bazı antikorların oluşması ile tetiklenen tablolar (ör. Lupus benzeri cilt döküntüleri), aplastik anemi ve pansitopeni, intestinal perforasyon, konjestif kalp yetmezliği, lenfoma gelişimi ve özellikle fırsatçı tüberküloz , histoplazma, listerya, pnömosistis pnömonisi gibi ciddi enfeksiyonlardır. Enfeksiyonlar dışında bildirilen komplikasyonların toplumdaki sıklıkları ile de karşılaştırıldığında net olarak TNF- $\alpha$  antagonisti kullanımı ile ilgili bir ilişkiden bahsedilemeyeceği belirtilmiştir.

En önemli problem ciddi enfeksiyonlar, sepsis ve bunlar sonucu oluşan ölümdür. Bu sonuçlar genelde altta yatan enfeksiyona yatkınlık oluşturan durumlarda oluşmaktadır. Antagonistlerle tedavi sırasında enfeksiyon gözlenirse hastaların yakın

takibi, ciddi enfeksiyon ve sepsis gelişmesi durumunda tedavinin kesilmesi önerilmektedir. Kronik ve lokalize enfeksiyonlar dahil aktif enfeksiyonu olan hastalarda antagonist tedavinin başlanmaması uyarısında bulunmaktadır (143).

Daha önceki çalışmalarda çözünür TNF- $\alpha$  reseptör blokörleri ve TNF- $\alpha$ 'ya karşı monoklonal antikolar septik modellerde kullanılmıştır. Çalışma sonuçları değişkendir ancak mortaliteyi tahmin edildiği gibi arttırmadığını belirtir birçok çalışma da mevcuttur (144-149). TNF- $\alpha$ 'nın yarışmalı blokörü olan etanersept ise daha önce sepsis sürecine etkileri ile ilişkili çalışmalarda kullanılmamıştır. Endotoksinle tetiklenen üveit modelinin tedavisindeki yerinin araştırıldığı sadece bir çalışmada, mortalitede artışa yol açmadığı gözlenmiştir (150). Kas hastalıkları üzerine etkileri ile ilgili yapılan tek çalışmada etanersept ile tedavi edilmiş distrofik fare modelinde distrofik kasta nekrozu engellediği saptanmıştır (151). Çözünür TNF- $\alpha$  reseptör blokörünün kullanıldığı bir çalışmada da sepsisle indüklenen kardiyak kaşeksinin ve iskelet kas yıkımının önlendiği gösterilmiştir (152,153).

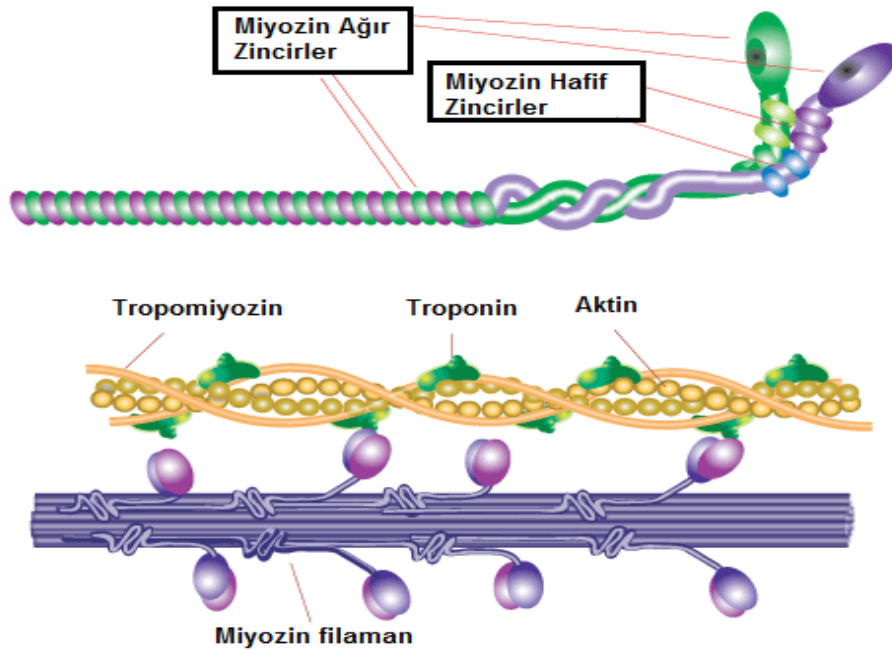


**Şekil 12:** Etanersept moleküler yapısı (Kaynak 154'ten alınmıştır.)

### II.3. Miyozin

Miyozin kasta en yüksek miktarda bulunan 480 kD'luk proteindir ve kalın filamanların en önemli komponentidir. Her biri 200 kD'luk iki miyozin ağır zincir (MHC) ve 20 kD'luk 4 hafif zincirden oluşur. Kuyruk ve globüler başlar olmak üzere 2 önemli bölgesi vardır. İki ağır zincir birbiri etrafında spiral olarak sarılır. Bu zincirlerin herbirinin ucu kıvrılarak miyozin başını oluşturur. Çift sarmal miyozin molekülünün bir ucunda 2 serbest baş vardır. Sarmalın devam eden bölümü kuyruk adını alır. Her başta bulunan 2 hafif zincir, dolayısı ile iki başta toplam 4 hafif zincir, kas kasılması sırasında başın fonksiyonunu kontrol eder. Miyozin filamanlarının kuyrukları demet halinde toplanarak filamanın gövdesini oluşturur. Kuyruğu ile aktinle, başı ile adenozin trifosfat ile bağlantı halindedir. Miyozin ağır zincirin, değişik genler ile kodlanan izoformları vardır. Bu izoformlar ile kas lifinin özelliği belirlenir. Bir kas lifi birden farklı izoform içerebilir. Memelilerde kas lifleri ana olarak içerdikleri 4 miyozin izoformuna göre ayrılır; yavaş kasılan lif (Tip 1), hızlı kasılan lif (Tip 2A,2X,2B). En hızlı kasılan izoform 2B, en yavaş kasılan da 1'dir. Miyozin izoformlar miyozin ATPaz aktivitesi, yorulabilirlik ve maksimum miyolif kısalma hızı ile fonksiyonel olarak ayrılırlar (155).

**Şekil 13:** Miyozin protein yapısı (Kaynak 156'dan alınmıştır.)



#### II.4. Deneysel Sepsis Modelleri

Bu güne kadar sepsisin hayvanlar üzerinde değişik özelliklerinin araştırılması için akciğer, cilt, kan dolaşımı ve intraabdominal enfeksiyon modelleri kullanılmıştır. En ön plana çıkan ve sık kullanılan 3 model aşağıda anlatılmıştır.

1-Lipopolisakkarid veya endotoksin enjeksiyonu : Lipopolisakkarid (LPS) saflaştırılmış glikolipid yapıya sahiptir. Endotoksin ise LPS'ye ek olarak az miktarda hücre duvarı proteinleri, lipidler, lipoproteinler ve polisakkarid içerir. LPS toksisitesi çoğunlukla içerdiği lipid A yapıdan kaynaklanır. Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa gibi birçok gram-negatif bakteriden elde edilmesine rağmen deneysel septik şok çalışmaları E. coli'den elde edilen LPS'ler üzerinde yoğunlaşmıştır. O26:B6, O55:B5, O111:B4 gibi farklı serotipleri kullanılmaktadır. Periton veya damar içine uygulanabilirler.

2-Damar veya periton içine canlı bakteri uygulanması: Literatürde özellikle intravenöz veya periton içine E. Coli verilmesi ile oluşturulmuş modeller mevcuttur. Mortalite bu modeller ile çok hızlı şekilde oluşmaktadır.

3-Çekal ligasyon ve ponksiyon (CLP): Sıçanlarda ve farede sıklıkla kullanılmaktadır. Anestezi altındaki hayvanlarda bağırsak geçişini bozmaksızın çekumun standart bir iplik ile bağlanması ve daha sonra bağlanan kısmın standart ölçüdeki bir enjektör iğnesi ile bir veya iki kez delinmesi esasına dayanır. CLP ile oluşturulan septik şok modellerinin dezavantajları farklı araştırma gruplarının sonuçları arasında değişkenlikler gözlenebilmesidir. Bu değişkenlikler farklı seviyelerde çekum bağlanması, delme sayısı ve kullanılan iğnenin çapı, hayvanların aç veya tok olması, resüsitasyon amacıyla sıvı verilip verilmemesi ile ilgilidir. Bu modelin avantajları ise uygulamanın kolay ve ucuz olması, diğer modellerden farklı olarak gerçeğe daha yakın olarak polimikrobiyal septik şok tablosu gelişmesi, klinikteki septik şok tablosuna benzer bir model oluşması ve modifikasyonları ile kronik sepsis oluşturulabilmesidir. Hem LPS hem CLP ile oluşturulan modellerde septik şokta metabolik, immünolojik, fizyolojik, toksikolojik ve farmakolojik çalışmalar yapılmaktadır. İnflamatuvar sitokinler hem LPS'de hem de CLP ile sepsisin oluşturulduğu modellerde klinikteki sepsis tablosunda olduğu gibi tetiklenmektedir (157-161).

### III. GEREÇ ve YÖNTEM

#### III.1. Deney Hayvanları

Çalışma ile ilgili tüm prosedürler için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı alınmıştır (Ek 1). Çalışmalar Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Ünitesi, Cerrahi Araştırmalar Birimi, Nöroloji Anabilim Dalı EMG Ünitesi ve Nöromusküler Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Deneylerde 2-3 aylık, ortalama 340 ( $\pm 36$ ) gr ağırlığında, erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 21°C'lik oda sıcaklığında 12 saat gün ışığı-12 saat karanlık ortamda ve su ile yiyeceğe serbest ulaşımli olarak barındırılmıştır. Rastgele olarak seçilen sıçanlarda 6 grupta inceleme yapılmıştır. Gruplar;

Grup I: Boş operasyon uygulanan

Grup II: Çekal ligasyon ve ponksiyon uygulanan

Grup III: Çekal ligasyon ve ponksiyon uygulanan ve pentoksifilin verilen

Grup IV: Boş operasyon uygulanan ve pentoksifilin verilen

Grup V: Çekal ligasyon ve ponksiyon uygulanan ve etanersept verilen

Grup VI: Boş operasyon uygulanan ve etanersept verilen

#### III.2. Model Oluşturulması ve Takibi

Çekal ligasyon ve ponksiyon daha önce tanımlanmış prosedürler doğrultusunda uygulandı (157-161). Cerrahi girişimler öncesi 500mg/kg intraperitoneal (ip.) kloral hidrat ile anestezi uygulandı. Cilt ve cilt altı dokular, karın ön duvar kasları ve periton orta hattın 2 cm'lik kesi ile geçildi. Karın eksplorasyonu ile çekum bulundu ve dışarıya alındı. Proksimalden sağılarak barsak içeriği distale ilerletildi. Orta kesimden ilioçekal arter korunarak 3.0 ipek sütür ile bağlandı. 18 G iğne ile mezenterik ve antimezenterik taraftan geçildi. Küçük bir damla barsak içeriği dışarıya çıkarıldı. Çekum yeniden karın içine yerleştirildi. Periton, karın ön duvar kasları ile cilt sütüre edilerek kapatıldı (Şekil 14). Boş operasyonda ise cilt, cilt altı, karın ön duvarı kasları ve periton 2cm'lik kesi ile açıldı ve yeniden sütüre edilerek kapatıldı. Çekuma müdahale yapılmadı. Tüm sıçanlara operasyon sonrasında 5ml/100gr, 37 °C sıcaklığında, steril %0.9'luk serum fizyolojinin subkutan (sc.)

enjeksiyonu ile sıvı desteği verildi. Operasyon sonrası analjezi için parasetamol 100mg/kg peroral (po.) olarak tek sefer uygulandı.

Hayvanlarda sepsis takibi daha önce deney hayvanlarında tanımlanan klinik kriterlere göre kilo, ateş, günlük aktivite, kamburlaşma, piloereksiyon, abdominal şişme-asit, subkonjunktival kanama izlemi ile yapıldı (158).

İkinci, 6. ve 14. günlerde kilo ve vücut sıcaklığı takipleri yapıldı. Vücut sıcaklığı rektal prob kullanılarak ölçüldü.

### **III.3. Pentoksifilin ve Etanersept Uygulanması**

Anti-TNF- $\alpha$  ajan olarak pentoksifilin ve etanersept kullanıldı. Pentoksifilin ve etanersept gruplara ayrı ayrı uygulandı. CLP veya boş operasyon uygulanmış iki gruba pentoksifilin 10mg/100gr ip. dozunda operasyondan 1 saat önce ve takiben 6 gün boyunca aynı dozda verildi. CLP veya boş operasyon uygulanmış başka iki gruba etanersept 0.4mg/kg sc. dozunda operasyondan 24 saat önce uygulandı ve 72 saat sonra aynı dozda tekrar edildi.

### **III.4. Elektronöromiyografik İnceleme**

Cerrahi işlem sonrası 48. saatte sıçanlara elektronöromiyografik (ENMG) inceleme uygulandı. Tüm sıçanlarda tibial sinirin siyatik çentikten uyarımı ve yüzeysel kayıt elektrotları ile ayak sırtı kas grubundan birleşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) kaydı elde edildi. Gruplardan seçilen bazı sıçanlarda kuyruk sinirinde duyu sinir iletim ve motor sinir iletim çalışması da yapıldı. Ayrıca tüm sıçanlara ayak sırtından kayıtlarla tibial sinirin 3 Hz ardısıra sinir uyarımı uygulandı. ENMG çalışmaları için sağ alt ekstremité kullanıldı.

### **III.5. TNF- $\alpha$ 'nın Plazma ve Kasta Tayini**

#### **III.5.1. Örneklerin hazırlanması**

TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  operasyon sonrası 2. saatte elde edilen plazma ve kas örneklerinden incelendi. Operasyon uygulanan sıçanlardan kuyruk veninden EDTA'lı tüplere alınan kandan 3000 rpm hızında, 15 dk santrifüj uygulanarak elde

edilen plazma -80 °C’de saklandı. Kastaki düzeylerinin tesbiti için sol alt ekstremiteden alınan kas örnekleri sıvı nitrojende dondurularak -80 °C’de saklandı.

Uygulamalardan belirli saatler sonrasında alınan kas dokuları tartıldı ve her bir örnek % 20 (ağırlık/hacim) oranında olacak şekilde buz üzerinde 2 mM EDTA, 0.15 M NaCl, %1 Triton X-100 ve 3 mM Benzamidin içeren 50 mM Tris pH 7.4 tamponunda Ultrathorax homojenizatörü 300 rpm hızda 1 + 1 + 1 dk homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar 12 dakika 12000 x G’de +4° C sıcaklıkta santrifüj edildi. Santrifüj sonrası örneklerin süpernatanı alınıp, dondurup çözülmeden kaynaklanabilecek denatürasyonu engellemek üzere farklı ependorf tüplerine ayrıldı. Örnekler kullanılabilecek -80°C’ de saklandı. Tüm biyokimyasal incelemeler örneklerden elde edilen süpernatantlar ile yapıldı. Serum örnekleri kullanılmadan önce aynı şekilde ayrılıp kullanılabilecek -80°C’ de saklandı. Serum ve kas örnekleri ELISA çalışmasında 3 kez seyreltilerek kullanıldı.

### **III.5.2. TNF- $\alpha$ tayini**

Serum ve kas örneklerindeki TNF-  $\alpha$  miktarları sandviç ELISA yöntemi ile tayin edildi. TNF- $\alpha$  ölçümünde Invitrogen TNF- $\alpha$  ELISA kiti kullanıldı. Bu kitte mikropalakalara monoklonal TNF- $\alpha$  antikoru yapıştırılmış bulunmaktadır. Bu şekilde, örnek ve standartlarda var olan TNF- $\alpha$  bu antikor tarafından tanınır ve tutulur. Daha sonra bağlı örnekleri tanıyan biyotinlenmiş bir poliklonal TNF- $\alpha$  antikoru tutunmuş protein tanır. Sandviç sisteminin en son bileşeni olan streptavidin – peroksidaz konjugatı ise biyotinli antikoru tanıyarak ortama eklenen kromojen substrat yardımı ile çok düşük miktarlarda bile var olan TNF- $\alpha$  miktarının saptanmasını sağlar. Deney üreticinin prensiplerine uygun olarak yapılmıştır. Deney ortamında 100  $\mu$ L örnek kullanılmıştır. Kısaca özetle her kuyuya 100  $\mu$ L örnek veya standart eklenip üzerleri kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra kuyular beş kez 200  $\mu$ L yıkama tamponu ile yıkandı. Plakalardaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 100  $\mu$ L biyotinlenmiş TNF- $\alpha$  eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra beş kez 200  $\mu$ L yıkama tamponu ile yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100  $\mu$ L streptavidin – peroksidaz konjugatı eklenerek 30 dakika inkübe edildi. İnkubasyon sonunda kuyular beş kez 200  $\mu$ L yıkama tamponu ile yıkandı. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kuyu başına 100  $\mu$ L kromojen substrat eklenerek 30



dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda renk oluşumu tepkimesini durdurmak amacı ile kuyu başına 0.5 N HCl asitten oluşan 100 µL durdurma çözeltisi eklendi ve sonuçlar 30 dakika içerisinde Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikropłaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar regresyon analizi ile standart grafikten elde edildi.

### **III.6. Miyozin Düzeyi Ölçümü**

#### **III.6.1. Kas protein tayini**

Altıncı günde sağ alt ekstremite arka bacak kas grubundan alınan kas örneği -80 °C’de saklandı. Örneklerde protein tayini sığır serum albumininin standart olarak kullanıldığı Bisinkronik asit yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntem özellikle deterjanlar ile daha az etkileşime geçtiği için tercih edildi. Ölçümler ve onu takiben yapılan hesaplamalar Spectramax M2 spektrofotometrik plaka okuyucusu ve SOFTmax Pro 3.1.1 yazılımı (Molecular Devices, San Diego, CA) kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerdeki protein derişimi standart grafik kullanılarak hesaplandı.

#### **III.6.2. Miyozin ağır zincir oranlarının incelenmesi**

Kas dokusundaki yıkımda miyozin ağır zinciri oranlarını gözlemlemek amacı ile Western Blot yöntemi uygulandı. Western Blot yönteminde örnekler öncelikle elektroforezde ayrıştırıldıktan sonra elektrik akımı yardımı ile bir membrana aktarılır. Bu membranda primer ve sekonder antikorların yardımı ile sadece hedeflenen proteinin gözlenmesi sağlanır. Homojenizasyon sonucu elde edilen süpernatantlar %3 sıkıştırıcı % 5 ayrıştırıcı jelden oluşan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) tabi edildi. Kuyu başına örnekler 30 µg olacak şekilde SDS-PAGE jeline yüklendi ve örnekler 120 V sabit akımda 1 saat 15 dakika yürütüldü. SDS-PAGE elektroforezi sonrası jeller ve nitroselüloz membran öncelikle 48 mM Tris baz, 39 mM Glisin ve % 20 metanol içeren transfer tamponunda 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel ve membran örneklerin membrana aktarılmasını sağlayacak kasetlerin içerisine yerleştirilerek sulu sistemde transfer tamponu kullanılarak 2 saat 80 V akıma tabi edildi. Bu işlem sonrası proteinlerin membrana geçişleri membranın sabit olmayan Ponceau S boyaması ile jelin kalıcı Coomassie Brilliant Blue R-250 boyaması yapılarak kontrol edildi. Membrana aktarılan örnekler

bundan sonra % 5 BSA ve % 3 süt tozu içeren blok çözeltisi ile 1 saat + 4°C'ta inkübe edildi. Bu işlem istenmeyen protein bağlanmalarını engellemek amacı ile gerçekleştirilir. Bu süre sonunda membrandan blok çözeltisi uzaklaştırıldı ve 1:150 seyreltilerek kullanılan primer sıçan miyozin ağır zincir antikoru ile 16 saat 4°C'ta inkübe edildi. Bu sürenin sonunda primer antikor uzaklaştırıldı ve membran fosfat-salin tamponu ile her biri 5 dakikadan oluşan 5 yıkamaya tabi tutuldu. Bu yıkamanın ardından 1:200 kez seyreltilen anti-fare IgG peroksidaz konjugatından oluşan sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda membran yine fosfat-salin tamponu ile her biri 5 dakikadan oluşan 5 yıkamaya tabi tutuldu. Jeldeki bantların görünür kılınması kemilüminesans substrat içeren ECL yöntemi ile gerçekleştirildi. Eşit miktarlarda substrat çözeltileri karıştırılarak membran ile yaklaşık 3 dakika inkübe edildi. Membran zerindeki fazla çözelti alındı ve jelatin içerisine yerleştirildi. Jelatin ve röntgen filmi karanlıkta bir kaset içerisine yerleştirilerek oluşan görüntünün filme aktarılması için 90 saniyelik ekpozisyon yapıldı. Daha sonra filme aktarılan bantlar banyo işlemi sayesinde görünür kılındı. Filmden elde edilen bantların yoğunluğu dansitometrik analiz için tarandı ve Bio-Rad Quantity One adlı yazılım programı kullanılarak sayısal veriler elde edildi.

### **III.7. Biyopsi İncelenmesi**

Altıncı gün, elektrofizyolojik incelemenin yapıldığı sağ alt ekstremitte arka bacak kas grubundan, kas patolojisinin incelenmesi için kas biyopsisi alındı. Alınan rnekler sıvı nitrojen ile dondurularak -80 °C'de saklandı. Bu örneklerden hazırlanan preparatlar hematoksilen ve eozin ile boyanarak kas patolojisi açısından incelendi. Bu örneklere ayrıca miyozin ağır zincir-hızlı form (MY-32, Novus NB600-701) ile immünhistokimyasal (IHC) boyama yapıldı. Grup II, grup III ile grup V'in her birinden 2'şer sıçandan siyatik sinir biyopsisi de alındı. Plastik örneklerden elde edilen kesitlerin metilen mavisi ile boyanması sonrası miyelin ve akson yapısı incelendi. Grup II'den 3 örneğe kas lifi tip ayrımı için NADH boyaması da yapıldı. Ondördüncü güne kadar yaşamı devam eden sıçanlardan, 14. günde sol arka bacak kas grubundan inceleme için biyopsi yapıldı. Hematoksilen ve eozin ile boyanarak

kas patolojisi açısından incelendi. Tüm örnekler ait oldukları gruplara kör olarak (S.E.Ö.) incelendi.

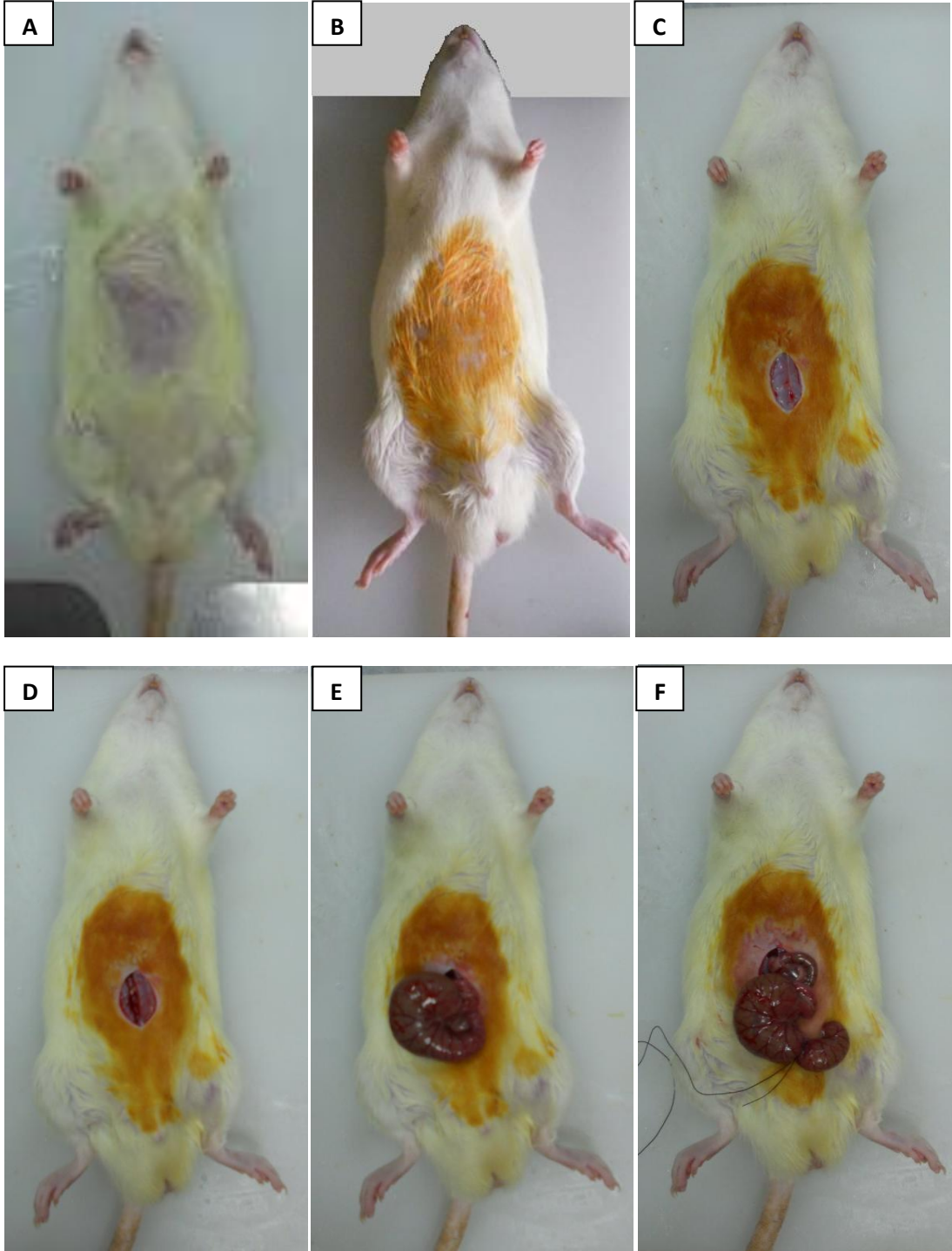
### **III.8. İstatistiksel Analiz**

Tüm istatistiksel analizler SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada incelenen sayısal değişkenlerin, her deney grubuna ait ortalama değerleri t-testi kullanılarak belirlendi. TNF- $\alpha$  düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması için Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi, elektronöromiyografik bulgularının gruplararası karşılaştırılması için de Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edildi. Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testinin kullanıldığı kas TNF- $\alpha$  düzeyinin alt grup ikili karşılaştırmasında istatistiksel anlamlılık değeri  $p < 0.003$  olarak hesaplandı ve karşılaştırmada kullanıldı. Elektromiyografi bulgularının alt gruplarda ikili karşılaştırması için Dunn testi uygulandı.

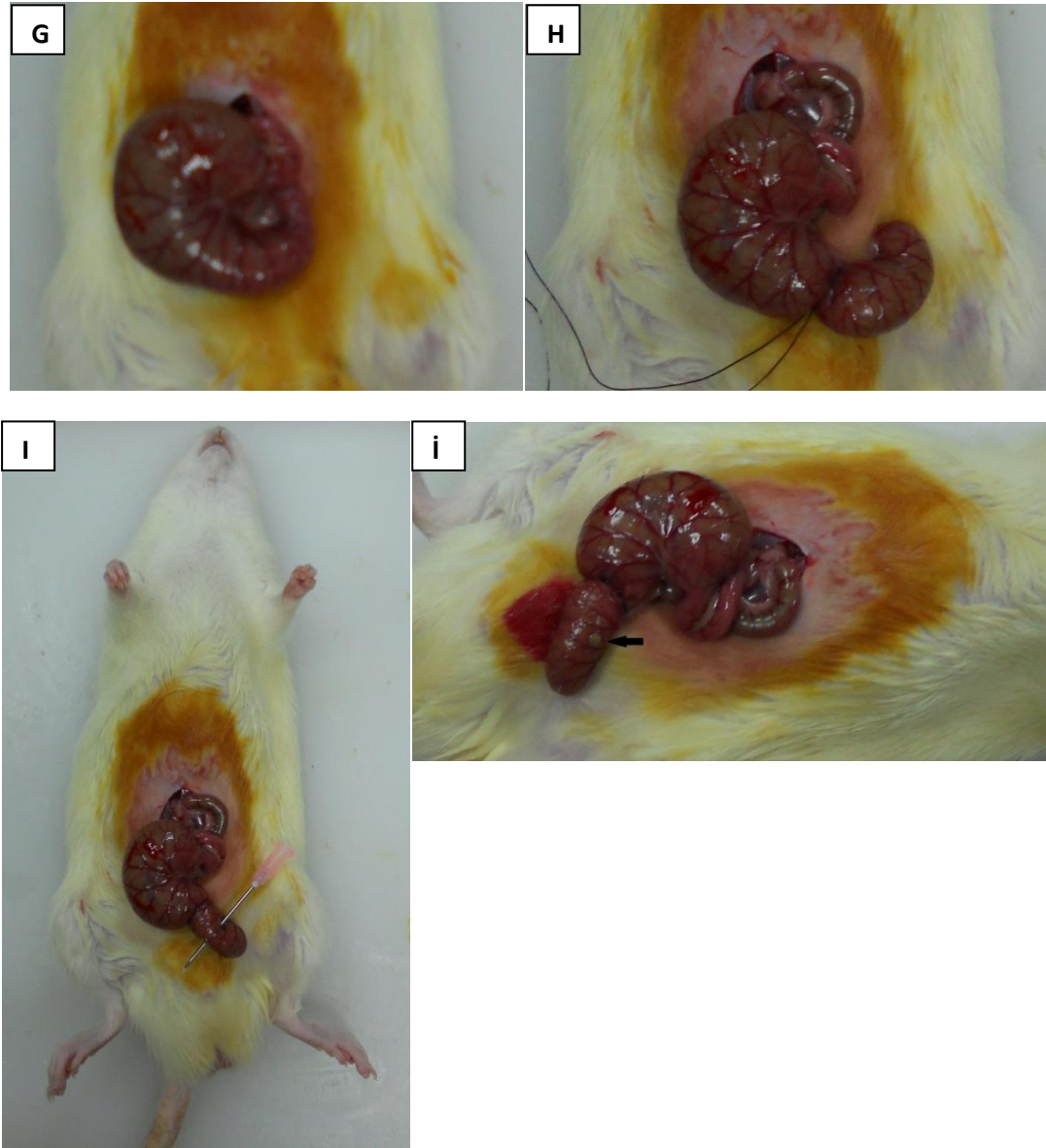
**Tablo 2:** Çalışma planının zamansal özeti

| <b>Zaman</b>              | <b>İşlem</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Operasyondan 24 saat önce | Etanersept grubuna profilaktik ilaç uygulanması (0.4mg/kg sc.)                                                                                                                                                                                                                                     |
| Operasyondan 1 saat önce  | Pentoksifilin grubunda profilaktik ilaç uygulanması (10mg/100gr ip.)                                                                                                                                                                                                                               |
| Operasyon günü, 0. gün    | 1-Bazal vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı değerlerinin ölçümü<br>2-Çekal ligasyon ve ponksiyon veya boş operasyon uygulanması<br>3-Operasyondan sonra 2. saatte TNF- $\alpha$ düzeylerinin tesbiti için kuyruk veninden kan ve sol alt ekstremitte arka bacak kas grubundan kas biyopsisi alınması |
| Operasyon sonrası 1. gün  | 1-Septik bulguların takibi<br>2-Pentoksifilin grubuna ilaç uygulaması                                                                                                                                                                                                                              |
| Operasyon sonrası 2. gün  | 1-Septik bulguların takibi<br>2-Pentoksifilin grubuna ilaç uygulaması<br>3-Etanersept grubuna ilk dozun 72. saatinde ilaç tekrarı<br>4-İkinci gün vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı değerlerinin ölçümü<br>5-ENMG uygulanması, sağ alt ekstremitte ve kuyruk sinirinden inceleme yapıldı.          |
| Operasyon sonrası 3. gün  | 1-Septik bulguların takibi<br>2-Pentoksifilin grubuna ilaç uygulaması                                                                                                                                                                                                                              |
| Operasyon sonrası 4. gün  | 1-Septik bulguların takibi<br>2-Pentoksifilin grubuna ilaç uygulaması                                                                                                                                                                                                                              |
| Operasyon sonrası 5. gün  | 1-Septik bulguların takibi<br>2-Pentoksifilin grubuna ilaç uygulaması                                                                                                                                                                                                                              |
| Operasyon sonrası 6. gün  | 1-Septik bulguların takibi<br>2-Pentoksifilin grubuna ilaç uygulaması<br>3-Altıncı gün vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı değerlerinin ölçümü<br>4-Sağ alt ekstremitte arka bacak kas grubundan miyozin düzeyi ölçümü ve kas patolojisinin incelenmesi için kas biyopsisi alınması                  |
| Operasyon sonrası 14. gün | 1-Ondördüncü gün vücut ağırlığı ve vücut sıcaklığı değerlerinin ölçümü<br>2-Yaşamı 14. güne devam eden sıçanlardan sol alt ekstremitte arka bacak kas grubundan kas biyopsisi alınması ve yüksek doz kloral hidrat anestezisi ile ötenazi uygulanması                                              |

**Şekil 14: Çekal Ligasyon ve Ponksiyon Prosedürü**



**Şekil 14:** Çekal Ligasyon ve Ponksiyon Prosedürü (Devam)



**Şekil 14:** **A;** karın ön duvar kılırları traş edildi. **B;** Povidon iyodin ile cilde antisepsi uygulandı. **C;** cilde 2cm'lik bir kesi uygulandı. **D;** karın ön duvarı kasları ve periton 2cm'lik kesi ile açıldı. **E ve G;** Karın eksplorasyonu ile çekum bulunup karın dışarısına alındı. **F ve H;** Barsak içeriği proksimalden sağılarak distale ilerletildi ve ilioçekal arter korunarak çekum orta kesimden bağlandı. **I;** 18 G iğne ile mezenterik ve antimezenterik taraftan geçildi. **İ;** Küçük bir damla barsak içeriği dışarıya çıkarıldı (ok).

#### IV. BULGULAR

Çalışmanın bulguları aşağıda listelenen başlıklar altında incelenmiştir.

1. Model oluşturulması
2. Gruplardaki mortalite yüzdesi ve septik bulguların takibi
3. Gruplara göre 2. saat plazma ve kas TNF- $\alpha$  düzeyleri
4. Gruplara göre 48. saat elektrofizyolojik bulgular
5. Gruplara göre 6. gün ve 14. gün kas biyopsisi bulguları
6. Gruplara göre 6. gün miyozin ağır zincir düzeyleri
7. İkinci saat TNF- $\alpha$  düzeyleri ile 6.gün miyozin ağır zincir düzeyleri arası ilişki

##### IV. 1. Model oluşturulması

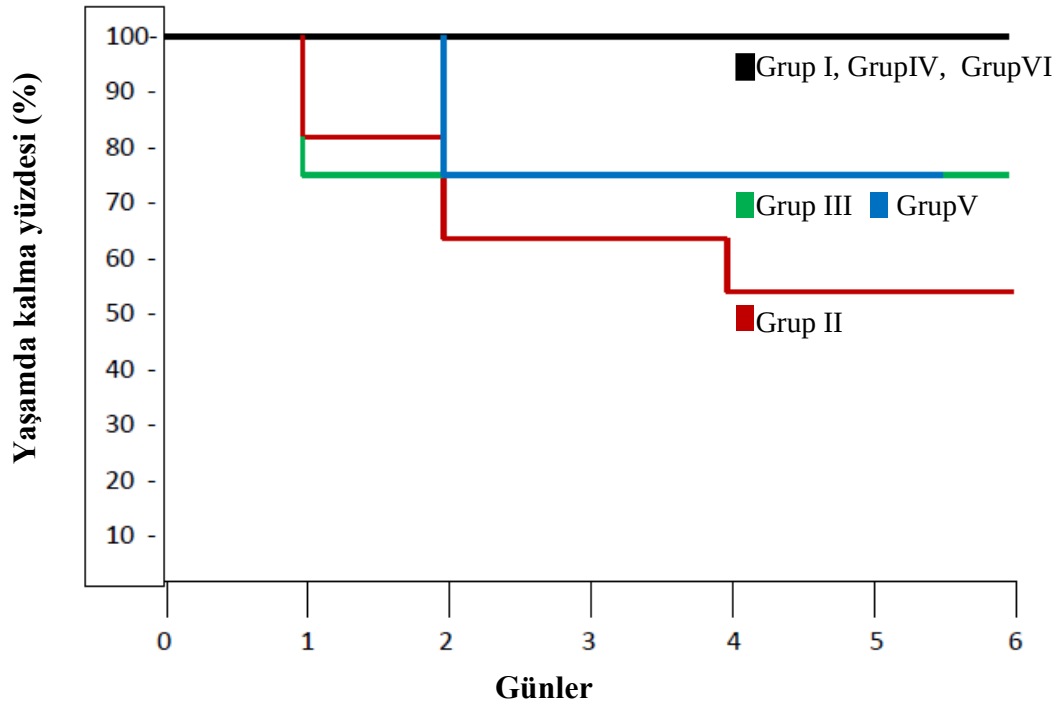
Daha önce Şekil 14'te tarif edildiği şekilde oluşturulan çekal ligasyon ve ponksiyon grubu (Grup II) ve çekuma müdahale yapılmayan kontrol grubu (Grup I) özellikleri değerlendirildiğinde grup II'de kilo kaybının 14. güne kadar devam ettiği (Şekil 16-2), aktivitede azalma, piloereksiyon, subkonjonktival hemoraji gibi septik bulguların yine grup II'de daha çok sıklıkla ortaya çıktığı (Tablo 4), plazma ve kas TNF- $\alpha$  düzeylerinde sepsis ile uyumlu olacak şekilde yükselme olduğu (Tablo 5, Şekil 18), kritik hastalık miyopatisinin karakteristik özelliklerinden kas seçici miyozin ağır zincir kaybının belirgin olduğu (Şekil 23-2, Tablo 9) saptandı.

##### IV. 2. Mortalite yüzdesi ve septik bulguların takibinin değerlendirilmesi

Çalışmalar için 45 sıçan kullanıldı. 6 grubun her birinde 6. güne ulaşan 6 adet sıçan olacak şekilde plan yapıldı. Grup I, IV ve VI'da mortalite gözlenmedi. Mortalite yüzdesi grup II'de %45,5 (5/11), grup III ve V'in her birinde %25 (2/8) olarak hesaplandı. Gruplara göre mortalite yüzdeleri Tablo 3'te ve günlere göre hayatta kalım yüzdeleri yaşam çizelgesinde (Şekil 15) özetlenmiştir.

**Tablo 3:** Grupların mortalite yüzdeleri

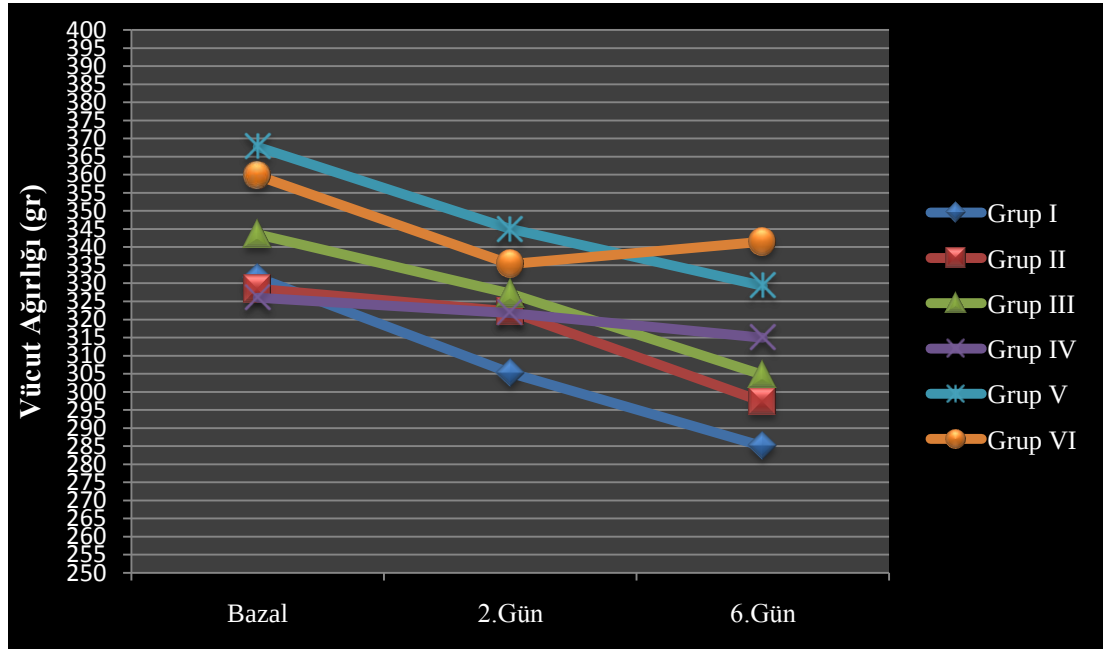
| Gruplar                                          | Toplam<br>operasyon<br>uygulanan sayı | Ölen sayısı | Yaşayan<br>sayısı | Mortalite<br>Yüzdesi |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------------|----------------------|
| <b>Grup I</b><br>(Boş Operasyon)                 | 6                                     | 0           | 6                 | %0                   |
| <b>Grup II</b><br>(CLP)                          | 11                                    | 5           | 6                 | %45,5                |
| <b>Grup III</b><br>(CLP+Pentoksifilin)           | 8                                     | 2           | 6                 | %25                  |
| <b>Grup IV</b><br>(Boş Operasyon+ Pentoksifilin) | 6                                     | 0           | 6                 | %0                   |
| <b>Grup V</b><br>(CLP+Etanersept)                | 8                                     | 2           | 6                 | %25                  |
| <b>Grup VI</b><br>(Boş operasyon+ Etanersept)    | 6                                     | 0           | 6                 | %0                   |

**Şekil 15:** Yaşam çizelgesi

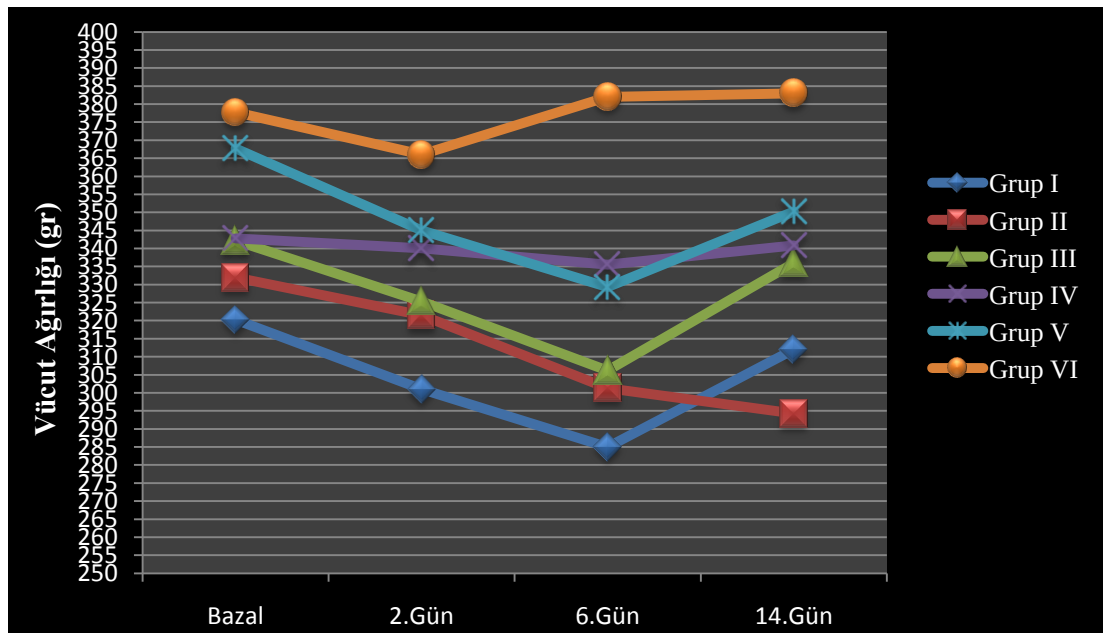


Grupların ortalama vücut ağırlığı takiplerinde grup II ve grup VI dışındaki gruplarda ilk 6 gün kilo kaybı sonrasında kilo artışı görüldü. Grup II’de kilo kaybı 14 gün boyunca devam ederken grup VI’da 2. günden itibaren kilo artışı olduğu gözlemlendi. (Şekil 16-1 ve Şekil 16-2)

**Şekil 16-1:** Grupların 6 günlük kilo takip çizelgesi

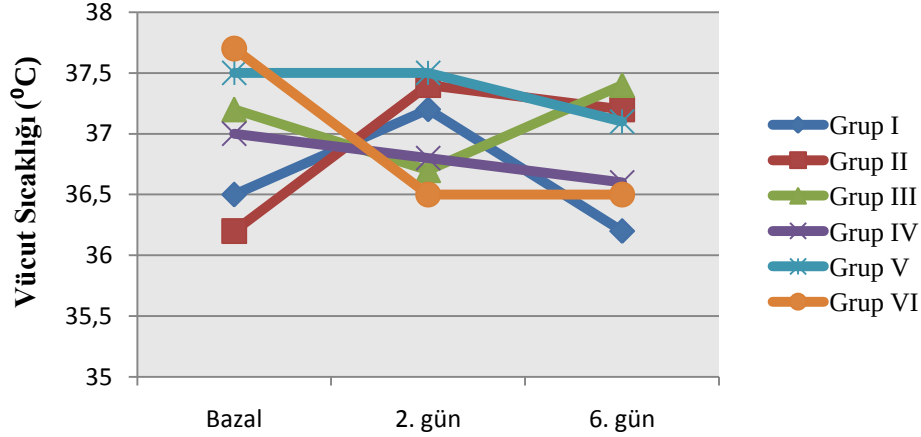


**Şekil 16-2:** Grupların 14 günlük kilo takip çizelgesi



Vücut sıcaklığı takiplerinde grup I ve grup II’de 2. günde ortalama değerlerde bazala göre bir yükselme olduğu ve grup II’de bu yüksekliğin 6. güne kadar devam ettiği, grup I’de 6. günde bazal değerlere gerileme olduğu, grup III ve V’te 2. günde vücut sıcaklığında bir yükselme eğilimi olmadığı gözlemlendi (Şekil 17).

**Şekil 17:** Vücut sıcaklığı takip çizelgesi



Septik bulgular daha önce literatürde tanımlanan kriterler ile takip edildi. Bu bulgular içinde aktivitede azalma, piloereksiyon ve subkonjonktival hemoraji en sık olarak grup II’de gözlemlendi. Septik bulgularının gruplarda gözlemlendiği hayvan sayıları Tablo 4’de özetlenmiştir. Septik bulgular için örnek görüntüler Ek-2’dedir.

**Tablo 4:** Septik bulguların takibi

| Grup                                                  | Aktivite Azalması | Subkonjonktival Hemoraji | Piloereksiyon | Kamburlaşma | Abdominal Distansiyon |
|-------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------|-------------|-----------------------|
| <b>Grup I</b> (n=6)<br>(Boş Operasyon)                | 1                 | 1                        | 0             | 0           | 0                     |
| <b>Grup II</b> (n=6)<br>(CLP)                         | 4                 | 4                        | 6             | 1           | 1                     |
| <b>Grup III</b> (n=6)<br>(CLP+Pentoksifilin)          | 2                 | 3                        | 1             | 0           | 0                     |
| <b>Grup IV</b> (n=6)<br>(Boş Operasyon+Pentoksifilin) | 2                 | 1                        | 0             | 0           | 0                     |
| <b>Grup V</b> (n=6)<br>(CLP+Etanersept)               | 2                 | 1                        | 0             | 0           | 0                     |
| <b>Grup VI</b> (n=6)<br>(Boş Operasyon+Etanersept)    | 2                 | 2                        | 1             | 1           | 0                     |

### IV.3. İkinci saat plazma ve kas TNF- $\alpha$ düzeylerinin karşılaştırılması

TNF- $\alpha$  plazma değerlerinde en yüksek değer grup II’de gözlenmekle birlikte diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Ancak kas TNF- $\alpha$  düzeylerine bakıldığında serum değerlerindeki oranlardan bağımsız olarak grup II’de grup III dışındaki tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme izlendi. (Tablo 5 ve Şekil 18) .

**Tablo 5:** TNF- $\alpha$  plazma ve kas düzeyleri

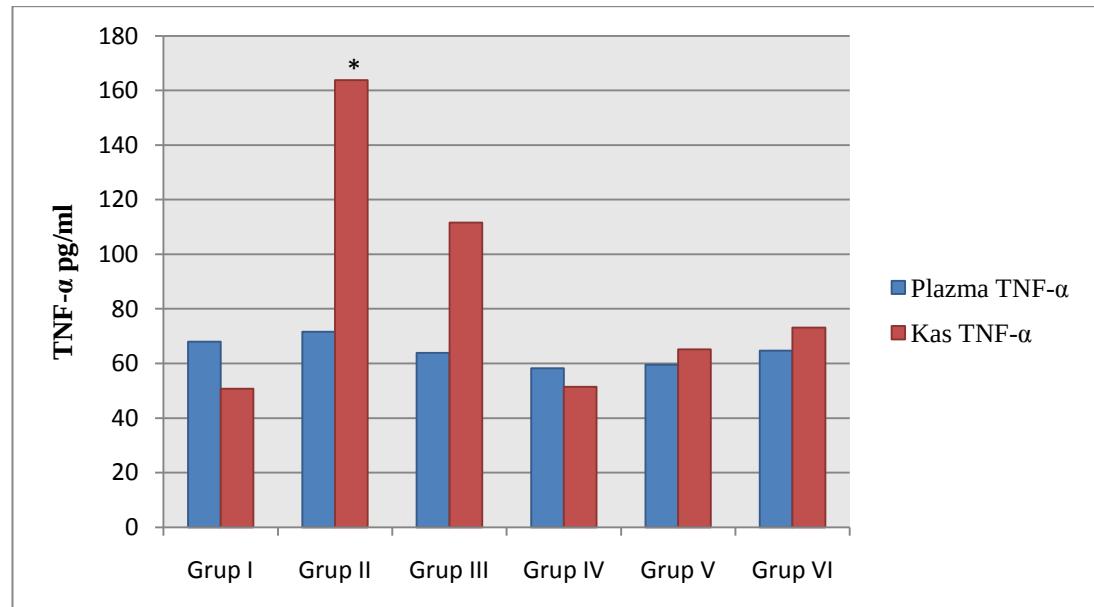
| Grup                                            | TNF- $\alpha$ düzeyi pg/ml |                         |
|-------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                                                 | Plazma                     | Kas*                    |
| <b>Grup I</b><br>(Boş Operasyon)                | 67,98 ( $\pm$ 9,78)        | 50,69 ( $\pm$ 32,71)    |
| <b>Grup II</b><br>(CLP)                         | 71,57 ( $\pm$ 21,19)       | 163,74 ( $\pm$ 86,82) † |
| <b>Grup III</b><br>(CLP+Pentoksifilin)          | 63,83 ( $\pm$ 7,42)        | 111,53 ( $\pm$ 65,23)   |
| <b>Grup IV</b><br>(Boş Operasyon+Pentoksifilin) | 58,23 ( $\pm$ 8,69)        | 51,46 ( $\pm$ 22,96)    |
| <b>Grup V</b><br>(CLP+Etanersept)               | 59,57 ( $\pm$ 7,34)        | 65,16 ( $\pm$ 3,61)     |
| <b>Grup VI</b><br>(Boş Operasyon+Etanersept)    | 64,66 ( $\pm$ 1,86)        | 73,13 ( $\pm$ 12,73)    |

\*Gruplar arası kas TNF- $\alpha$  değerleri arasında anlamlı fark var. ( $p < 0.05$ )

†Grup II’nin kas TNF- $\alpha$  düzeylerindeki yükselme grup I, grup IV, grup V ve grup VI’ya göre anlamlı derecede yüksek bulundu. ( $p < 0.003$ )

Gruplar arasında plazma TNF- $\alpha$  düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi.

**Şekil 18:** TNF- $\alpha$  plazma ve kas düzeyleri



#### IV.4. Elektrofizyolojik bulguların değerlendirilmesi

Siyatik çentikten uyarı ve ayak sırtından kayıtlarla elde edilen tibial sinir BKAP amplitüdünde grup II’de, grup I hariç tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüklük saptandı. Grup IV tibial sinir BKAP amplitüdü de tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksek tesbit edildi. Tibial sinir BKAP’i sürelerinde ve kuyruk siniri BKAP’i incelemelerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Grup II’den seçilmiş 3 sıçanda yapılan kuyruk duyu sinir iletim çalışması normal sınırlardaydı. Duyusal nöropati ile uyumlu bulgu saptanmadı. Tüm deneklere uygulanan ayak sırtı kayıtlı tibial sinir 3 Hz ardısıra uyarımda nöromusküler bileşke patolojisini düşündürecek dekremental yanıt gözlenmedi. ENMG bulguları Tablo 6’te özetlenmiştir.

**Tablo 6:** ENMG incelemesi bulguları

| Grup                                            | Tibial Sinir ENMG |                | Kuyruk Siniri ENMG |                |                                | 3 Hz Ardısıra Uyarımda Dekrement |
|-------------------------------------------------|-------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------------------|----------------------------------|
|                                                 | BKAP Amp* (mV)    | BKAP Süre (ms) | BKAP Amp (mV)      | BKAP Süre (ms) | Motor Sinir İletim Hızı (m/sn) |                                  |
| <b>Grup I</b><br>(Boş Operasyon)                | 0,5               | 1,42           | 2,03               | 2,3            | 22,3                           | Yok                              |
| <b>Grup II</b><br>(CLP)                         | 0,25 †            | 1,40           | 4,36               | 2,59           | 24,8                           | Yok                              |
| <b>Grup III</b><br>(CLP+Pentoksifilin)          | 0,72              | 1,27           | -                  | -              | -                              | Yok                              |
| <b>Grup IV</b><br>(Boş Operasyon+Pentoksifilin) | 1,82‡             | 1,22           | -                  | -              | -                              | Yok                              |
| <b>Grup V</b><br>(CLP+Etanersept)               | 0,67              | 1,67           | 2,9                | 2,25           | 28,48                          | Yok                              |
| <b>Grup VI</b><br>(Boş Operasyon +Etanersept)   | 0,9               | 1,18           | 4,05               | 2,57           | 29,38                          | Yok                              |

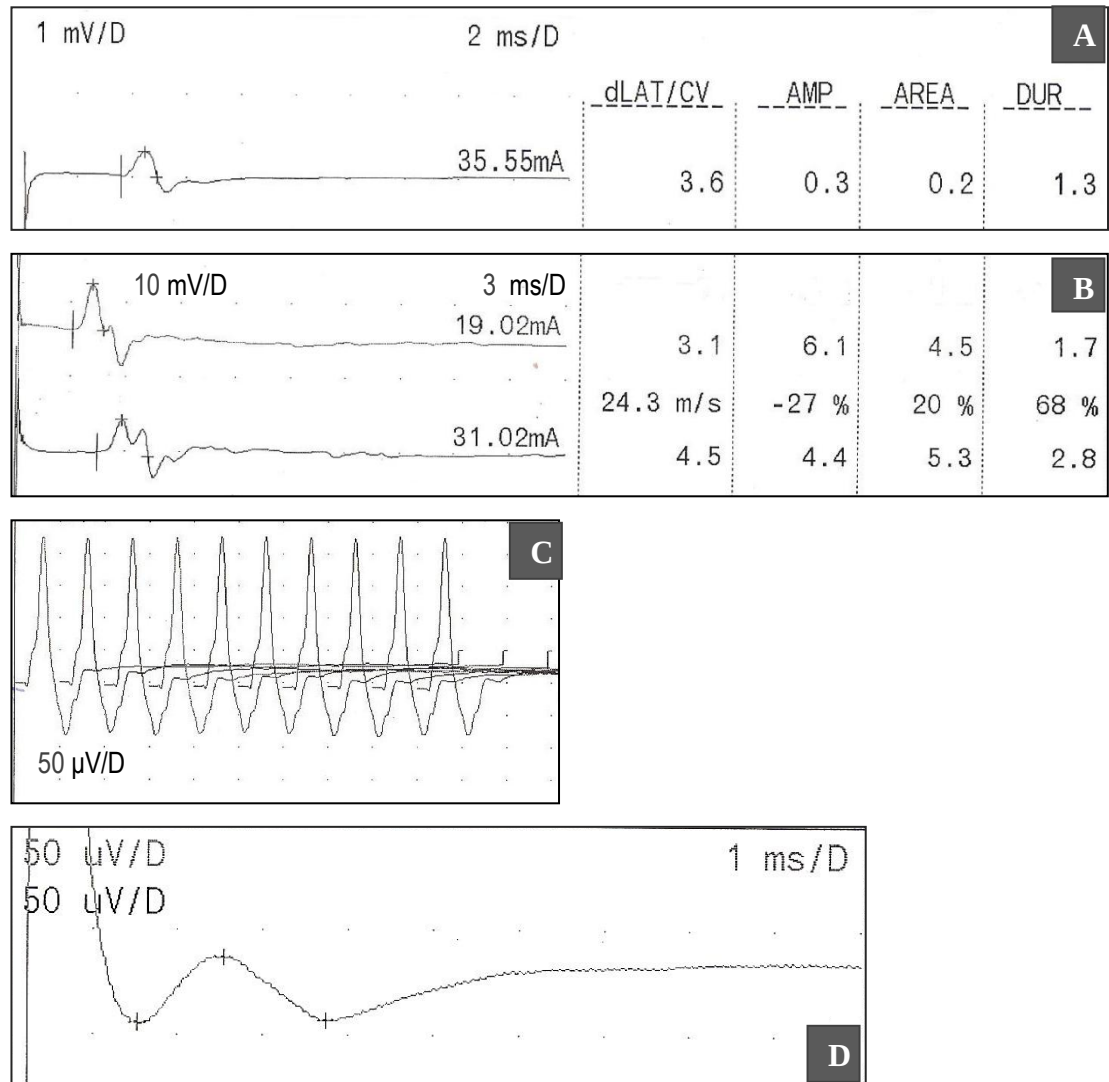
BKAP: Birleşik kas aksiyon potansiyeli Amp: Amplitüd

Grup III ve IV’te kuyruk sinir iletim çalışmasında istatistiksel çalışma için yeterli veri elde edilemedi.

\*Gruplar arası tibial sinir BKAP’i amplitüdlerinde anlamlı fark var. ( $p<0.05$ )

†Grup II’de tibial sinir BKAP amplitüdü grup III,IV,V ve VI’ya göre anlamlı olarak düşük.

‡Grup IV’te tibial sinir BKAP amplitüdü grup I,II,III,V ve VI’ya göre anlamlı olarak yüksek.

**Şekil 19:** Grup II ENMG incelemesi örnekleri

**Şekil 19 A;** Siyatik çentikten uyarı ve ayak sırtı kaydı ile elde edilen tibial sinir BKAP'i örneği. 35,55 mAmper uyarı ile 0,3 mV amplitüd ve 1.3 ms süreli BKAP'i elde edilmiştir.

**B:** Kuyruk siniri supramaksimal uyarımı ile 6,1 mV amplitüdlü, 1.7 ms süreli BKAP'i elde edilmiştir. Sinir iletim hızı 24,3 m/s olarak hesaplanmıştır.

**C:** Tibial sinirin 3 Hz ardısıra uyarımı ve ayak sırtından kayıta dekremental yanıt saptanmamıştır.

**D:** Kuyruk duyu sinir iletim çalışmasında DSAP amplitüdü 32  $\mu$ V ve hızı 30,3 m/s olarak ölçülmüştür.

#### IV.5. Biyopsi bulgularının değerlendirilmesi

Altıncı günde sağ alt ekstremitte arka bacak kas grubundan alınan kas biyopsileri örnek hazırlanması ve hematoksilen-eozin ile boyanması sonrası değerlendirildi. Kas biyopsisi incelemesinde en belirgin patolojinin özellikle grup II'de saptanan atrofik liflerle birlikte lifler arası çap farklılıkları ve atrofik liflerde bazofilik boyanma olduğu gözlemlendi. Atrofik lifler gruptaki tüm örneklerde, bazofilik boyanan lifler de altı örneğin beşinde saptandı. Atrofik lifler bu grubun 1/3'ünde orta, bazofilik lifler ise beş örneğin 4'ünde orta-yoğun olarak derecelendirilen yoğunlukta gözlemlendi. İzlenen atrofik lifler nöropatiye sekonder olarak gözlenen angüler yapıda değildi. Bazofilik boyanan lifler yine nöropatinin bulgusu olacak santral, iri ve sayıca artmış çekirdek içermiyordu. Atrofi ve bazofilik boyanmada artış primer miyopatik bir süreci yansıtmaktaydı. Pentoksifilin ve etanersept verilen grup III ve V'te, kas liflerinde atrofi ve bazofilik boyanma artışı ile giden patolojinin daha az görüldüğü saptandı. Örneklerin hiçbirinde nekroz, inflamasyon ve denervasyon bulgusu saptanmadı (Tablo 7, Şekil 20). Yaşamı 14. güne devam eden sıçanlardan karşı ekstremiteden alınan kas biyopsisi örneklerinin hematoksilen-eosin ile incelemesinde grup II'de 6. günde izlenen çap farkı ve atrofik liflerde bazofili artışının şiddetinin ve yaygınlığının azaldığı dikkati çekti. Ondördüncü gün örneklerinin bir kısmında gruplardan bağımsız olarak fokal yoğun inflamasyon, nekroz ve bağ dokusu artışı gözlemlendi. Bu kas örneklerinin incelenen diğer kesimlerinde benzer bulgu saptanmadı. Bu nedenle bu değişikliğin çekal ligasyonu takiben 2. saatte aynı lokalizasyondan TNF- $\alpha$  düzeyi ölçümü için yapılan kas biyopsisi işlemine sekonder olduğu düşünüldü (Tablo 8). Grup II'de atrofik liflerin özelliklerinin tayini amacı ile uygulanan NADH boyasında lifler arası çap farklılığı olduğu ve atrofik liflerin tip 1 lif özelliği taşıdığı görüldü (Şekil 21).

**Tablo 7:** Altıncı gün kas biyopsisi bulguları

| Grup                                                   | 6.Gün Kas Biyopsisi               |      |       |        |                                     |      |       |        |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|-------|--------|-------------------------------------|------|-------|--------|
|                                                        | Atrofik lif gösteren örnek sayısı |      |       |        | Bazofilik lif gösteren örnek sayısı |      |       |        |
|                                                        | Hafif                             | Orta | Yoğun | Toplam | Hafif                               | Orta | Yoğun | Toplam |
| <b>Grup I (n=6)</b><br>(Boş Operasyon)                 | 1                                 | -    | -     | 1      | 1                                   | -    | -     | 1      |
| <b>Grup II (n=6)</b><br>(CLP)                          | 4                                 | 2    | -     | 6      | 1                                   | 2    | 2     | 5      |
| <b>Grup III (n=6)</b><br>(CLP+Pentoksifilin)           | 3                                 | -    | -     | 3      | 1                                   | -    | -     | 1      |
| <b>Grup IV (n=6)</b><br>(Boş Operasyon +Pentoksifilin) | 1                                 | -    | -     | 1      | 1                                   | -    | -     | 1      |
| <b>Grup V(n=6)</b><br>(CLP+Etanersept)                 | 3                                 | -    | -     | 3      | 2                                   | -    | -     | 2      |
| <b>Grup VI (n=6)</b><br>(Boş Operasyon +Etanersept)    | 2                                 | -    | -     | 2      | 1                                   | -    | -     | 1      |

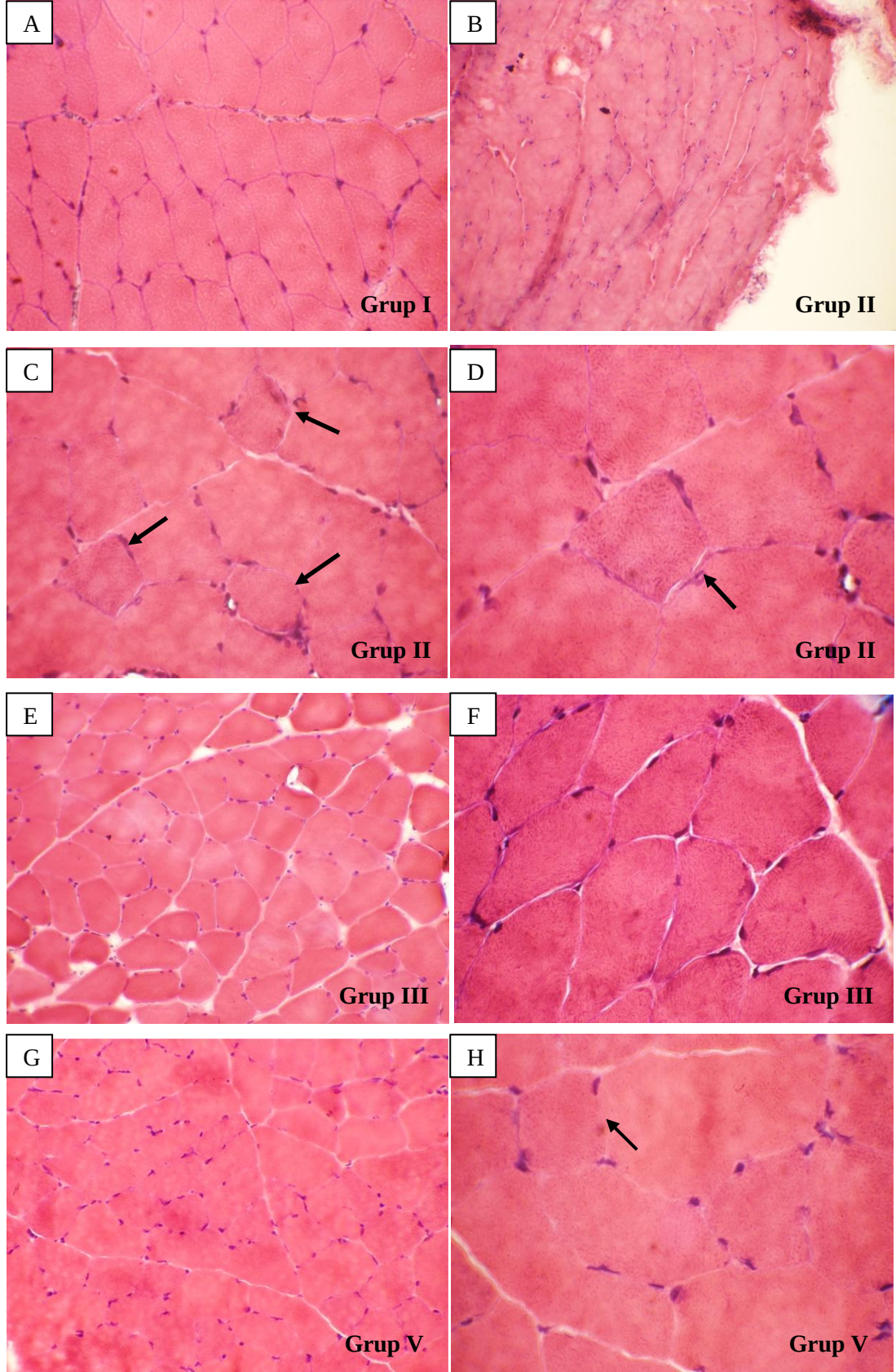
**Tablo8:** Ondördüncü gün kas biyopsisi bulguları

| Grup                                                  | 14.Gün Kas Biyopsisi              |      |       |        |                                     |      |       |        |                        |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|-------|--------|-------------------------------------|------|-------|--------|------------------------|
|                                                       | Atrofik lif gösteren örnek sayısı |      |       |        | Bazofilik lif gösteren örnek sayısı |      |       |        | inflamasyon ve nekroz* |
|                                                       | Hafif                             | Orta | Yoğun | Toplam | Hafif                               | Orta | Yoğun | Toplam |                        |
| <b>Grup I (n=2)</b><br>Boş Operasyon                  | -                                 | -    | -     | 0      | -                                   | -    | -     | 0      | 1                      |
| <b>Grup II (n=4)</b><br>(CLP)                         | 3                                 | -    | -     | 3      | 1                                   | -    | -     | 1      | 1                      |
| <b>Grup III (n=5)</b><br>(CLP+Pentoksifilin)          | 3                                 | -    | -     | 3      | -                                   | -    | -     | 0      | 1                      |
| <b>Grup IV (n=4)</b><br>(Boş Operasyon+Pentoksifilin) | 2                                 | -    | -     | 2      | 1                                   | -    | -     | 1      | 1                      |
| <b>Grup V (n=6)</b><br>(CLP+Etanersept)               | 1                                 | -    | -     | 1      | 2                                   | -    | -     | 2      | 1                      |
| <b>Grup VI (n=3)</b><br>(Boş Operasyon+Etanersept)    | 2                                 | -    | -     | 2      | -                                   | -    | -     | 0      | 1                      |

\*Her grupta bir örnekte fokal yoğun inflamasyon ve alandaki liflerde ciddi atrofi ve endomisial bağ doku artışı gözlemlendi. Diğer alanlarda kas yapısının farklı olması nedeni ile bu patolojinin daha önce aynı ekstremitesinden kas biyopsisi alınması sonrası oluşan reaksiyona sekonder olduğu düşünüldü. Kas primer patoloji açısından diğer geniş alandaki bulgular ile değerlendirildi.



**Şekil 20 : Kas hematoksilen ve eozin boyama örnekleri**





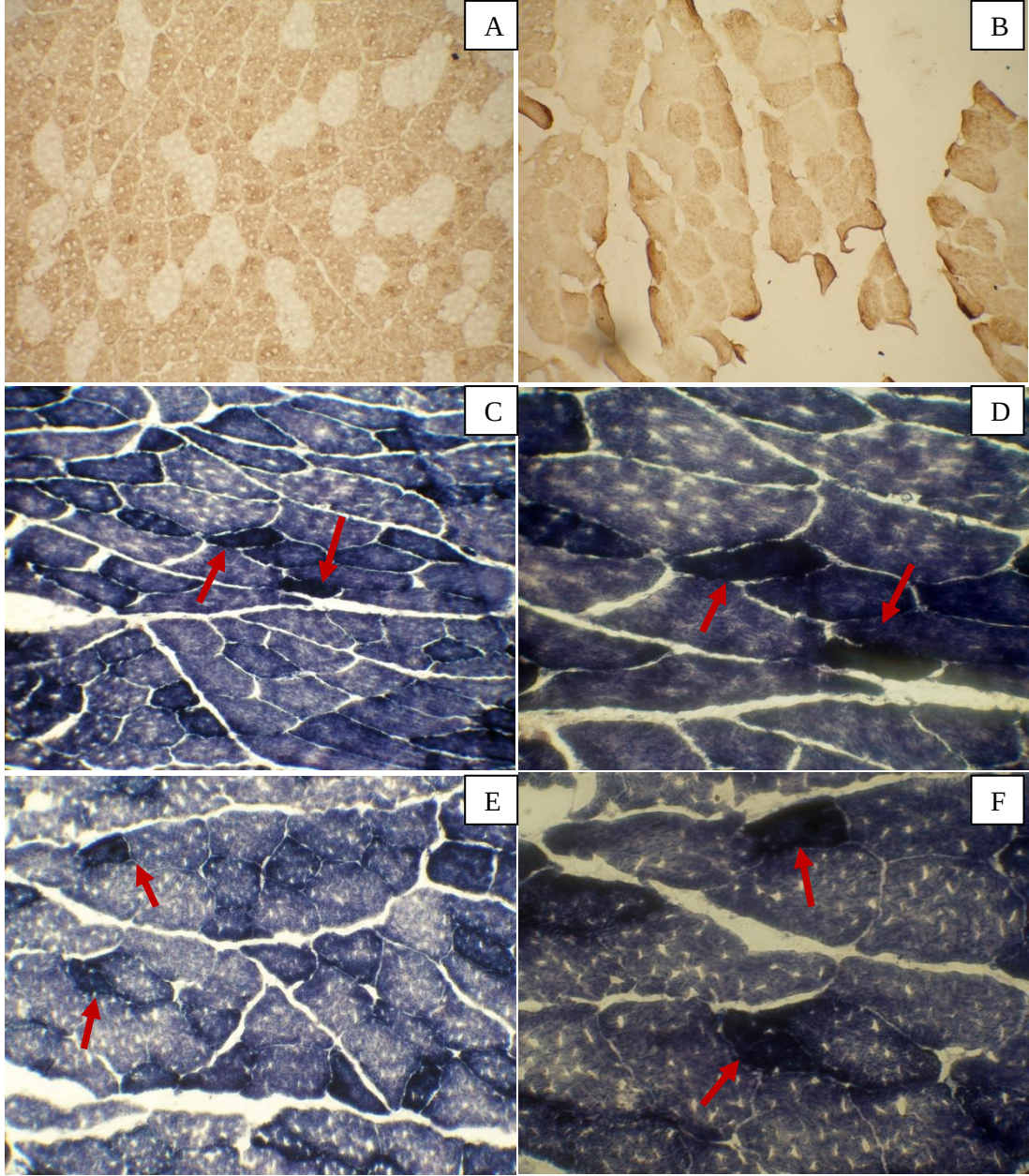
**Şekil 20: A;** Grup I'den normal kas biyopsisi örneği.

**B, C ve D;** Grup II'de birçok lifte kas lifi atrofisi ve bazofili artışı dikkati çekmektedir (oklar).

**E ve F;** Grup III biyopsi örneğinde birkaç atrofik lif ile bir miktar çap farklılığı dikkati çekiyor. Belirgin bir bazofili artışı yok.

**G ve H;** Grup V biyopsi örneğinde bazı liflerde hafif atrofi ve grup II ile karşılaştırıldığında bazofili artışının daha az sayıda lifte olduğu gözlemlendi (ok).

**Şekil 21:** Kas miyozin ağır zincir immünohistokimya ve NADH boyama örnekleri



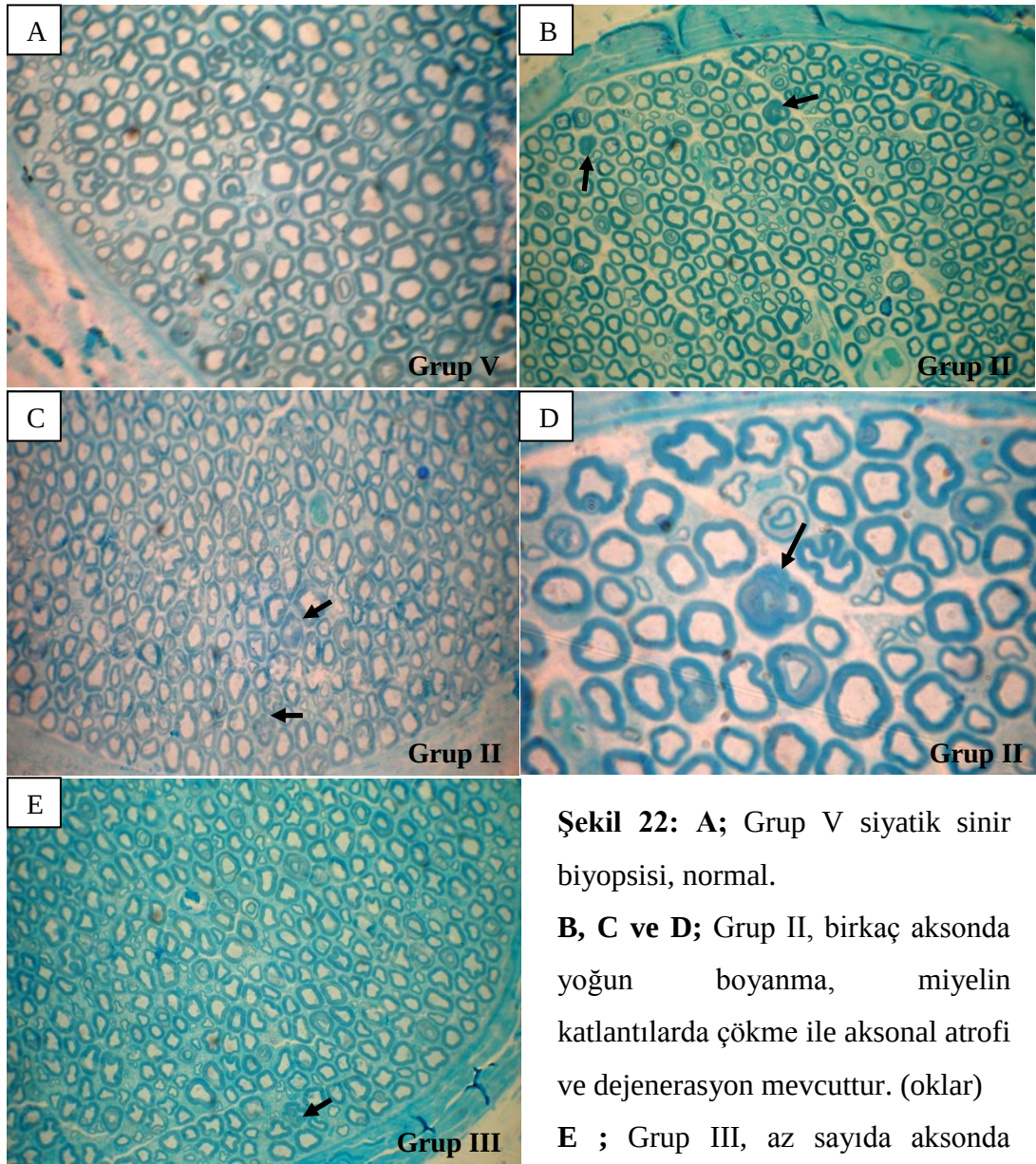
**Şekil 21 : A;** septik olmayan gruptan ve **B;** Grup II'den 6. gün kas miyozin ağır zincir-hızlı form immünohistokimya boyama örneklerinde septik olmayan grupta lif tipleri ayrılırken, septik grupta lif tipi ayrım paterinin bozulduğu görülmektedir.

**C, D, E, F;** Grup II'den 6. günde alınan kas biyopsisi örneğinde NADH boyamasında, kas liflerinde çap farklılıkları ve atrofik liflerin daha koyu boyanan tip 1 lifler ile uyumlu olduğu gözlemlendi (oklar).



Ayrıca grup II, III ve V'ten 2'şer adet sıçandan sağ siyatik sinirden elde edilen örnekler incelenmiştir. Grup II örneklerinde bazı aksonlarda atrofi ve dejenerasyon gözlemlendi. Grup III örneklerinde bu patoloji grup II'ye göre belirgin az olarak birkaç aksonda gözlemlendi. Grup V'te sinir biyopsisi örnekleri normal olarak değerlendirildi. İncelenen örneklerin tümünde miyelin yapısı normaldi.

**Şekil 22:** Sinir biyopsisi örnekleri



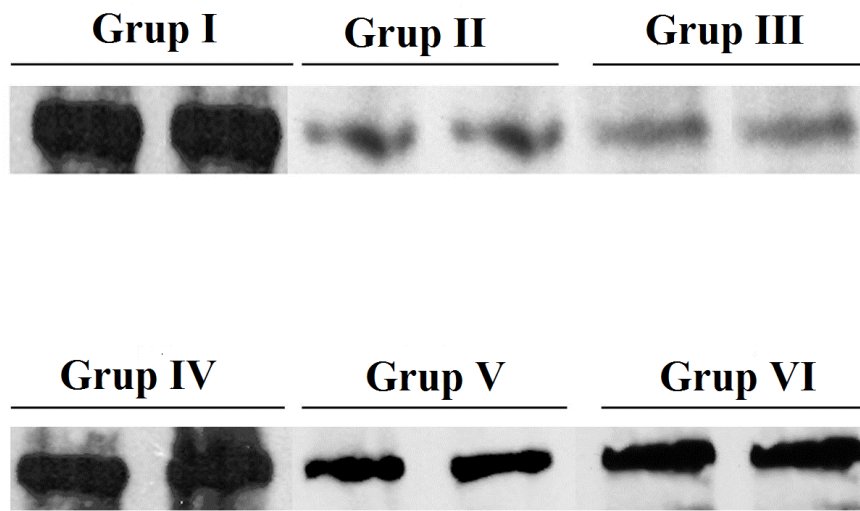
**Şekil 22:** A; Grup V siyatik sinir biyopsisi, normal.

**B, C ve D;** Grup II, birkaç aksonda yoğun boyanma, miyelin katlantılarda çökme ile aksonal atrofi ve dejenerasyon mevcuttur. (oklar)

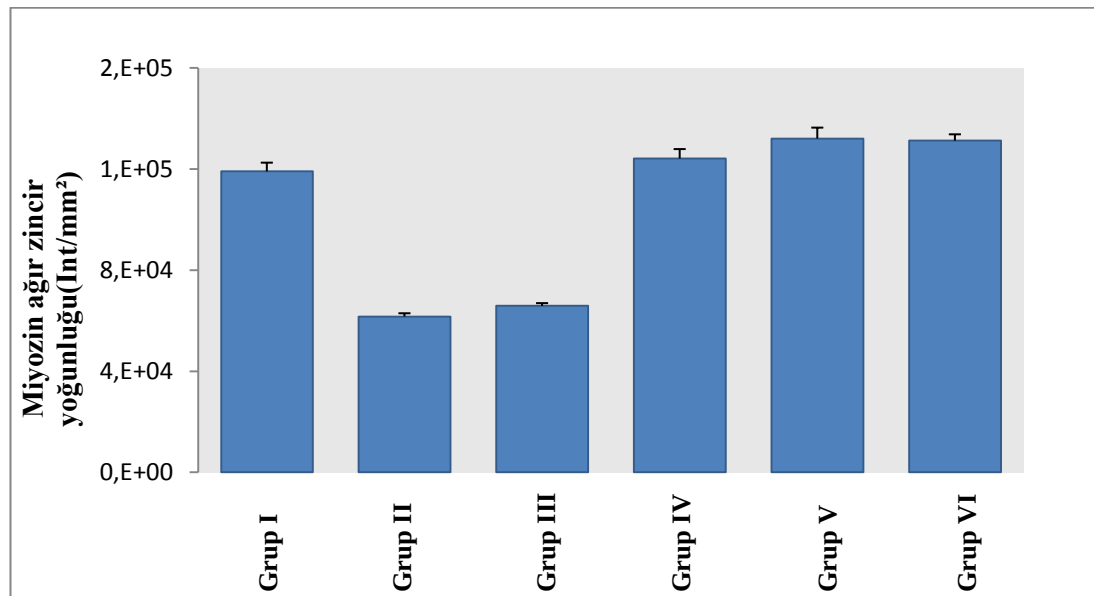
**E ;** Grup III, az sayıda aksonda atrofi izlenmiştir. (ok)

Kas proteinlerinden miyozin ağır zincir-hızlı formu grup II ve grup III'te diğer gruplara göre belirgin olarak düşük saptandı (Şekil 23-1, 23-2). Kas TNF- $\alpha$  düzeyleri ile miyozin ağır zincir-hızlı form düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında kasta TNF- $\alpha$  düzeylerinin yüksekliği ile miyozin ağır zincir-hızlı form miktarının düşüklüğü arasında anlamlı bir ilişki olduğu gözlemlendi. ( $p < 0.05$ ) (Tablo 9, Şekil 23-3)

**Şekil 23-1:** Kas miyozin ağır zincir-hızlı formun Western-Blot yöntemi ile tesbiti



**Şekil 23-2:** Kas miyozin ağır zincir-hızlı form yoğunluğunun gruplara göre dağılımı

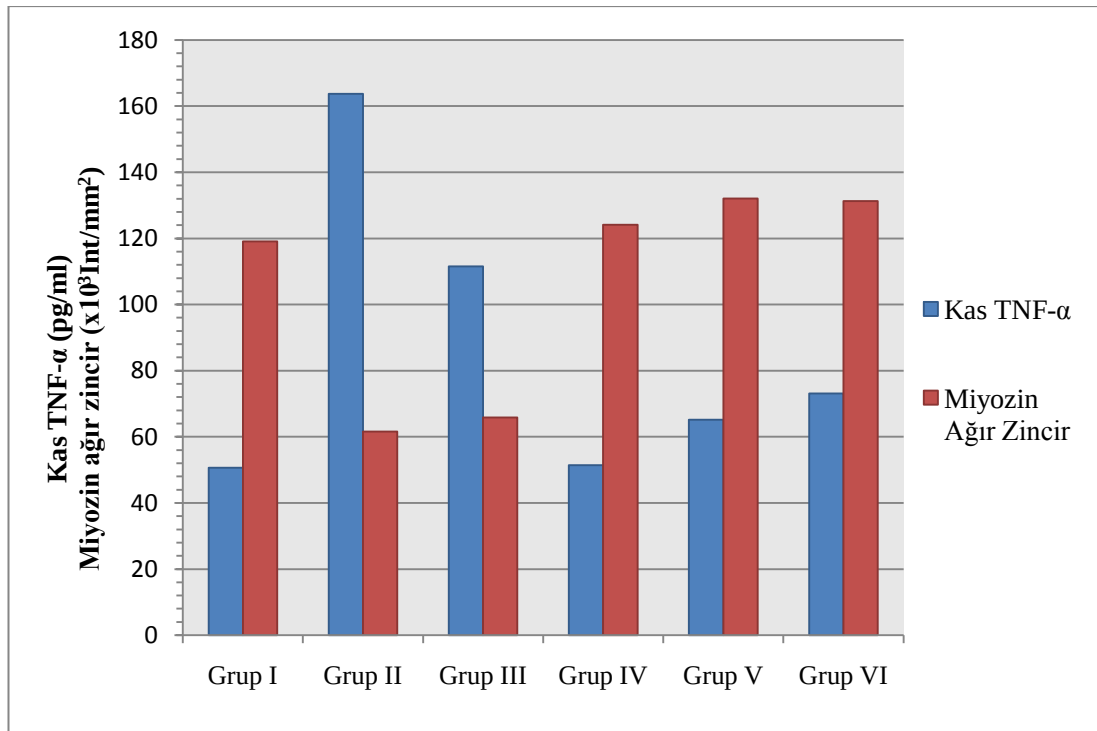


**Tablo 9:** TNF- $\alpha$  ve miyozin ağır zincir hızlı-form düzeyleri

| Grup                                            | Plazma TNF- $\alpha$ düzeyi pg/ml | Kas TNF- $\alpha$ düzeyi* pg/ml | Kas MHC Yoğunluğu* Int/mm <sup>2</sup> |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Grup I</b><br>(Boş Operasyon)                | 67,98                             | 50,69                           | 119073                                 |
| <b>Grup II</b><br>(CLP )                        | 71,57                             | 163,74                          | 61617                                  |
| <b>Grup III</b><br>CLP+Pentoksifilin            | 63,83                             | 111,53                          | 65849                                  |
| <b>Grup IV</b><br>(Boş Operasyon+Pentoksifilin) | 58,23                             | 51,46                           | 124165                                 |
| <b>Grup V</b><br>(CLP+Etanersept)               | 59,57                             | 65,16                           | 132075                                 |
| <b>Grup VI</b><br>(Boş Operasyon +Etanersept)   | 64,66                             | 73,13                           | 131251                                 |

MHC: Miyozin ağır zincir

\*Kasta TNF- $\alpha$  düzeylerinin yüksekliği ile miyozin ağır zincir-hızlı form miktarının düşüklüğü arasında anlamlı bir ilişki mevcut ( $p<0.05$ ).

**Şekil 23-3:** Kas TNF- $\alpha$  ve miyozin ağır zincir düzeyleri

| Grup                            | Mortalite<br>Yüzdesi | TNF- $\alpha$ Düzeyi |              | Kas<br>MHC<br>Miktarı<br>Int/mm <sup>2</sup> | Tibial Sinir<br>ENMG |                     | 6. Gün Kas Biyopsisi                 |      |                             |                                        |      |                             |   |   |   |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|--------------|----------------------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|------|-----------------------------|----------------------------------------|------|-----------------------------|---|---|---|
|                                 |                      | Plazma<br>pg/ml      | Kas<br>pg/ml |                                              | BKAP<br>Amp.<br>mV   | BKAP<br>Süre<br>msn | Atrofik lif gösteren<br>örnek sayısı |      |                             | Bazofilik lif gösteren<br>örnek sayısı |      |                             |   |   |   |
|                                 |                      |                      |              |                                              |                      |                     | Haft                                 | Orta | Y <sub>oğun</sub><br>Toplam | Haft                                   | Orta | Y <sub>oğun</sub><br>Toplam |   |   |   |
| Boş Operasyon                   | %0                   | 67,98                | 50,69        | 119073                                       | 0,5                  | 1,42                | 1                                    | -    | -                           | 1                                      | 1    | -                           | - | 1 | 1 |
| CLP                             | %45,5                | 71,57                | 163,74       | 61617                                        | 0,25                 | 1,40                | 4                                    | 2    | -                           | 6                                      | 1    | 2                           | 2 | 5 | 5 |
| CLP+Pentoksifilin               | %25                  | 63,83                | 111,53       | 65849                                        | 0,72                 | 1,27                | 3                                    | -    | -                           | 3                                      | 1    | -                           | - | 1 | 1 |
| Boş Operasyon<br>+Pentoksifilin | %0                   | 58,23                | 51,46        | 124165                                       | 1,82                 | 1,22                | 1                                    | -    | -                           | 1                                      | 1    | -                           | - | 1 | 1 |
| CLP+Etanersept                  | %25                  | 59,57                | 65,16        | 132075                                       | 0,67                 | 1,67                | 3                                    | -    | -                           | 3                                      | 2    | -                           | - | 2 | 2 |
| Boş Operasyon<br>+Etanersept    | %0                   | 64,66                | 73,13        | 131251                                       | 0,9                  | 1,18                | 2                                    | -    | -                           | 2                                      | 1    | -                           | - | 1 | 1 |

Tablo 10: Çalışma bulgularının toplu tablosu

## V. TARTIŞMA

TNF- $\alpha$  artışının sepsis sürecinde ortaya çıkan kritik hastalık miyopatisi oluşumundaki kritik rolünün tesbiti amacı ile TNF- $\alpha$ 'nın tetiklenmesi için çekal ligasyon ve ponksiyon yöntemi kullanılmıştır. Hem çekal ligasyon ve ponksiyon hem de lipopolisakkarid enjeksiyonu ile oluşturulan intraabdominal enfeksiyon modelleri sepsis için uzun yıllardır kullanılan ve TNF- $\alpha$ 'yı etkili şekilde yükselttikleri bilinen yöntemlerdir (160,161). Bunun yanında çekal ligasyon ve ponksiyonun insandaki sepsis modeline en yakın model olduğu belirtilmektedir. Ayrıca modifikasyonları ile sepsisin uzun süreli etkilerini incelemek için kronik septik model oluşturmak mümkündür (158-161). Biz de çalışmamızda ilioçekal arteri koruyarak nekrozun daha sınırlı olmasını sağlayarak, yaşam süresini uzatıp, kronik septik modelde kas bulgularını inceledik.

CLP uygulanan grupta kilo kaybının 14. güne kadar devam ettiği, aktivitede azalma, piloereksiyon subkonjonktival hemoraji gibi septik bulguların ortaya çıktığı, plazma ve kas TNF- $\alpha$  düzeylerinde sepsis ile uyumlu olacak şekilde yükselme olduğu, kritik hastalık miyopatisinin karakteristik özelliklerinden kas seçici miyozin ağır zincir kaybının belirgin olduğu saptandı. Bu bulgular ile kritik hastalık miyopatisi üzerinde çalışmak için kullandığımız modifiye CLP modelinin uygun olduğu düşünüldü.

CLP uygulanan grupta mortalite grubun %45,5'inde gözlenmiştir. Bu daha önce bu model için belirtilen oranlar ile uyumludur (158). Tedavi prosedürü olarak pentoksifilin veya etanersept verilen gruplarda mortalitede artış olmadığı, grupların her birinde mortalite oranının %25 olduğu gözlemlendi. TNF- $\alpha$  antagonisti ajanların kullanımları ile ilgili herhangi bir enfeksiyon veya sepsis tablosu olması FDA tarafından kesin kontrendikasyon durumu olarak belirtilmektedir (143). Bu haklı bir uyarıdır, çünkü TNF- $\alpha$  enfeksiyon sırasında diğer inflamatuvar sitokinlerden inhibitör olanlarının da sentezlenmesini tetiklemektedir. Bilinmektedir ki enfeksiyonların kontrolünde bir miktar immünstimülasyon gerekliliği vardır. Ancak sitokin fırtınası da mortalite ve sepsisin ağırlığının en önemli nedenidir (2). Daha önceki çalışmalarda rekombinant veya çözünür TNF- $\alpha$  blokörleri ile tedavi edilen CLP veya LPS uygulanmış sıçanlarda anoreksiye ve TNF- $\alpha$ 'nın kilo kaybettirici

etkilerine direnç geliştiği, mortalite, hipotansiyon ve hipotermiye karşı bu ajanların koruyucu olduğu gösterilmiştir (144,147,148). Bu bilgiden yola çıkarak TNF- $\alpha$  blokajı için bir TNF- $\alpha$  antagonisti olan etanersept ve TNF- $\alpha$  sentezini azaltıcı fosfodiesteraz inhibitörü pentoksifilin kullanılmıştır. Sonuçta etanersept ile CLP yapılmış sıçanlarda tetiklenen kas TNF- $\alpha$  düzeylerinde belirgin azalma sağlanmıştır ancak bu azalma ile ılımlı seviyelere ulaşılmış enfeksiyonun sınırlanması da engellenmemiştir. Sepsis sırasında TNF- $\alpha$  yüksekliğinin ılımlı seviyelere çekilmesi ile mortalite azaltılabilmektedir (161). Pentoksifilin verilen grupta ise TNF- $\alpha$  düzeylerinde 2. saatte belirgin bir inhibisyon gözlenmediği halde bu grupta da mortalitede azalma saptanmıştır. Bu durumun pentoksifilin TNF- $\alpha$ 'yı azaltıcı etkilerinin daha geç bir fonksiyonu oluşu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Düzeyinin tesbiti için TNF- $\alpha$  hem plazma hem de kastan operasyon sonrası, daha önceki bilgiler ışığında tepe düzeye ulaştığı bilinen 2. saatte elde edilmiştir (77). TNF- $\alpha$  tüm gruplarda plazma ve kasta daha önce başka çalışmalarda belirtilen normal değerlere göre tetiklenmiştir (161). En yüksek olarak da CLP grubunda saptanmakla beraber gruplar arasında plazma TNF- $\alpha$  düzeyleri anlamlı farklılık göstermemiştir. Tüm gruplarda çekuma müdahale edilsin veya edilmesin periton açılmıştır. Bunun tüm gruplarda plazmada TNF- $\alpha$  seviyelerinde artışa neden olduğu düşünülmektedir. En dikkat çekici nokta ise CLP yapılması ile TNF- $\alpha$ 'nın kasta sentezinin plazmadaki oranlardan bağımsız olarak tetiklenmesi olmuştur. Daha önce Torre-Amione, serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin, lokal konsantrasyonu ve hücrelerin interstisyumundaki düzeyi ile ilgili net bilgi vermeyebileceğini belirtmiştir (104). Kas, serumdaki artmış düzeyden bağımsız olarak kendi de bir miyokin görevi görerek TNF- $\alpha$  üretebilmektedir (88-92).

Modifiye yöntemler ile kronik septik model elde edilen CLP sırasında süregelen bir enfeksiyon ve kronik TNF- $\alpha$  yüksekliği elde edilir (162,163). Bu nedenle TNF- $\alpha$ 'nın etkin şekilde inhibisyonunun sağlandığını bilmek için yarılanma ömrü kısa olan pentoksifilin operasyondan 1 saat önce ve 6 gün boyunca her gün, etanersept ise yarılanma ömrünün 72 saat olması nedeni ile haftada 2 kere uygulamıştır. Etanersept, CLP yapılmış gruplarda 2. saatteki kas TNF- $\alpha$  sentezindeki ciddi yükselmeyi etkili şekilde bloke etmiştir. Pentoksifilin TNF- $\alpha$ 'nın 2.



saat kas düzeylerinde belirgin inhibisyon yapmamıştır. Ancak patolojik bulgular incelendiğinde tedavi verilen her iki grupta da septik sıçanlarda saptanan nöromusküler patolojinin daha az sayıda sıçanda ve çok daha hafif şiddette olduğu gözlenmiştir. Biliniyor ki bir fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin hücre içi cAMP birikimini arttırmak sureti ile TNF- $\alpha$  geninin ekspresyonunu azaltarak biyoaktif TNF- $\alpha$  üretimini engellemektedir. Bu gen ekspresyonu üzerine etkiler daha geç dönemde ortaya çıkabileceğinden kas TNF- $\alpha$  seviyelerinde pentoksifilin ile tedavi verilmiş CLP grubunda 2. saat gibi erken dönemde inhibisyon olmaması beklenir bir sonuçtur (129,130,135). Etanersept ise direkt olarak dolaşan aktif TNF- $\alpha$ 'ya bağlanarak hızlı şekilde etkisini göstermektedir (143).

Her bir gruptan 6'şar örnekten 6. günde alınan kas biyopsilerinin incelenmesi ile saptanan en önemli patolojik özellik atrofik lifler ve bu liflerde daha fazla bazofilik boyanma paterni olmuştur. Atrofik ve daha bazofilik boyanma paterni gösteren lifler nöropatide gözlenen anguler paternde değildi ayrıca santral ve büyük çekirdekler içermemekteydi. Bu özellikleri ile primer bir miyopatiyi temsil ettikleri, atrofi ve bazofilik boyanmanın miyozin filaman kaybı ve miyofibriler disorganizasyonu yansıttığı düşünüldü. Bu bulgu en yoğun olarak sadece CLP ile sepsisin tetiklendiği grupta izlenmiştir. Atrofik lifler gruptaki tüm örneklerde, bazofilik boyanan lifler de altı örneğin beşinde gözlenmiştir. Atrofik liflerin tiplendirmesi için yapılan NADH boyası ile atrofinin tip 1 liflerde olduğunu göstermiştir. Biyopsilerde kas inflamasyonu ve nekrozu izlenmemiştir. CLP ile oluşturulan septik model kritik hastalık myopatisi için tanımlanan kas biyopsi özelliklerini taklit etmiştir. Daha önce Showalter ve Engel tarafından kritik hastalık miyopatisinde kas biyopsilerinde sıklıkla sadece tip 2 atrofisi, daha az olarak her iki lif tipinde de atrofi ve daha nadir olarak da sadece tip 1 liflerde atrofi izlenebileceği belirtilmiştir (39). Tip 2 lifler daha hızlı kasılan lifler olduklarından ineksitabileden daha çok etkilenebilecekleri açıklaması mantıklıdır. Ancak niye sadece tip 1 atrofisi de izlenebileceği ile ilgili yorum yapılmamıştır.

CLP uygulanan grup ile tedavi verilen her iki gruptan 2'şer siyatik sinir biyopsisi nöropatik bulgular açısından incelenmiştir. CLP grubundan elde edilen her iki örnekte de birkaç atrofik akson gözlenmiştir. Tedavi verilen gruplardan

pentoksifilin verilen gruptaki örneklerde bu aksonal hasar CLP grubuna göre çok daha az olarak izlenmiş, etanersept verilen grubun sinir biyopsileri normal olarak değerlendirilmiştir. Daha önce de kritik hastalık miyopatisi ve kritik hastalık nöropatisinin farklı patofizyolojiye sahip iki ayrı hastalık mı yoksa aynı patolojik mekanizmanın farklı manifestasyonları mı olduğu hep tartışma konusu olmuştur (7). Nöropatik tutuluşu düşündürücek kas biyopsisi bulguları olmayışı, kas patolojisinin ana özelliğinin primer miyopatik süreç oluşu, en erken elektrofizyolojik bulguların nöropatiden çok miyopatik etkilenme ile uyumlu düşünülmesi ve aksonal harabiyetin şiddetinin ana patolojiyi açıklamaktan uzak oluşu nedeni ile bu aksonal atrofinin sepsisteki ana nöromusküler tutulum olan miyopatinin eşlikçisi olduğu düşünülebilir. Kritik hastalık ilişkili nöromusküler tutulumda motor sendrom daha önemli bir disabilite nedenidir. Duyusal tutulum mevcut ise de genellikle motor sendroma eşlik etmesi şeklindedir (7). Elektrofizyolojik bulgularımız da bunu destekler niteliktedir. Bu nedenle çalışmamız miyopati üzerinde yoğunlaşmıştır.

Daha önceki bilgiler ışığında septik süreçte elektrofizyolojik bulguların 24. saat gibi erken dönemde oluştuğu ve 48. saatte belirginleştiği belirtildiğinden ENMG incelemesi 48. saatte uygulanmıştır (64). Daha önceki çalışmalarda BKAP’de süre artışı ve amplitüd düşüklüğü kas uyarılabilirliğinde azalmanın önemli bir bulgusu ve kritik hastalık miyopatisinin EMG’sinin önemli bir özelliği olarak belirtilmiştir (60,65). Bizim çalışmamızda ENMG incelemesinde saptanan en belirgin özellik septik grupta BKAP’de amplitüd düşüklüğüdür. BKAP’i amplitüdü düşüklüğü ön boynuz motor nöron harabiyeti, motor aksonal nöropati, nöromusküler kavşak patolojisi ve miyopati durumlarında izlenebilmektedir. Tüm sıçanlarda 3 Hz ardsıra uyarım ile nöromusküler kavşak patolojisini düşündürür dekremental yanıt izlenmemiştir. Ardsıra sinir uyarımı bulguları sepsis ilişkili nöromusküler patolojinin kas sinir kavşağına etki etmediği yönündeki bilgileri de desteklemektedir (60). Ön boynuz motor nöron harabiyeti veya aksonal nöropati ile ilgili eşlik edebilecek bir denervasyon bulgusu kas biyopsisi incelemelerinde saptanmamıştır. Kritik hastalık sürecinde nöromusküler tutulumda ana olarak kritik hastalık polinöropatisi hakim ise bilinmektedir ki bu durum yaygın bir patolojidir ve duyu sinirleri de etkilenmektedir. CLP grubunda çalışılan tüm duyu sinir iletim

çalışmalarının normal saptanması bizi yaygın bir aksonal nöropatik tutuluştan uzaklaştırmaktadır. Her nekadardır 6.gün elde edilen sinir biyopsilerinde CLP uygulanmış grupta birkaç aksonda atrofi saptansa da 2. gün elektrofizyolojik incelemeler ile bu durumu korele etmek çok mümkün değildir ayrıca bu patoloji kliniği açıklayacak şiddetten uzaktır. ENMG'ye erken dönemde yansıyan BKAP amplitüdünde düşmenin aksonal nöropatiden çok sepsisin sinir uyarılabilirliğini etkilemesi ile oluşabileceği de ek olarak düşünülebilir. Biliniyor ki sepsis sırasında çok muhtemel TNF- $\alpha$  etkisi ile birçok dokuda membran uyarılabilirliği etkilenmektedir. Bunun klinikte birçok sonucu gözlenmektedir. Sepsiste EKG'de QRS amplitüdünde düşme izlenmektedir, septik ensefalopatinin santral nöronal eksitabilite azalması ile ilişkili olduğu savunulmaktadır (69,164). Ancak sepsis difüz bir patolojidir sinir uyarılabilirliğinde azalmaya yol açacak patolojinin duyu sinirlerini de etkilemesi beklenir. Bu nedenle BKAP amplitüdü düşüklüğünün aksonal nöropati veya sinir uyarılabilirliğinde azalmadan çok kas uyarılabilirliğinde azalmayı yansıtıyor olabileceği sonucuna varılmıştır. Bizim incelemelerimizde septik grupta diğer gruplardan farklı bir BKAP'i süre uzaması saptanmamıştır.

Sepsis kasta sadece eksitabilite azalmasına değil lif özgül atrofiye de neden olmaktadır. Bu kritik hastalık miyopatisi için önemli bir özelliktir (72). Nekroz ile giden bir süreç çoğu zaman oluşmamaktadır. Bu nedenle kas spesifik enzimlerden kreatin kinaz genelde normal sınırlarda saptanır. Tüm bunlar kritik hastalık miyopatisi için önemli tanısal özelliklerdir (4). TNF- $\alpha$  ilişkili patofizyolojik mekanizmalar ile de örtüşmektedir. Ayrıca bu lif özgül atrofinin içinde miyozinin seçici kaybı spesifik kabul edilmektedir (13,39,60). Niye seçici kayıp olduğu henüz bilinmemektedir. Bu da aydınlatılmayı bekleyen önemli ve ilgi uyandırıcı bir konudur.

TNF- $\alpha$ 'nın zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak toplam kas proteinlerinde ve hızlı tip miyozin ağır zincirinde azalmaya neden olduğu daha önce saptanmıştır (116-118). Oluşturduğumuz septik modelde TNF- $\alpha$ 'nın indüksiyonu kasta etkin şekilde sağlanmış ve yine bu grupta kasın en önemli proteinlerinden miyozinde belirgin yıkım gözlenmiştir. Erken dönemde sepsis ile anoreksi gelişmektedir ancak anoreksi sonucu olmaktan öte bir kas yıkımı da tetiklenmiştir. Kas yıkım hızının septik sıçanlarda en üst seviyeye 6 günde ulaştığı, kas gücünde yine bu günde

maksimum azalma izlendiği daha önce çalışılmıştır (120,121). Bu nedenle çalışmamızda biyopsiler 6. günde alınmıştır. Geç sepsis dönemlerinde protein yıkımında, tetikleyicisi ubikülin-proteozom sistemi ve kalpain ile katepsinlerin aktivitesinde düşme ile birlikte bir azalma meydana gelmekte ancak kilo kaybı progresif seyretmektedir. Hiçbir zaman protein sentezi ön plana geçememektedir (163). Bizim çalışmada da septik grupta progresif kilo kaybı 14. güne kadar devam etmiştir. Ancak tedavi gruplarında 6. günden sonra kilo alımı gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu durum proteolitik yolların inhibisyonunun daha belirgin olması ve bunun yanında protein sentezinin artışı gerektirir. Bu bulgular TNF- $\alpha$  inhibisyonunun bu noktada önemli olduğunu ve protein sentezinde de rol alabileceğini düşündürür. Daha önceki çalışmalar da kronik sepsis döneminde TNF- $\alpha$  inhibisyonunun transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunda artış üzerinden protein sentezinde artışı sağladığını belirtmektedir (153).

Kritik hastalık miyopatisinin önemli özelliği miyozin kaybının değerlendirilmesi için miyozin ağır zincirin hızlı kasılan izoformunun miktarı, her bir grubu temsil ettiği düşünülen örneklerden elde edilen kaslarda incelendi. CLP ve CLP yapıp pentoksifilin verilen grupta kas miyozin ağır zincir-hızlı form miktarında kontrol grubuna göre belirgin azalma olduğu gözlemlendi. Miyozin ağır zincir-hızlı form kas yoğunluğunun azlığı, bu iki gruptaki kas TNF- $\alpha$ 'nın yüksek düzeyleri ile de ters olarak anlamlı şekilde ilişkili saptandı. Bu bulgular miyozin ağır zincir yıkımının ana olarak TNF- $\alpha$  tetiklenmesi ile ilişkili olduğunu düşündürebilir. Nitekim etanersept ile etkin TNF- $\alpha$  blokajı yapılan grupta miyozin ağır zincir miktarı kontrol grubundan farklı saptanmamıştır.

Sonuç olarak TNF- $\alpha$  kas üzerine önemli etkileri olan bir sitokindir. Kompleks birçok kaskad üzerinden etkileri ortaya çıkmaktadır. Birçok hastalıkta olduğu gibi kas üzerinde TNF- $\alpha$  ile tetiklenen mekanizmalar ile ilgili bilgiler artsa da bu kompleks kaskad nedeni ile müdahalelerde kısıtlılıklar mevcuttur. Ayrıca bu kaskadın, kasta serumdan bağımsız tetiklenmesi ile ilgili basamakların aydınlatılması, sepsis sırasında TNF- $\alpha$ 'nın ılımlı inhibisyonunu sağlayan ajanlar ve dozları üzerindeki çalışmalar ciddi disabilite yaratan bir durum olan kritik hastalık miyopatisi tedavisinde önemli bir adım olacaktır. Yıllar içinde yoğun bakım desteği

ihtiyacı duyulan hastalıklarda artış ve yoğun bakımlarda yaşatılmanın uzaması sepsis için kaçınılmaz risk faktörleridir. Bu kronik/kritik hastalık durumlarında ilerde ciddi bir disabilite nedeni olabilecek nöromusküler etkilenmeyi önlemek hastalar, yakınları ve sağlık sistemi için önemlidir.

## VI. SONUÇLAR

- 1- Bu çalışmada, anti-TNF- $\alpha$  ajanlardan, 10mg/100gr ip. dozunda verilen pentoksifilin ve 0.4mg/kg sc. dozunda verilen etanersept, CLP uygulanmış sıçanlarda mortaliteyi arttırmamıştır.
- 2- Sepsis sırasında kasta TNF- $\alpha$  sentezi olmaktadır ve anti-TNF- $\alpha$  ajanlardan etanersept bu sentezi belirgin olarak azaltmaktadır.
- 3- Sepsis sırasında motor sinir iletim çalışmalarında 48. saat gibi çok erken dönemde birleşik kas aksiyon potansiyeli amplitüdlerinde düşme izlenmiştir.
- 4- Sepsis sırasında kasta bazofilik boyanma artışı ve atrofi ile giden miyopatik bir tutuluş oluşmuştur. Atrofinin tip 1 liflerde olduğu gözlenmiştir.
- 5- Miyozin ağır zincir-hızlı form yoğunluğu kas TNF- $\alpha$  düzeyindeki yükselme ile ters korele olarak azalmıştır.
- 6- Septik grupta daha belirgin gözlenen bazofilik boyanma artışı ve atrofi ile miyozin ağır zincir-hızlı form yoğunluğundaki azalma, TNF- $\alpha$  blokajı yapılan grupta azalmıştır.

## VII. ÖNERİLER

- 1- Kas spesifik TNF- $\alpha$  sentezinde sinyalizasyon aşamalarındaki farklılıklar üzerine yoğunlaşılabilir.
- 2- Daha spesifik olarak kas spesifik TNF- $\alpha$  artışının blokajı ve bloğun istenilen seviyede sağlanması için anahtar noktalar üzerinde çalışılabilir.
- 3- Mortaliteyi de engellemek adına sepsiste serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin ılımlı seviyelere düşürülmesi için uygun anti-TNF- $\alpha$  ajanlarının geliştirilmesi ve uygun doz çalışmaları planlanabilir.
- 4- Kritik hastalık miyopatisinde miyozinin seçici yıkımı üzerine yoğunlaşılabilir. Bu seçici yıkımın engellenmesi (yine olası antikorlar ile) ile bu klinik durumun tedavi şansı ortaya çıkabilir.

### VIII. KAYNAKLAR

- 1- <http://www.surgeryencyclopedia.com/Fi-La/Intensive-Care-Unit.html>
- 2- Robertson CM, Coopersmith CM. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect.* 2006;8:1382-9.
- 3- MacFarlane I, Rosenthal F. Severe myopathy after status asthmaticus. *Lancet.* 1977;2:615.
- 4- Bolton CF. Neuromuscular manifestations of critical illness. *Muscle Nerve* 2005;32:140–163.
- 5- Bolton CF, Young GB, Zochodne DW. The neurological complications of sepsis. *Ann Neurol.* 1993;33:94–100.
- 6- Uluç K, İşak B, Tanrıdağ T, Us Ö. Kritik hastalık polinöropatisi ve miyopatisi. *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2008;21:193-202.
- 7- Friedrich O. Critical illness myopathy: sepsis-mediated failure of the peripheral nervous system. *Eur J Anaesthesiol Suppl.* 2008;42:73-82.
- 8- Bolton CF. Evidence of neuromuscular dysfunction in the early stages of the systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 2000;26:1179–1180.
- 9- Bercker S, Weber-Carstens S, Deja M, Grimm C, Wolf S, Behse F, Busch T, Falke KJ, Kaisers U.. Critical illness polyneuropathy and myopathy in patients with acute respiratory distress. *Crit Care Med.* 2005;33:711-5.
- 10- de Letter MA, Schmitz PI, Visser LH, Verheul FA, Schellens RL, Op de Coul DA, van der Meché FG.. Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2001;29:2281-6.
- 11- Bednarik J., Vondracek P. Critical illness polyneuromyopathy – a well -known but still controversial entity. *Scriptica Medica.* 2009;82:27-35.
- 12- Pastores SM. Critical illness polyneuropathy and myopathy in acute respiratory distress syndrome: more common than we realize! *Crit Care Med.* 2005;33:895–896.
- 13- Stevens RD, Dowdy DW, Michaels RK, Mendez-Tellez PA, Pronovost PJ, Needham DM. Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness: a systematic review. *Intensive Care Med.* 2007;33:1876-91.



- 14- Coakley J. Preliminary observations on the neuromuscular abnormalities in patients with organ failure and sepsis. *Intensive Care Med.* 1993;19:323-328.
- 15- Helliwell TR, Coakley JH, Wagenmakers AJ, et al. Necrotizing myopathy in critically-ill patients. *J Pathol.* 1991;164:307-314.
- 16- Sander HW, Golden M, Danon MJ. Quadriplegic areflexic ICU illness: selective thick filament loss and normal nerve histology. *Muscle Nerve* 2002;26:499-505.
- 17- Koch S, Spuler S, Deja M, Bierbrauer J, Dimroth A, Behse F, Spies CD, Wernecke KD, Weber-Carstens S. Critical illness myopathy is frequent: accompanying neuropathy protracts ICU discharge. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 Aug 27. [Epub ahead of print]
- 18- Bednarik J, Vondracek P, Dusek L, Moravcova E, Cundrle I. *J Neurol.* Risk factors for critical illness polyneuromyopathy. *J Neurol.* 2005;252:343-51.
- 19- Khan J, Harrison TB, Rich MM. Mechanisms of neuromuscular dysfunction in critical illness. *Crit Care Clin.* 2008;24:165-77.
- 20- Johnson KL. Neuromuscular complications in the intensive care unit: critical illness polyneuromyopathy. *AACN Adv Crit Care.* 2007;18:167-80.
- 21- Latronico N, Peli E, Botteri M. Critical illness myopathy and neuropathy. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:126–132.
- 22- Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000;80:853–924.
- 23- Rossignol B, Gueret G, Pennec JP, Morel J, Rannou F, Giroux-Metges MA, Talarmin H, Gioux M, Arvieux CC. Effects of chronic sepsis on contractile properties of fast twitch muscle in an experimental model of critical illness neuromyopathy in the rat. *Crit Care Med.* 2008;36:1855-63.
- 24- Friedrich O. Critical illness myopathy: what is happening? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9:403-9.
- 25- Minnaard R, Drost MR, Wagenmakers AJ, van Kranenburg GP, Kuipers H, Hesselink MK. Skeletal muscle wasting and contractile performance in septic rats. *Muscle Nerve.* 2005;3:339-48.

- 26- Gibson WH, Cook JJ, Gatipon G, Moses ME. Effect of endotoxin shock on skeletal muscle cell membrane potential. *Surgery* 1977;81:571–577.
- 27- Rich MM, Teener JW, Raps EC, et al. Muscle is electrically inexcitable in acute quadriplegic myopathy. *Neurology*. 1996;46:731–736.
- 28- Rich MM, Pinter MJ. Sodium channel inactivation in an animal model of acute quadriplegic myopathy. *Ann Neurol*. 2001;50:26–33.
- 29- Rich MM, Pinter MJ, Kraner SD, Barchi RL. Loss of electrical excitability in an animal model of acute quadriplegic myopathy. *Ann Neurol* 1998;43:171–179.
- 30- Rich MM, Pinter MJ. Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre inexcitability in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol*. 2003;547:555-66.
- 31- Rich MM, Pinter MJ. Sodium channel inactivation in an animal model of acute quadriplegic myopathy. *Ann Neurol* 2001;50:26–33.
- 32- Novak KR, Nardelli P, Cope TC, Filatov G, Glass JD, Khan J, Rich MM. Inactivation of sodium channels underlies reversible neuropathy during critical illness in rats. *J Clin Invest*. 2009;119:1150-8.
- 33- Bird SJ, Rich MM. Critical illness myopathy and polyneuropathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2002;2:527-33.
- 34- Filatov GN, Rich MM. Hyperpolarized shifts in the voltage dependence of fast inactivation of Nav1.4 and Nav1.5 in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol*. 2004;559:813-20.
- 35- Trunkey DD, Illner H, Wagner IY, Shires GT. The effect of septic shock on skeletal muscle action potentials in the primate. *Surgery* 1979;85:638–643.
- 36- Tracey KJ, Lowry SF, Beutler B, Cerami A, Albert JD, Shires GT. Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes of skeletal muscle plasma membrane potential. *J Exp Med* 1986;164:1368–1373.
- 37- Friedrich O, Hund E, Weber C, Hacke W, Fink RHA. Critical illness myopathy serum fractions affect membrane excitability and intracellular calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Neurol* 2004;251:53–65.

- 38- Teener JW, Rich MM. Dysregulation of sodium channel gating in critical illness myopathy. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006;27:291-6.
- 39- Showalter CJ, Engel AG. Acute quadriplegic myopathy: analysis of myosin isoforms and evidence for calpain mediated proteolysis. *Muscle Nerve.* 1997;20:316–322.
- 40- Di Giovanni S, Mirabella M, D’Amico A, et al. Apoptotic features accompany acute quadriplegic myopathy. *Neurology.* 2000;55:854–858.
- 41- Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, Hasselgren PO. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB J* 1999;13:1435–1443.
- 42- Garcia-Martinez C, Agell N, Llovera M, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM: Tumour necrosis factor- $\alpha$  increases the ubiquitination of rat skeletal muscle proteins. *FEBS Lett.* 1993;323:211-214.
- 43- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM: TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;230:238-241.
- 44- Li Y-P, Reid MB: TNF- $\alpha$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate ubiquitin conjugation of proteins in skeletal muscle myotubes. *FASEB J.* 2001;15:1080.
- 45- Mourkioti F, Rosenthal N. NF-kappaB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *J Mol Med.* 2008;86:747-59
- 46- Solomon V, Goldberg AL. Importance of the ATPubiquitin- proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem.* 1996;271:26690–7.
- 47- Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med.* 1996;335:1897-905.
- 48- Buck M, Chojkier M: Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J.* 1996;15:1753-1765.
- 49- Li Y-P, Atkins CM, Sweatt JD, Reid MB: Mitochondria mediate tumor necrosis factor- /NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle myotubes. *Antioxid Redox Signal.* 1999;1:97-104.

- 50- Combaret L, Taillandier D, Dardevet D et al. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19S regulatory complex of the 26S proteasome in fast-twitch skeletal muscle. *Biochem J.* 2004;378:239–246.
- 51- Lee MC, Wee GR, Kim JH. Apoptosis of skeletal muscle on steroid- induced myopathy in rats. *J Nutr.* 2005;135:1806–1808.
- 52- Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:491-497.
- 53- Callahan LA, Nethery D, Stofan D, DiMarco A, Supinski G. Free radical-induced contractile protein dysfunction in endotoxin-induced sepsis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:210-217.
- 54- Friedrich O. Critical illness myopathy: what is happening? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:403–409.
- 55- Goodman BP, Harper CM, Boon AJ. Prolonged compound muscle action potential duration in critical illness myopathy. *Muscle Nerve* 2009;40:1040-1042.
- 56- Allen DC, Arunachalam R, Mills KR. Critical illness myopathy: further evidence from muscle-fiber excitability studies of an acquired channelopathy. *Muscle Nerve* 2008;37:14-22.
- 57- Bednarik J, Lukas Z, Vondracek P. Critical illness polyneuromyopathy: the electrophysiological components of a complex entity. *Intensive Care Med.* 2003;29:1505-1514.
- 58- Lefaucheur JP, Nordine T, Rodriguez P, Brochard L. Origin of ICU acquired paresis determined by direct muscle stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:500-506.
- 59- Rich MM, Bird SJ, Raps EC, McCluskey LF, Teener JW. Direct muscle stimulation in acute quadriplegic myopathy. *Muscle Nerve* 1997;20:665-673.
- 60- Lacomis D, Giuliani MJ, Van Cott A, Kramer DJ. Acute myopathy of intensive care: clinical, electromyographic, and pathological aspects. *Ann Neurol.* 1996;40:645-654.

- 61- Khan J, Harrison TB, Rich MM, Moss M. Early development of critical illness myopathy and neuropathy in patients with severe sepsis. *Neurology* 2006;67: 1421–1425.
- 62- Tepper M, Rakic S, Haas JA, Woittiez AJ. Incidence and onset of critical illness polyneuropathy in patients with septic shock. *Neth J Med.* 2000;56:211–214.
- 63- Tennila A, Salmi T, Pettila V, Roine RO, Varpula T, Takkunen O. Early signs of critical illness polyneuropathy in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Intensive Care Med.* 2000;26:1360–1363.
- 64- Cankayali I, Dogan YH, Solak I, Demirag K, Eris O, Demirgoren S, Moral AR. Neuromuscular deterioration in the early stage of sepsis in rats. *Crit Care.* 2007;11:R1.
- 65- Bolton CF. Evidence of neuromuscular dysfunction in the early stages of the systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 2000;26:117911-80.
- 66- Milner-Brown HS, Miller RG. Muscle membrane excitation and impulse propagation velocity are reduced during muscle fatigue. *Muscle Nerve* 1986;9:367-374.
- 67- Latronico N, Fenzi F, Recupero D, Guarneri B, Tomelleri G, Tonin P, De Maria G, Antonini L, Rizzuto N, Candiani A. Critical illness myopathy and neuropathy. *Lancet* 1996;347:1579-1582.
- 68- Zochodne DW, Bolton CF, Lavery DA, Thompson RT,. Driedger AA. The effects of sepsis muscle function; an electrophysiologic and P-31 NMR study. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1987;66:115-1165.
- 69- Rich MM, McGarvey ML, Teener JW, Frame LH. ECG changes during septic shock. *Cardiologia.* 2002;97:187–196.
- 70- Howard R.S., Tan S.V., W J Z'Graggen W. J. Weakness on the intensive care unit. *Pract Neurol* 2008;8:280-295
- 71- Hund E. Neurological complications of sepsis:critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Neurol.* 2001;248:929-934.

- 72- Lacomis D, Zochodne DW, Shawn JB. Critical illness myopathy. *Muscle Nerve* 2000;23:1785–1788.
- 73- Hermans G, De Jonghe B, Bruyninckx F, Van den Berghe G. Interventions for preventing critical illness polyneuropathy and critical illness myopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;21:CD006832.
- 74- van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med*. 2001;345:1359-1367.
- 75- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*. 2003;9:517–524.
- 76- Caruso P, Denari SD, Ruiz SA, Bernal KG, Manfrin GM, Friedrich C, Deheinzelin D. Inspiratory muscle training is ineffective in mechanically ventilated critically ill patients. *Clinics* . 2005;60:479-84.
- 77- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420:885-891.
- 78- Reid MB, Li YP. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2001;171:225-232.
- 79- Ralston DR, St John RC. Immunotherapy for sepsis. *Clin Chest Med*. 1996;17:307-317.
- 80- Arndt, P., Abraham, E. Immunological therapy of sepsis: experimental herapies. *Intensive Care Med*. 2001; 27:104–115.
- 81- Beutler B., Greenwald D., Hulmes J.D., Chang M., Pan E. Mathison J., Ulevitch R., Cerami A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985: 316;552-554
- 82- Caput, D., B. Beutler, K. Hartog, R. Thayer, S. Brown-Shimmer, and A.Cerami. Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl.Acad. Sci*. 1986;83;1670-1674.
- 83- Palladino M.A., Bahjat F.R., Theodorakis E.A., Moldawer L.L. Anti-TNF- $\alpha$  Therapies: The Next Generation. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 736-746
- 84- Idriss HT, Narismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure- function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50:184-195.

- 85- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. 1996;87:565-576.
- 86- [www.clinsci.org/](http://www.clinsci.org/) Clin. Sci. 2005;109:135-142
- 87- <http://www.copewithcytokines.de/>
- 88- De Letter MA, van Doorn PA, Savelkoul HF et al. Critical illness polyneuropathy and myopathy (CIPNM): evidence for local immune activation by cytokine-expression in the muscle tissue. *J Neuroimmunol*. 2000;106:206–213.
- 89- Borge BA, Kalland KH, Olsen S, Bletsa A, Berggreen E, Wiig H. Cytokines are produced locally by myocytes in rat skeletal muscle during endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:735-744.
- 90- Li YP, Reid MB. Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13:483-487.
- 91- De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, Cerf C, Renaud E, Mesrati F, Carlet J, Raphaël JC, Outin H, Bastuji-Garin S. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA* 2002;288:2859-2867.
- 92- Lang CH, Silvis C, Deshpande N, Nystrom G, Frost RA. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* 2003;19:538-546.
- 93- Shindoh, C., Hida, W., Ohkawara Y., Yamauchi K., Ohno I., Takishima T., Shirato K. TNF-alpha mRNA expression in diaphragm muscle after endotoxin administration. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:1690-1691.
- 94- Wilcox, P., Milliken, C. & Bressler, B. High-dose tumor necrosis factor alpha produces an impairment of hamster diaphragm contractility. Attenuation with a prostaglandin inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:1611-1615.
- 95- Hopkins, P.M. Human recombinant TN F-alpha affects rat diaphragm muscle in vitro. *Intensive Care Med*. 1996;22: 359-362.

- 96- Alloatti G, Penna C, Mariano F, Camussi G. Role of NO and PAF in the impairment of skeletal muscle contractility induced by TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:2156-2163.
- 97- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994;372:546-548.
- 98- Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ : involvement of muscle myofilaments. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:479-484.
- 99- el-Dwairi Q, Comtois A, Guo Y, Hussain SN. Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am J Physiol*. 1998;274:770-779.
- 100- Capasso M, Di Muzio A, Pandolfi A, Pace M, Di Tomo P, Ragno M, Uncini A. Possible role for nitric oxide dysregulation in critical illness myopathy. *Muscle Nerve* 2008;37:196-202.
- 101- Buck M, Chojkier M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J*. 1996;15:1753-1765.
- 102- Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ Jr, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation* 2000;102:1690-1696.
- 103- Schütze S, Machleidt T, Krönke M. Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Semin Oncol*. 1992;19:16-24.
- 104- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, and Mann DL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptors in the failing human myocardium. *Circulation* 1996;93:704-711.
- 105- Shindoh C, Hida W, Ohkawara Y, Yamauchi K, Ohno I, Takishima T, Shirato K. TNF- $\alpha$  mRNA expression in diaphragm muscle after endotoxin administration. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Nov;152:1690-1696.



- 106- Zamir O, Hasselgren PO, Kunkel SL, Frederick J, Higashiguchi T, Fischer JE. Evidence that tumor necrosis factor participates in the regulation of muscle proteolysis during sepsis. *Arch Surg.* 1992;127:170-174.
- 107- Pajak B, Orzechowska S, Pijet B, Pijet M, Pogorzelska A, Gajkowska B, Orzechowski A. Crossroads of cytokine signaling--the chase to stop muscle cachexia. *J Physiol Pharmacol.* 2008 ;59:251-264.
- 108- Li YP, Reid MB. NF- $\kappa$ B mediates the protein loss induced by TNF- $\alpha$  in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol.* 2000;279:1165–1170.
- 109- Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- $\kappa$ B activation in response to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *FASEB J.* 1998;12:871-880.
- 110- Williams, G., Brown, T., Becker, M., Prager, M. & Giroir, B.P. Cytokine-induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes. *Am J Physiol.* 1994;267:1020-1025.
- 111- Li Y-P, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB: Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygenmediated NF- $\kappa$ B activation in response to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *FASEB J.* 1998;12:871-880.
- 112- Brennan P, O'Neill LA. Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1260:167-75.
- 113- Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res.* 2001;2:269-72.
- 114- Lang CH, Frost RA. Sepsis-induced suppression of skeletal muscle translation initiation mediated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Metabolism* 2007;56:49-57.
- 115- Tawa NE Jr, Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest.* 1997;100:197-203.

- 116- Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Acute treatment with tumour necrosis factor-alpha induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 1993;125:11-18.
- 117- Cheema IR, Hermann C, Postell S, et al.:Effect of chronic excess of tumour necrosis factor-alpha on contractile proteins in rat skeletal muscle. *Cytobios.* 2000;103:169–176.
- 118- Goodman MN. Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Am J Physiol.* 1991, 260:727-730.
- 119- Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 2000; 289:2363–2366.
- 120- Chai J, Wu Y, Sheng ZZ. Role of ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia. *Crit Care Med.* 2003;31:1802-1807.
- 121- García-Martínez C, Llovera M, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM. Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased during sepsis: involvement of TNF-alpha but not IL-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217:839-844.
- 122- Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, et al.: The expression of TNF alpha by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 1996; 97:1111–1116.
- 123- Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294:673-680.
- 124- Thaloor D, Miller KJ, Gephart J, Mitchell PO, Pavlath GK: Systemic administration of the NF-κB inhibitor curcumin stimulates muscle regenerations after traumatic injury. *Am J Physiol.* 1999,277:320-329.
- 125- Collins RA, Grounds MD. The Role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) in Skeletal Muscle Regeneration: Studies in TNF-α(-/-) and TNF-α(-/-)/LT-α(-/-) Mice. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:989-1001.
- 126- Li YP, Schwartz RJ. TNF-alpha regulates early differentiation of C2C12 myoblasts in an autocrine fashion. *FASEB J.* 2001;15:1413–1415.

- 127- Schade UF. Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. *Circ Shock*. 1990;31: 171-181.
- 128- Lundblad R, Ekstrom P, Giercksky KE. Pentoxifylline improves survival and reduces tumor necrosis factor, interleukin-6, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Shock*. 1995;3:210-215.
- 129- Staudinger T, Presterl E, Graninger W, Locker GJ, Knapp S, Laczika K, Klappacher G, Stoiser B, Wagner A, Tesinsky P, Kordova H, Frass M. Influence of pentoxifylline on cytokine levels and inflammatory parameters in septic shock. *Intensive Care Med*. 1996;22:888-893.
- 130- Semmler J, Gebert U, Eisenhut T, Moeller J, Schönharting MM, Alléra A, Endres S. Xanthine derivatives: comparison between suppression of tumour necrosis factor-alpha production and inhibition of cAMP phosphodiesterase activity. *Immunology*. 1993;78:520-525.
- 131- Lira EC, Graca FA, Goncalves DA, Zanon NM, Baviera AM, Strindberg L, Lönnroth P, Migliorini RH, Kettelhut IC, Navegantes LC. Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. *Shock*. 2007;27:687-694.
- 132- Voisin L, Breuillé D, Ruot B, Rallièrre C, Rambourdin F, Dalle M, Obled C. Cytokine modulation by PX differently affects specific acute phase proteins during sepsis in rats. *Am J Physiol*. 1998;275:1412-1419.
- 133- Breuille D, Farge MC, Rose F, Arnal M, Attaix D, Obled C. Pentoxifylline decreases body weight loss and muscle protein wasting characteristics of sepsis. *Am J Physiol*. 1993;265:660-666.
- 134- Goldberg RM, Loprinzi CL, Mailliard JA, O'Fallon JR, Krook JE, Ghosh C, Hestorff RD, Chong SF, Reuter NF, Shanahan TG. Pentoxifylline for treatment of cancer anorexia and cachexia? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 1995;13:2856-2859.

- 135- Zeni F, Pain P, Vindimian M, Gay JP, Gery P, Bertrand M, Page Y, Page D, Vermesch R, Bertrand JC. Effects of pentoxifylline on circulating cytokine concentrations and hemodynamics in patients with septic shock: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med.* 1996;24:207-214.
- 136- Ji Q, Zhang L, Jia H, Xu J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34:427-436.
- 137- Combaret L, Ralliere C, Taillandier D, Tanaka K, Attaix D. Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Mol Biol Rep.* 1999;26:95-101.
- 138- Coimbra R, Melbostad H, Loomis W, Tobar M, Hoyt DB. Phosphodiesterase inhibition decreases nuclear factor-kappaB activation and shifts the cytokine response toward anti-inflammatory activity in acute endotoxemia. *J Trauma.* 2005 Sep;59:575-582.
- 139- Danjo W, Fujimura N, Ujike Y. Effect of pentoxifylline on diaphragmatic contractility in septic rats. *Acta Med Okayama.* 2008;62:101-107.
- 140- Pentoxifylline in Duchenne muscular dystrophy (phase II). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00102453>
- 141- Refsum SE, Rowlands BJ, Boston VE. Pentoxifylline improves intracellular electrolytes in sepsis. *J Pediatr Surg.* 1994;29:801-804.
- 142- Hinkle RT, Dolan E, Cody DB, Bauer MB, Isfort RJ. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 2005;32:775-781.
- 143- Safety Update on TNF- $\alpha$  Antagonists: Infliximab and Etanercept. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3779b2\\_01\\_cber\\_safety%20\\_revision2.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3779b2_01_cber_safety%20_revision2.pdf).
- 144- Remick DG, Call DR, Ebong SJ, Newcomb DE, Nybom P, Nemzek JA, Bolgos GE. Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decreases sepsis mortality. *Crit Care Med.* 2001;29:473-481.

- 145- Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. JAMA 1995;273:934-941.
- 146- Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, et al: Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. Crit Care Med. 1993;21:318–327.
- 147- Alexander HR, Sheppard BC, Jensen JC, Langstein HN, Buresh CM, Venzon D, Walker EC, Fraker DL, Stovroff MC, Norton JA. Treatment with recombinant human tumor necrosis factor-alpha protects rats against the lethality, hypotension, and hypothermia of gram-negative sepsis. J Clin Invest. 1991;88:34-39.
- 148- Guo Z, Wang S, Jiao Q, Xu M, Xu Z. Soluble TNFR II/IgG1 Fc fusion protein treatment in the LPS-mediated septic shock of rats. Biomed Pharmacother. 2009;63:537-542.
- 149- Grounds MD, Davies M, Torrisi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. Silencing TNFalpha activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. Cell Tissue Res. 2005;320:509-515.
- 150- Avunduk MC, Avunduk AM, Oztekin E, Baltaci AK, Ozyazgan Y, Mogolkoc R. Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. Exp Eye Res. 2004;79:357-365.
- 151- Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. Neuromuscul Disord. 2006;16:591-602.
- 152- Steffen BT, Lees SJ, Booth FW. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. J Appl Physiol. 2008;105:1950-1958.

- 153- Cooney R, Kimball SR, Eckman R, Maish G 3rd, Shumate M, Vary TC. TNF-binding protein ameliorates inhibition of skeletal muscle protein synthesis during sepsis. *Am J Physiol.* 1999;276:611-619.
- 154- <http://www.lgmpharma.com/p-7-11-724/etanercept.html>
- 155- Fazarinc G. Enzyme-immunohistochemical aspects of muscle fiber type classification in mammals *Slov Vet Res.* 2009;46:61-70
- 156- <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/myosin.html>
- 157- Witcherman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189–201.
- 158- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4:31-36.
- 159- İskit AB. Sepsiste Deneysel Modeller. *Yoğun Bakım Dergisi* 2005;5:133-136.
- 160- Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, Isetta AM, Grau G, Buurman W, van Tits LJ, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2:549-53.
- 161- Kılıç YA, Canpınar H, Güç D, Sayek İ. Otolog ve homolog kan transfüzyonunun karın içi enfeksiyon modelinde TNF-alfa düzeyleri ve sağkalıma etkisi. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2009;15:324-329.
- 162- Rannou F, Pennec JP, Rossignol B, Morel J, Dorange G, Arvieux C, Gioux M, Giroux-Metges MA. Effects of chronic sepsis on rat motor units: experimental study of critical illness polyneuromyopathy. *Exp Neurol.* 2007;204:741-747.
- 163- Voisin L, Breuillé D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Aurousseau E, Obled C, Attaix D. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest.* 1996;97:1610-1617.

- 164- Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int.* 2008 Feb;52(3):447-56.

## IX. EKLER

### IX.1. EK 1: Deney Hayvanları Etik Kurulu onamı

#### HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/32

31 Mart 2010

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

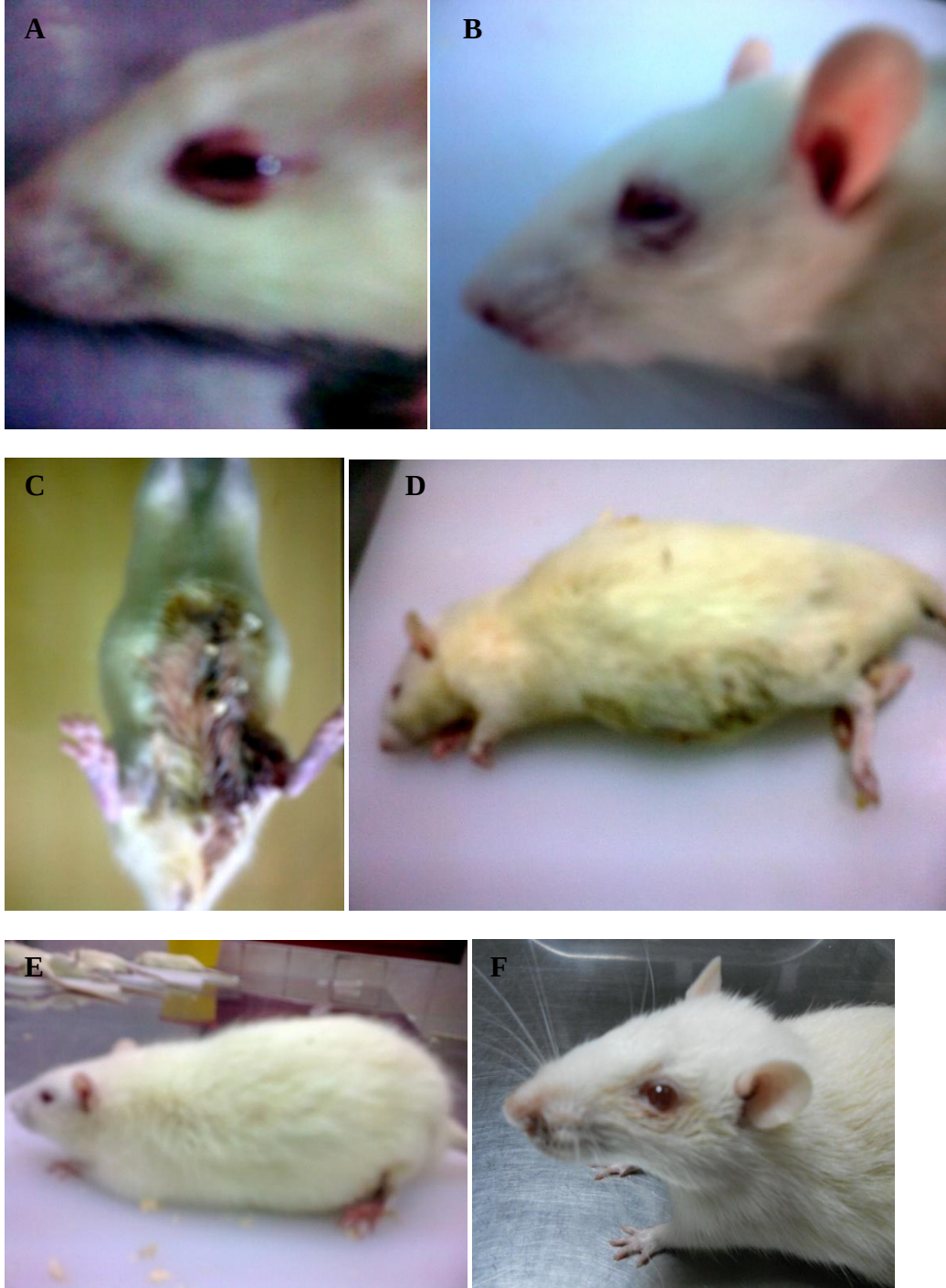
|                                 |                                                                                          |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| TOPLANTI TARİHİ                 | : 16.03.2010 (SALI)                                                                      |
| TOPLANTI SAYISI                 | : 2010/3                                                                                 |
| DOSYA KAYIT NUMARASI            | : 2010/19                                                                                |
| KARAR NUMARASI                  | : 2010/19-4                                                                              |
| ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ            | : Prof. Dr. Ersin Tan                                                                    |
| HAYVAN DENEYLERİNDEN            |                                                                                          |
| SORUMLU ARAŞTIRMACI             | : Güliz Sayat                                                                            |
| YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR         | : Prof. Dr. Sevim Erdem Özdamar, Dr. Amber Eker, Dr. Ebru Bodur, Dr. Çağrı Mesut Temuçin |
| ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI | : 54 adet erkek Sprague-Dawley                                                           |
| ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ          | : 12 ay                                                                                  |

Fakültemiz Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ersin Tan'ın yürütücüsü olduğu 2010/19 dosya numaralı ve "*Kritik Hastalık Myopatisi Modelinde Serum ve Kas TNF Alfa Düzeylerinin Myopati Oluşumundaki Rolü ve Anti-TNF Alfa Ajanlarının Kritik Hastalık Myopatisi Tedavisindeki Yeri*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

  
Prof. Dr. Hakan S. ORER  
Etik Kurul Başkanı



**IX.2. EK 2: Deney hayvanlarında gözlenen septik bulguların örnek resimleri**

**A ve B:** Belirgin subkonjonktival hemoraji

**C ve D:** Belirgin abdominal distansiyon

**E:** Piloereksiyon

**F:** Bir miktar piloereksiyon ve hafif subkonjonktival hemoraji