

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**KOLOSTOMİ YAPILMIŞ TAVŞANLARDA KOLOSTOMİNİN DİSTALİNDE
KALAN BARSAK SEGMENTLERİNDE KOLİNERJİK VE NİTRERJİK
SİSTEMLERDEKİ DEĞİŞİKLİKLER**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SERDAR MORALIOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. İ. ONUR ÖZEN**

ANKARA-2007

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kalın barsak	3
2.2.Çocuklarda kolostomi yapılmasını gerektirebilen hastalıklar	7
2.3.Kolostomi tipleri	7
2.4.Enterik sinir sistemi	8
2.5.Kolonda elektriksel alan uyarısı(EAU)	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1.Hayvanlar ve gruplar	19
3.2.Operasyon	20
3.3.Sigmoid kolon dokusunun hazırlanması	21
3.4.Deney protokolu	23
3.5.Deneylerde kullanılan besleyici solüsyon ve ilaçlar	28
3.6.Bulguların sunuluşu ve istatistiksel analiz	28
4.BULGULAR	29
4.1.Kolostominin doku ağırlığı ve düz kas fonksiyonları üzerine olan etkisi	29
4.2.Kolostominin EAU yanıtları üzerine olan etkisi	30
4.3.Kolostominin kolinerjik sistem üzerine etkisi	33
4.4.Kolostominin nitreerjik sistem üzerine etkisi	37
4.5.Kolostominin kolinerjik ve nitreerjik sistem dışındaki sistemlere olan etkisi	41

5.TARTIŞMA	42
6.ÖZET	51
7.YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)	53
8.KAYNAKLAR	55

1.GİRİŞ

Kolostomi, çocuk ve yetişkinlerde birçok hastalığın tedavisi sırasında geçici veya kalıcı olarak kullanılan bir cerrahi yöntemdir. Çocuklarda Hirschsprung hastalığı ve anorektal malformasyon gibi konjenital hastalıkların tedavisinde çok evreli ameliyatlarda ilk aşaması olarak, kolorektal ameliyatlarda sonrasında anastomoz kaçacağını engellemek amacıyla veya gecikmiş kolon perforasyonu gibi durumlarda acil şartlarda kullanılabilir. Çocuklarda genellikle geçici bir süre için kullanılan kolostominin distalindeki fonksiyon dışı kalan segmentlerde motiliteyi etkileyen yollarda herhangi bir değişikliğin olup olmadığı bilinmemektedir.

Karışık sinir ağlarından ve plexuslardan meydana gelen ve birçok nörotransmitterin etkileşimi sayesinde işlev gören enterik sinir sistemi, gastrointestinal sistemin motilitesini, ekzokrin ve endokrin salgılarını, mikrodolaşımı, immün ve inflamatuvar yanıtı kontrol eder. Enterik sinir sistemi, ekstrasik ve intrinsik bileşenlerden oluşur(28). Ekstrasik bileşeni; vagus siniri, pelvik sinirlerle gelen pregangliyonik parasempatik lifler, arterlerle birlikte ilerleyen postgangliyonik sempatik lifler ve non-adrenerjik non-kolinerjik lifler oluşturur. İntrinsik bileşen ise, myenterik, iç ve dış submukozal plexuslardan oluşur(28,39).

Enterik nöronlar etkilerini nörotransmitter olarak bilinen kimyasallar aracılığıyla gösterir. Asetilkolin ve nitrik oksit, gastrointestinal sistemde etkili olduğu gösterilmiş çok sayıda nörotransmitterin varlığına rağmen, halen en etkili olduğu düşünülen nörotransmitterlerdir. Asetilkolinin, gastrointestinal sistemde kasılmaya neden olan en önemli nörotransmitter olduğu daha önce gösterilmiştir. Sempatik sinir sistemi, gastrointestinal

sistemde düz kasları gevşetirken, sfinkterlerin kasılmasına neden olmaktadır. Ayrıca non-adrenerjik non-kolinerjik sistem, gastrointestinal motilite üzerinde hem inhibitör hem de aktivator rolü oynamaktadır. Nitrik oksit ise, gastrointestinal sistemin gevşemesini sağlayan en önemli nörotransmitterdir(28,39).

Bu çalışmada, kolostominin distalinde bir süre işlev dışı kalan barsak segmentindeki kolinerjik ve nitrejik sistemler, barsak motilitesini etkileyecek olası değişiklikleri saptamak amacıyla, fonksiyonel olarak invitro yöntem ile incelendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kalın barsak

Kalın barsak ileumun son kısmından başlar, anüste sona erer. Yapısal olarak ince barsaklardan bazı farklılıkları vardır. Bunlar:

1- Lümen çapı ince barsaklardan daha geniştir.

2- İnce barsağa göre daha büyük bir bölümü tespit edilmiş durumdadır.

3- Kalın barsaklarda longitudinal kas lifleri bir araya toplanarak 6-7 mm genişliğinde *tenia coli* olarak adlandırılan üç adet uzunlamasına band oluşturmuşlardır. Tenialardan biri (*tenia libera*) serbesttir. Kalın barsağın her parçasında görülebilir. Transvers kolonda altta, çekum, inen kolon, çıkan kolon ve sigmoid kolonda önde bulunur. Kalan iki tenia inen ve çıkan kolonda barsağın karın arka duvarına yapışan bölümlerine rastladığı için görülmezler. Transvers kolonda bu tenialardan birine mezokolon yapışmıştır. Buna *tenia mezokolika* denir. Transvers kolonda arkada, kolonun diğer kısımlarında ise arka iç yüzdendir. Üçüncü teniaya da omentum majus yapıştığı için *tenia omentalis* adı verilmiştir. Transvers kolonun ön-üst yüzeyinde, diğer kısımlarda ise arka-dış yüzde yer alır.

4- Tenialar barsak uzunluğuna göre daha kısadır. Bu nedenle kolon büzülmüş ve *haustra* denen kesecikler oluşmuştur. Barsağın iç yüzünde haustralar birbirilerinden *plica semilunalis* denilen mukoza kıvrımları ile ayrılmıştır.

5- Kalın barsağın dış yüzünde küçük, peritonla örtülü yağ dokusu çıkıntıları vardır. Bunlara *appendices epiploica* denir. Bu çıkıntılar çekum, appendiks vermiformis ve rektum dışında tüm kalın barsağın serbest yüzü üzerinde tenialar boyunca dizilmiştir(12).

Kalın barsak; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anal kanal olarak isimlendirilen bölümlere ayrılır.

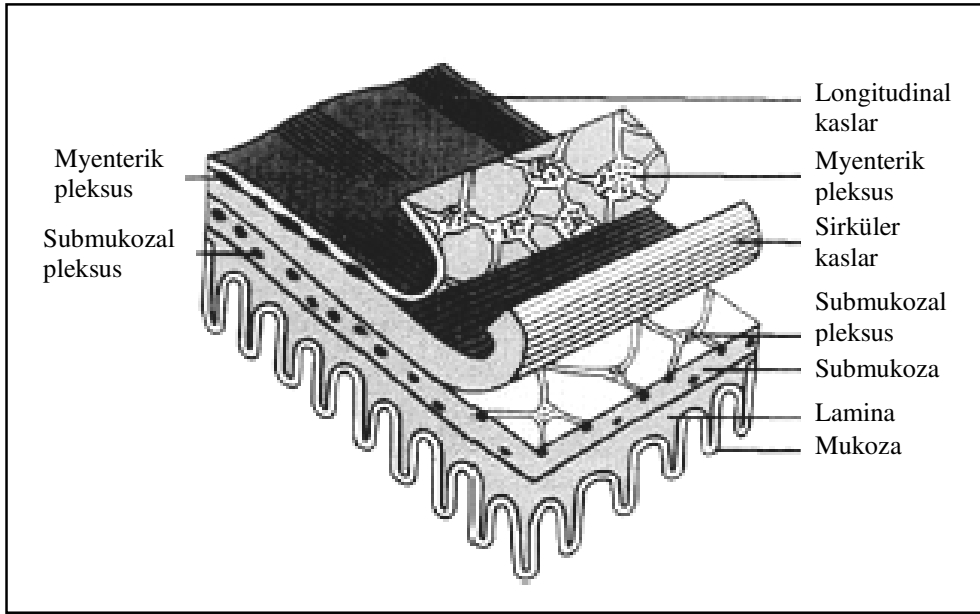
Çekum, apendiks vermiformis, çıkan kolon ve transvers kolonun büyük kısmı süperior mezenterik arter ve dalları tarafından; transvers kolonun distali, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum ise inferior mezenterik arter tarafından beslenir. Kolonun venöz kanı, süperior ve inferior mezenterik venler aracılığıyla portal vene drene olur(26).

Kalın barsağın innervasyonunda, süperior mezenterik arter dalları tarafından beslenen kısım çölyak ganglion ve süperior mezenterik gangliondan sempatik lifler, nervus vagustan da parasempatik lifleri alır. İnferior mezenterik arter dalları tarafından beslenen kısmı ise sempatik innervasyonunu sempatik trunkusun lumbar kısmından ve süperior hipogastrik pleksustan, parasempatik innervasyonunu da pelvik splaknik sinirler vasıtasıyla alır. Her iki tip sinir lifleri barsağa süperior ve inferior mezenterik arterlerin dalları çevresinde pleksuslar yaparak dağılırlar(12).

Kalın barsaklar, histolojik olarak içten dışa doğru sırasıyla mukoza, submukoza, muskuler tabaka ve serozadan meydana gelirler. Mukoza; epitel, lamina propria ve muskularis mukozadan oluşur. Lamina propria, kan ve lenf damarlarından zengin gevşek bir bağ dokusudur. Düz kas hücreleri, bezler ve lenfoid doku içerir. Muskularis mukoza ise mukozayı submukozadan ayıran içte ince sirküler, dışta longitudinal düz kas hücrelerinin oluşturduğu tabakalardan ibarettir. Submukoza, çok sayıda kan ve lenf damarları ve submukozal bir sinir ağı (submukozal pleksus) içeren gevşek bir bağ dokusudur. Muskuler tabaka; içte sirküler, dışta longitudinal olacak şekilde iki tabakalıdır. Bu iki kas tabakası arasında bir sinir ağı (myenterik pleksus-Auerbach pleksusu), kan ve lenf damarlarının bulunduğu bir bağ dokusu

bulunur(Şekil-1). Seroza ise, ince ve gevşek bir bağ dokusundan oluşur. Kan ve lenf damarları ve yağ dokusundan zengindir ve üzeri mezotel denen tek katlı yassı epitelle örtülüdür(17).

Kalın barsağın motor, salgılama, emilim, depolama ve boşaltım fonksiyonları vardır. Kalın barsak mukozası, rektum kısmı hariç katlantılar içermez, villuslar yoktur. İntestinal bezler uzundur ve çok sayıda goblet ve emici hücre ve az sayıda enteroendokrin hücre ile karakterizedir. Emici hücreler; silindirik, kısa ve düzensiz mikrovilluslara sahiptir. Bu, organın asıl fonksiyonu olan suyun emilmesi ve dışkı kitlesinin oluşumu için gereklidir. Epitel hücrelerinin bazal yüzünden dışarıya sodyumun aktif transportunu takiben suyun emilmesi pasiftir. Mukozadan ayrıca sulu-jel kıvamında mukus salgılanır. Mukus sadece intestinal yüzeyi kayganlaştırmakla kalmaz, bakterileri ve partiküllü maddelerin üzerini örter(17).



Şekil-1: Kalın barsak duvar yapısının, myenterik ve submukozal pleksusun şematik gösterimi(28).

Barsak lümeninde kimusun ilerlemesi barsağın peristaltik hareketleri ile sağlanır. Peristaltizmin yönü daima anüse doğrudur. Sindirim kanalının herhangi bir bölümünün barsak içeriği ile gerilmesi peristaltik refleksi uyarır. Peristaltik hareketi kontrol eden nöral refleks barsağın gerilmesiyle düz kas tabakaları arasındaki pacemaker hücrelerinin kendiliğinden depolarize olmalarıyla başlar. Elektriksel uyarı submukozal ve myenterik pleksuslarda yer alan nöronlara iletilir(6). Ekstrinsik sinir lifleri ve submukozal ve myenterik pleksuslarla birlikte, interstisiyel Cajal hücrelerinin de barsak duvarındaki düz kasların hareketlerinde önemli bir rolü vardır(15). Submukozal pleksustan kalkan uyarı, myenterik pleksustaki kolinerjik nöronlara ulaşır ve asetilkolinin uyarıcı etkisiyle sirküler kaslar bolusun 1-2 cm yukarısından kontraksiyon halkasını başlatır. Aynı anda, kolinerjik nöronlarla sinaps yapan inhibitör nöronların etkisiyle de, longitudinal kaslar kasılır, sirküler kaslar gevşer ve bolusun distalinde kalan barsak segmentinde dilatasyon meydana gelir. Bir sonraki segmente itilen kimus, bu sefer bu bölgede distansiyona neden olarak yeni bir peristaltik refleks başlatır. Peristaltik refleksin oluşabilmesi için barsağın motor aktivitesinden sorumlu olan myenterik pleksusun varlığı şarttır(1).

2.2.Çocuklarda kolostomi yapılmasını gerektirebilen hastalıklar

- Hirschsprung hastalığı
- Anorektal malformasyonlar
- Kolon perforasyonu
- Anorektal yaralanmalar
- Kolon atrezisi
- Midgut ve sigmoid volvulus
- Nekrotizan enterokolit
- İnvajinasyon
- İnflamatuvar barsak hastalığı
- Pelvik tümörler
- Mekonyum ileusu-peritoniti

2.3.Kolostomi tipleri

Kolostomi temel olarak üç şekilde yapılabilir:

-Uç (End) kolostomi: Barsak ikiye ayrıldıktan sonra proksimal barsak kolostomi olarak çıkartılırken, distal ucun ağzı kapatılarak karına bırakılır.

-Halka (lup) kolostomi: Kolostomi yapılacak barsak ansı karın dışına alınıp arka duvarı (mezenterik tarafı) tam olarak ayrılmadan karın ön duvarına tespit edilir.

-Çifte namlusu (double-barrel) kolostomi: Kolostomi yapılacak barsak segmenti tam olarak ayrılarak yan yana karın ön duvarına tespit edilir. Ayrıca, bu şekilde kolostomi yapılırken proksimal ve distal uçlar birbirilerinden uzakta tespit edilerek diverjan kolostomi de yapılabilir.

Kolostominin hangi tipte yapılacağına kolostomiye gerektiren hastalığın özelliklerine göre karar verilir. Lup kolostomi hem daha kolay yapılabilmesi hem de ekstrapéritoneal kapatmaya imkan verdiği için en sık kullanılan tiptir. Ancak, bu tip ostomilerde daha sık distal uçta olmak üzere prolapsusla karşılaşma olasılığı daha yüksektir. Lup kolostominin ikinci olumsuz özelliği de proksimal ve distal uçlar tek kolostomi torbası içinde yer alacaklarından proksimalden gelen dışkının distal uçtan yoluna devam edebilmesidir. Kolostomi distaldeki bir sorunu korumak için yapılmışsa bu tip bir ostomi tasarımı önemli bir sakıncadır. Buna karşı, mezentere dokunulmadığından kan dolaşımı ile ilgili sorunlar yaşanmaz.

Kolostomi, üriner veya vajinal fistüllü bir anorektal malformasyon için yapılmaktaysa birinci koşul diverjan olmasıdır. Kolostominin diverjan yapılması dışkının distale geçişini engelleyecektir. Anorektal malformasyon ve Hirschsprung hastalığı için diverjan kolostomi yapılırken distal ucun ağzı kapatılıp karın boşluğuna bırakılarak uç kolostomi yapılmamalıdır. Bu hastalıklarda distalden çıkış olmadığından kapalı distal segment sorun yaratır(5).

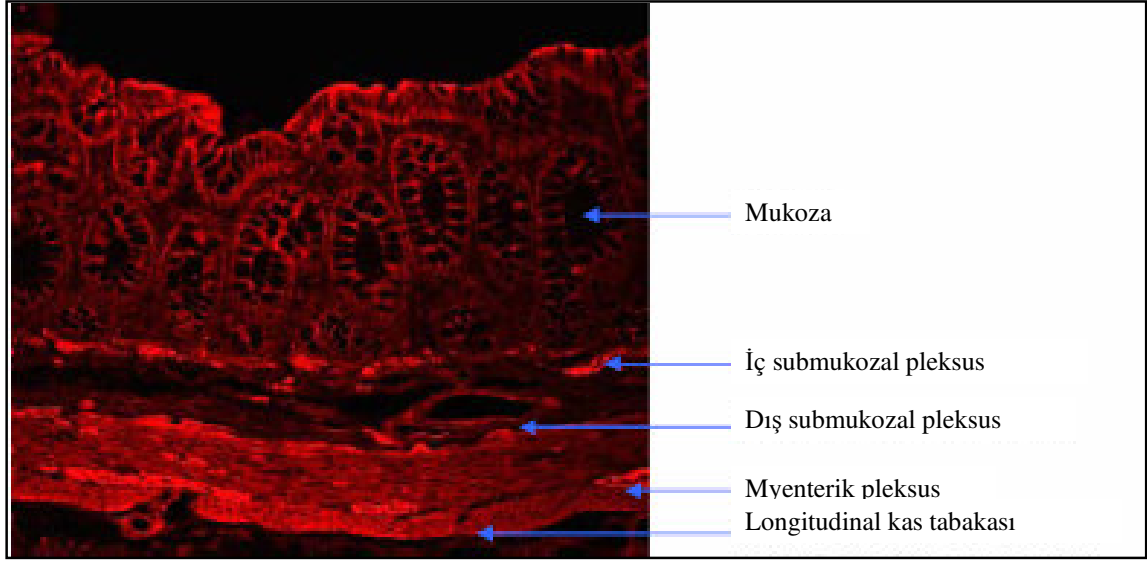
2.4.Enterik sinir sistemi

Enterik sinir sistemi, periferik sinir sisteminin en büyük ve karışık kısmıdır. Bu sistemdeki sinir hücreleri, barsağın diğer sinir hücreleri ile bağlantılar yaparak gastrointestinal sistem motilitesinden sorumlu olan düz kas hücrelerini innerve eder(28). Enterik sinir sistemi, barsaklar üzerindeki etkilerini ya direkt olarak ya da nöroendokrin hücreler, interstisiyel Cajal hücreleri ve immün sistem hücreleri gibi aracı hücreler üzerinden indirekt olarak gösterir(32).

Omurgalılarıdaki enterik sinir sistemi; ekstrinsik ve intrinsik bileşenlerden oluşur. Ekstrinsik bileşen, parasempatik ve sempatik sistemlerden oluşmaktadır. Barsakta motor ve

sekretomotor fonksiyonları kontrol eden parasempatik innervasyon; üst gastrointestinal sistemde vagus siniri ile distal kolon ve rektumda ise sakral sinirler aracılığıyla olur. Sinirler aracılığıyla gelen pregangliyonik parasempatik lifler barsak duvarındaki ganglionlara girerler. Prevertebral gangliyonlardan gelen postgangliyonik sempatik adrenerjik lifler; vazoaaktif intestinal polipeptid içeren sekretomotor nöronlarda, presinaptik kolinerjik sinir sonlanmalarında, submukozal kan damarlarında ve gastrointestinal sistemin sfinkterlerinde etkilidirler(11). Postgangliyonik sempatik sinirler, mide ve barsak çeperinde kolinerjik intrinsik sinir uçlarındaki α_2 -adrenerjik reseptörleri aktive edip oradan asetilkolin salgılanmasını inhibe ederek düz kasları gevşetirler. Ayrıca düz kas hücrelerinin β_2 -adrenerjik reseptörlerini aktive ederek doğrudan gevşeme de yaparlar. Kardiya, pilor ve anüs gibi sfinkter yapılarındaki düz kasların α_2 -adrenerjik reseptörlerini aktive ederler ve bu yapıların kasılmasına neden olurlar(39).

Enterik sinir sisteminin intrinsik kısmı, dıştan içe doğru myenterik pleksus (Auerbach's pleksusu), dış submukozal pleksus (Schabadasch's pleksusu) ve iç submukozal pleksustan (Meissner's pleksusu) oluşur. Myenterik pleksus, dıştaki longitudinal kas tabakası ile içteki sirküler kas tabakası arasında yer alır. Dış submukozal pleksus sirküler tabakaya komşu olup, iç submukozal pleksus ise muskularis mukozaya yakındır(28) (Şekil-2). Myenterik pleksus, iki kas tabakasının motor innervasyonundan ve mukozanın sekretomotor innervasyonundan sorumludur. Submukozal pleksus ise muskularis mukozayı, intestinal nöroendokrin hücreleri, glandüler epiteli ve submukozal kan damarlarını innerve eder(28).



Şekil-2: Bir yenidoğanın ince barsak kesiti(40x)(28).

Glia hücreler, enterik sinir sisteminin tamamlayıcı bir parçasıdır. Enterik glial hücreler, santral sinir sistemindeki astrositlere benzer ve uzantıları ile enterik nöronların yüzeylerinin tamamına yakınına kaplar(28).

Embriyonik nöral krest, daha sonraki dönemlerde santral sinir sistemini oluşturacak olan nöral tüpten köken alır. Nöral krest hücreleri, hücreler arası ve hücre ile matriks arasındaki adezyonların azalması sonucu bu dokudan ayrılır. Nöral krest hücreleri tanımlanmış yolları izleyerek çeşitli dokulara hareket ederler ve değişik tip hücrelere farklılaşırlar(31). Melanositler, adrenal medulla, dişin dentin tabakası ve sempatik ve parasempatik gangliyonlar bu tip hücrelerin örnekleridir(28).

Enterik nöronlar, düzenleyici etkilerini nörotransmitter olarak bilinen kimyasallar aracılığıyla gösterirler. Nörotransmitterler de etkilerini özgül reseptörlerle etkileşerek gösterirler. Nörotransmitterlerin bu özgül reseptörlere bağlanması hücre içinde bir dizi

tepkimeyi başlatır. Enterik sinir sisteminde etkili olduğu düşünülen nörotransmitterlerin çokluğu sistemin karmaşıklığı hakkında bize ışıık tutmaktadır(28) (Tablo-1).

Asetilkolin, barsak duvarındaki düz kas hücrelerinin kasılmasını sağlayan temel uyarıcıdır. İntramural kolinerjik aktivitenin artmasıyla kasılmalar artarken, aktivitenin azalmasıyla kasılmalar azalır. Asetilkolin; diyetten alınan, nöronal geri dönüşümden elde edilen ve lokal olarak asetil koenzimA'dan üretilen kolinden, kolinerjik sinirlerde sentezlenir(28). Nöroefektör kavşaklardaki kolinerjik sinir uçlarında asetilkolin salıverilmesini etkileyen bazı presinaptik reseptörlerin bulunduğu gösterilmiştir. Bunların bir kısmı otoreseptör olarak da adlandırılan muskarinik presinaptik reseptörlerdir. Bunların aktivasyonu sonucu asetilkolin kendi salıverilmesini azaltır. Bu reseptörler pek çok dokuda M_2 alt tipine uymakla birlikte, bazı yerlerde M_1 veya M_3 tipi muskarinik otoreseptörlerde vardır. Kolinerjik sinir uçlarında α -adrenerjik (α_2 -alt tip), dopaminerjik, opioid mü tipi ve serotoninerjik reseptörlerde bulunur. Bunların uygun agonist ilaçlarla aktivasyonu asetilkolin salıverilmesini azaltır. Bu uçlarda nörotransmitter salıverilmesini etkileyen başka tür reseptörlerde vardır. Salıverilen nörotransmittere uyan otoreseptörler dışında kalan, bütün bu reseptörlere presinaptik heteroreseptörler adı verilir(39). Birçok nörotransmitterin enterik sinir sistemindeki temel görevi, bu reseptörler üzerinden, kolinerjik motor nöronların aktivitesini düzenlemektir(28).

• Asetilkolin	• Nöropeptid Y
• Norepinefrin	• Nörotensin
• Serotonin	• Dinorfin
• ATP	• Enkefalinler
• Nitrik oksit	• Endorfinler
• Bombesin	• Peptid Y
• Kalsitonin geni ile ilişkili peptid	• Pituitar adenilsiklaz aktive edici peptid
• Kolesistokinin	• Somatostatin
• Galanin	• Substans P
• Gastrin salıverici peptid	• Tirotropin salıverici hormon
• Nörokinin A	• Vazoaktif intestinal polipeptid
• Nöromedin U	• Vazoaktif intestinal kontraktör

Tablo-1: Enterik sinir sisteminde etkili olan nörotransmitterler(28).

Kolinerjik sinir uçlarından salıverilen asetilkolin, nikotinik ve muskarinik reseptörler üzerinden etki eder. Nikotinik reseptörler bir katyon kanalının intrinsik bir bölümünü teşkil ederler veya başka bir deyişle bu kanala doğrudan kenetlenmişlerdir. Nikotinik reseptörlerin asetilkolin veya diğer nikotinik reseptör agonistleri tarafından aktive edilmesi kanalın kısa bir süre için açılmasına neden olur; bu sırada kanalın konduktansı görece fazla artar. Nikotinik reseptörlerin kenetlendiği katyon kanalı tipi esas olarak Na^{+} ve daha az derecede Ca^{++} ve K^{+} u geçiren kanallardır. Bu kanalların açılması hücreleri depolarize eder; ganglion ve iskelet kası hücrelerinde EPS (eksitator postsinaptik potansiyel) oluşturur; bu potansiyel çizgili kasın nöromusküler kavşağında son plak potansiyeli olarak adlandırılır. Muskarinik reseptörler ise ilişkili oldukları transmembranal sinyal transdükleme sistemleri ile etki gösterirler. Bu sistemler Tablo-2’de özet olarak gösterilmiştir(39).

Reseptör	Aracı G proteini	Efektör makromolekül	Hücresel temel etki
M ₁	G _{q/11} ¹	Fosfoinoziditaz(PIP ₂ 'nin hidrolizi sonucu İP ₃ ve DAG oluşumu)	Eksitasyon
M ₂	G _{J/o}	Adenil siklaz inhibisyonu(cAMP oluşumunu azaltır)	İnhibisyon ²
		İçe yönelik doğrultucu K ⁺ kanalının aktivasyonu	İnhibisyon
		Voltaja-bağımlı Ca ⁺⁺ kanalı inhibisyonu	İnhibisyon
M ₃	G _{q/11} ¹	Fosfoinoziditaz(PIP ₂ 'nin hidrolizi sonucu İP ₃ ve DAG oluşumu)	Eksitasyon
	G _k	K _M tipi K ⁺ kanalının kapanması	Eksitasyon
M ₄	G _{J/o}	Adenil siklaz inhibisyonu(cAMP oluşumunu azaltır)	İnhibisyon ²
		Voltaja-bağımlı Ca ⁺⁺ kanalı inhibisyonu	İnhibisyon

Tablo-2: Muskarinik reseptör alt tiplerinin ilişkili oldukları transmembranal sinyal transdükleme mekanizmaları. 1.Pertussis toksinine duyarlı ve duyarsız izoformları vardır, 2.Düz kaslarda eksitasyon oluşur(39).

Nitrik oksit (NO), gastrointestinal sistem düz kaslarını gevşeten temel nörotransmitterdir(28). NO, nitrik oksit sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla L-argininden sentezlenir. NO hücrede sitoplazmik guanilat siklaza bağlanarak 5' siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini arttırarak düz kası gevşetir(34). İnfantil hipertrofik pilor stenozu, Hirschsprung hastalığı ve internal anal sfinkter akalazyası olan hastalardan alınan dokularda nitrejik innervasyonda defekt olması, bu hastalıkların patofizyolojisinde NO salıverilmesindeki bozukluğun rolü olabileceğini düşündürmektedir(28). Beyinde ve periferik sinir sisteminde nitrik oksit sentaz (NOS) nikotin adenin dinükleotid fosfat diaforaz (NADPH-d) ile birlikte bulunur. Scherer-Singleer ve ark.(33) tarafından beyin dokusunda histokimyasal boyama ile NADPH-d'nin gösterilmesi nöronal NOS'un tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Gabella (14), gastrointestinal sistemin ganglion hücrelerinin NADPH-d ile boyandığını ilk olarak 1967'de tanımlamıştır.

NO organizmada, nitrik oksit sentaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla L-arginin'in L-sitrüline dönüşümü sırasında açığa çıkmaktadır. NOS'ın değişik tiplerinin varlığı ortaya konmuştur; yapısal NOS'ın (cNOS), endotelde bulunan eNOS (NOS-3) ve nöronlarda bulunan nNOS (NOS-1) tipleri ayırd edilmiştir. İndüklenen NOS (iNOS)(NOS-2) çeşitli uyarılarla birçok hücrede ortaya çıkabilmektedir. NOS enziminin aktivitesi için tetrahidrobiopterin(BH₄), flavin adenin dinükleotid(FAD), flavin mononükleotid(FMN), nikotin adenin dinükleotid fosfat(NADPH), kalmodülin ve hem gibi bazı kofaktörler gereklidir. Yapısal NOS'ın NO sentezleyebilmesi için hücre içi serbest kalsiyum artışı en kritik noktayı oluşturmaktadır. Nöronal NOS aktivitesi ise Ca⁺⁺ /kalmodulin ve NADPH'a bağlıdır. Ancak iNOS aktivitesi için kalsiyum artışına gereksinim yoktur(43).

Sinir depolarizasyonu sırasında voltaja bağımlı Ca⁺⁺ kanallarının açılması veya reseptörle kenetli katyon kanallarının reseptörün agonisti olan maddeler tarafından açılması sonucu nöronlara Ca⁺⁺ girişinin artması, Ca⁺⁺'a duyarlı yapısal bir enzim olan nNOS'ı aktive eder ve NO sentezini artırır. NO, klasik nöromedyatörlerden farklı olarak nöronlarda veziküller içinde depo edilmez, üretilen NO hemen nöron dışına salıverilir ve lipofilik olması nedeniyle salıverildiği hücrenin çevresinde görece geniş bir alana yayılır; hücre ve sinir uçlarının içine kolaylıkla sokulur. Hedef hücrelerde soluble guanilat siklaz/cGMP sistemini aktive ederek etki oluşturur. Hücre içinde sentezi artan cGMP, etkisini genellikle aktive ettiği protein kinaz G(PKG) aracılığıyla yapmaktadır(18).

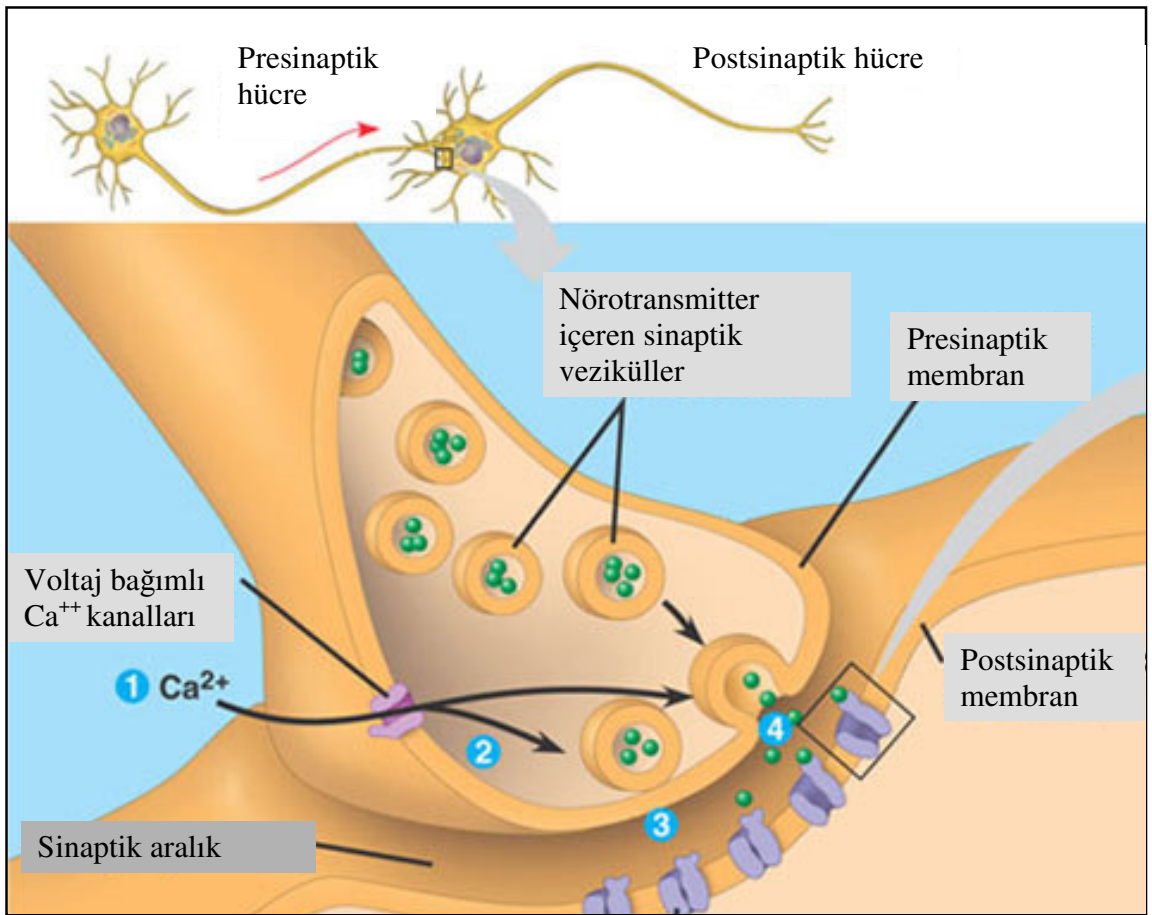
Enterik sinir sistemindeki motor nöronlar; longitudinal kasları, sirküler kasları ve muskularis mukozayı innerve eder. Bu kasıcı ve gevşetici sinir liflerinden salıverilen nörotransmitterler aracılığıyla kaslar gevşer veya kasılır. Kasıcı motor nöronlarda iletim

çoğunlukla muskarinik kolinerjik ve taşikinerjik (substans P, nörokinin A) etki ile oluşur. İnhibitör motor nöronlarda nitrik oksit, vazodilat intestinal polipeptid ve ATP nörotransmitter olarak kullanılır. Ayrıca, pitüiter adenilat siklaz aktive edici peptid, GABA, nöropeptid Y ve karbon monoksit inhibitör motor nöronlarda gösterilmiştir. İnhibitör motor nöronların aktivitesi devamlıdır ve aktif ilerleyici kasılma dalgaları sırasında azalır(28).

2.5. Kolonda elektriksel alan uyarısı (EAU)

İzole düz kas preparatlarında elektriksel alan uyarısına bağlı cevapların farmakolojik olarak analiz edilmesi, otonomik innervasyonu aydınlatmak için önemli bir yöntemdir. Elektriksel alan uyarısı ile sinir liflerinde hücre içine Na^+ girişi sonucu depolarizasyon oluşur. Depolarizasyon sonucu voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarından hücre içine Ca^{++} girer. Akson uçlarından nöromedyatörler, Ca^{++} ile tetiklenen parsiyel ekzositoz ile salıverilir. Tetikleme; bir dizi özgül proteinlerin, kinazlarla fosforilasyonu sonucu, kaskad şeklinde etkileşmesine yol açar. Bu kaskad birbiri ardından dört olayı meydana getirir. Yanaşma, hazırlama, Ca^{++} bağlanması ve füzyon ve porus oluşumu. Birinci olay sırasında veziküller sinir ucu membranının iç yüzüne yanaşarak tutunurlar. Bir yanda vezikül membranında bulunan sinaptobrevin ve rab3a molekülleri, öte yanda sitoplazma membranında bulunan sintaksinler ve SNAP-25 molekülleri yanaşmada rol oynarlar, bu olayda vezikül membranında sinaptotagminler düzenleyici görevi yapar. Daha sonraki basamaklarda sitoplazmik proteinler olan NSF (N-etilmaleimide duyarlı faktör) adlı bir ATPaz ve SNAP'lar (soluble NSF attachment proteins) ile diğer bazı proteinler rol oynar. Ardından, Ca^{++} 'un sinaptotagmin, CAPS vb. gibi kalsiyum reseptör proteinleri ile bağlanması gerçekleşir ve sonuçta sinaptofizinler, birbirine yapışmış vezikül ve sitoplazma membranının delinmesine (füzyon ve

porus oluşması) yol açar. Geçici olarak oluşan porustan, vezikül içindeki nöromedyatör moleküller hızla sinaps aralığına atılırlar, sonra porus kapanır ve boşalmış veziküller tekrar dolmak üzere sitoplazmaya dönerler. Kolinerjik, adrenerjik ve diğer tüm sinir uçlarından nöromedyatörlerin salıverilmesinin moleküler mekanizması aynıdır. Sinaptik aralığa salıverilen nörotransmitterlerin kümülatif etkisi postsinaptik uçta yanıt olarak ortaya çıkmaktadır(39)(Şekil-3).



Şekil-3: Sinir ucundan sinaptik aralığa nörotransmitter salıverilmesi(16).

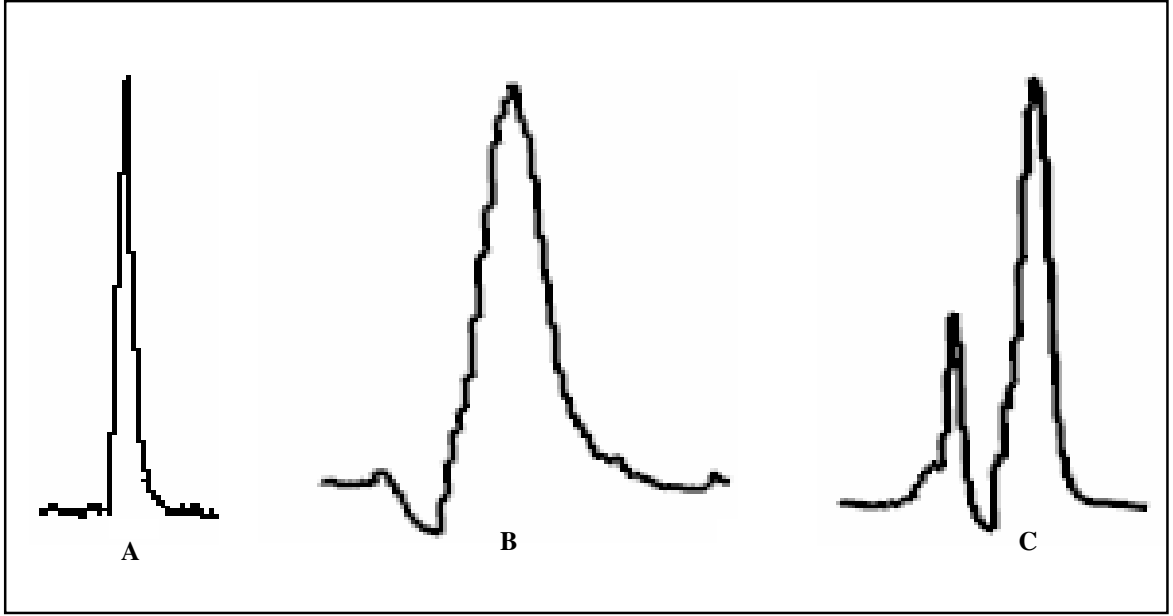
Elektriksel alan uyarısı (EAU)'na kolonun verdiği yanıtlar değişik protokollerle yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır. Kolon EAU'na hem gevşeme hem de kasılma yanıtları verebilmektedir. Gevşeme yanıtlarının büyük bir kısmının NO'e bağlı olduğu, EAU'na bağlı gevşeme yanıtlarının N-Nitro-L-Arginin Metil Ester hidroklorid (L-NAME) ile büyük oranda azalması ile gösterilmiştir(8,24,40). Bu gevşeme yanıtlarında adenosin trifosfat (ATP)'ın da rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır(40). Kasılma yanıtlarından, daha fazla kolinerjik olmak üzere peptiderjik sistemin de etkili olduğu gösterilmiştir(8,23,28,37).

Cellek ve ark.(8) insan kolonunda yaptıkları çalışmada EAU'na bağlı olarak üç farklı yanıt elde etmişler ve bu yanıtları aşağıdaki gibi tanımlamışlardır:

1-Monofazik yanıtlar: Saf kolinerjik kasılma yanıtı. Dokularda baskın olarak bu yanıt elde edilmiştir (Elde edilen yanıtların 56.8 ± 7.5). Nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olan L-NAME bu yanıtları artırmış (Şekil 4-A).

2-Bifazik yanıtlar: Nitrerjik gevşeme yanıtı ve bunu takiben kolinerjik kasılma yanıtı. EAU yanıtlarının 15.3 ± 3.8 'inde görülmüş. Ayrıca L-NAME kolinerjik sisteme bağlı kasılma yanıtlarını artırmış (Şekil 4-B).

3-Trifazik yanıtlar: Sırasıyla kolinerjik kasılma yanıtı, nitrerjik gevşeme yanıtı ve peptiderjik kasılma yanıtı. EAU yanıtlarının 27.9 ± 5.7 'inde görülmüş. L-NAME, bu yanıtın her iki kasılma fazını da artırmış (Şekil 4-C).



Şekil-4: İnsan izole kolon sirküler düz kasına ait EAU ile oluşan (A)monofazik, (B)bifazik, (C)trifazik yanıtlar(8).

3.GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde Eylül/2006-Ocak/2007 tarihleri arasında yapıldı. Farmakolojik deneyler, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışmanın etik kurul onayı Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alındı (Etik Kurul No: G.Ü.ET-06.003).

3.1.Hayvanlar ve gruplar

Bu çalışmada ağırlıkları 2000-2500 gr arasında değişen 24 adet erkek Yeni-Zelanda Albino tavşan kullanıldı. Hayvanlar iki gruba ayrıldı:

Grup 1 (Kontrol grubu): Sigmoid kolon segmentlerindeki nitrejik ve kolinerjik sistemlerin etkinliğinin araştırıldığı grup (n=8).

Grup 2 (Opere grup): Kolostomi yapılmasını takiben iki ay sonra kolostominin distalindeki barsak segmentinde kolinerjik ve nitrejik sistemde oluşan olası değişikliklerin araştırıldığı grup (n=12).

Opere gruptaki tavşanlara, iki aylıkken genel anestezi altında steril şartlarda sigmoid kolostomi yapıldı ve distal uç Hartmann poşu şeklinde karına bırakıldı. Kolostomi açılan onaltı hayvandan dört tanesi, iki aylık bekleme süresi içinde nedeni bilinmeyen bir şekilde kaybedildi ve kalan oniki hayvan bu sürenin ardından deneylerde kullanıldı. İki aylık bekleme süresinin ardından kolostomi yapılmış olan tavşanlar, barsak segmentleri invitro deneylerde kullanılmak üzere çıkarıldıktan sonra, sakrifiye edildiler. Kontrol grubunda ise 4 aylık hayvanlar kullanıldı.

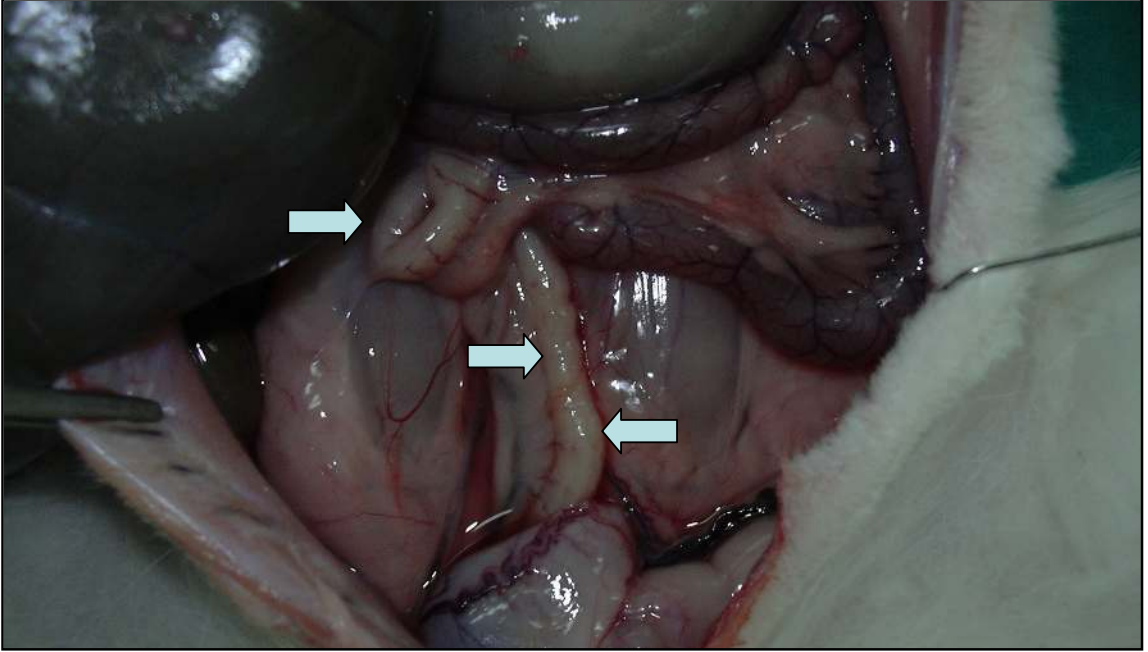
Hayvanlar sabit oda sıcaklığı ve nem ortamında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık standart laboratuvar şartlarında kafeslerde beslendi. Hayvanlara yapılan tüm cerrahi işlemler genel anestezi altında ve steril şartlarda uygulandı. Genel anestezi uygulaması amacıyla 45 mg.kg⁻¹ ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg.kg⁻¹ ksilazin hidroklorür (Alfazyne %2, Ege Vet, Türkiye) intramusküler olarak uygulandı.

3.2.Operasyon

Grup 2 (Opere grup)'deki kolostomi yapılan hayvanlar, bir gece önce aç bırakılarak, ertesi gün genel anestezi altında ve uygun steril şartlarda ameliyat edildi. Operasyonda orta hat kesi ile laparotomi yapıldı. İnen kolon, rektumdan yaklaşık 15.cm'den ikiye ayrılarak distal barsağın ucu 5/0 ipek dikişlerle tek kat kontinü olarak kapatılıp karına bırakıldı. Proksimal kolon segmenti ise orta hattın 3 cm lateralinden ve sol taraftan yapılan 1 cm'lik ikinci bir kesiden uç kolostomi olarak dışarı alınarak 5/0 polyglactic acid (Vycril) dikişlerle aralıklı olarak karın ön duvarına dikildi. Ardından kolostomi matüre edildi. Orta hat insizyon karın içine serum fizyolojik verilmesinin ardından kapatıldı (Şekil-5).



Şekil-5: İki aylık bekleme süresinden sonra orta hattın solundaki uç kolostomi görülmekte



Şekil-6: Kolostominin distalinde kalan ve deneylerde kullanılan kolon segmenti.

3.3.Sigmoid kolon dokusunun hazırlanması

Tavşanlar yüksek doz tiyopental (30mg/kg, i.v.) ile sakrifiye edildikten sonra karın orta hattan açılarak sigmoid kolon çıkarıldı (Şekil-6). Dışarı alınan dokular 37 °C'ye ısıtılmış %5 CO₂, %95 O₂ karışımı ile havalandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu bulunan petrilere sirküler olarak kesilerek hazırlandılar. Her hayvandan 8 adet sirküler kas preparatı hazırlandı. Dokular organ askısı yardımıyla Krebs-Henseleit solüsyonu içeren 15 ml'lik organ banyosuna bir ucu organ askısına, bir ucu izometrik kasılmaları kayıt etmek için "force displacement" transdüsera bağlı olacak şekilde yerleştirildiler (Şekil-7). Deneysel işlemler öncesinde tüm dokuların 1 gr'lık öngerilimde dengelenmesi için en az 60 dakika süre ile beklendi ve 15 dakikalık aralıklarla dokular taze Krebs-Henseleit solüsyonu ile yıkandı. Bir çift platin elektrod aracılığı ile oluşturulan EAU ile izometrik kasılmalar ortaya çıkartıldı. Değişken uyarım frekansları (0.5, 1, 2,

4, 8, 16 ve 32 Hz) ile 10 saniye süren impulslar dakikada bir kez uygulandı. 50 V'luk 0.8 msn süreli her bir stimulus, stimülatör (STPT 03, May Research Stimulator; COMMAT İletişim Ltd, Ankara, Türkiye) yardımı ile sirküler sigmoid kolon preparatlarına iletildi. Elektrik alan uyarılarının oluşturduğu cevaplar, izometrik “force displacement” transdüserlere (FDT 10-A, May IOBS 99, COMMAT İletişim Ltd, Ankara, Türkiye) bağlı, verileri analiz edebilme kapasitesine sahip bir yazılım kullanan (BSL PROv 3.6.7, BIOPAC Systems Inc, Santa Barbara, CA, ABD), dört kanallı transdüser veri toplama sistemli çevrimiçi bir bilgisayar (MP35, BIOPAC Systems Inc, Santa Barbara, CA, ABD) aracılığıyla kaydedildi (Şekil-7).



Şekil-7: Farmakolojik deneylerin yapıldığı tavşan izole kolon sirküler kas preparatlarının asılı olduğu dört kanallı organ banyosu (küçük resim), EAU oluşturmakta kullanılan stimülatörler ve izometrik “force displacement” transdüserlere bağlı, verileri analiz edebilme kapasitesine sahip bir yazılım kullanan, veri toplama sistemli çevrimiçi bilgisayar sistemi(MP35).

3.4.Deney protokolu

3.4.1.Kolostominin dokunun ağırlığı ve düz kas fonksiyonları üzerine olan etkisi

3.4.1.1. Doku ağırlığı

Eşit boyutlarda hazırlanan tüm sirküler sigmoid kolon preparatları, deneylerden sonra kurutularak kuru ağırlıkları hassas terazi ile tartıldı.

3.4.1.2.Ekzojen KCl ile oluşan kasılma yanıtları

Tüm deneylerin başında 40 mM KCl uygulanarak kasılma yanıtları alındı. Dokuların kasılma yanıtları, dokuların kuru ağırlıkları baz alınarak değerlendirildi.

3.4.1.3.Ekzojen papaverin ile oluşan gevşeme yanıtları

Dokulara, 40 mM KCl ile kasılmasının ardından direkt düz kas gevşeticisi olan papaverin 10^{-4} M uygulanarak, gevşeme yanıtları alındı.

3.4.2.Kolostominin EAU yanıtları üzerine olan etkisinin araştırılması

3.4.2.1.EAU'na bağlı nörojenik yanıtların tanımlanması

Dengelenme periyodunun ardından yapılan ön deneylerde EAU için uygun parametreler belirlendi. Dokulara değişik voltajlar altında EAU yapılarak kasılma cevapları elde edildi. Uygun parametreler 50 V, 0.8 ms. olarak belirlendi ve 60 saniyede bir 10 sn. süre ile uygulandı. EAU yanıtları alındıktan sonra ortama farklı dokularda farklı antagonistler (atropin, muskarinik reseptör antagonisti- 10^{-6} M; L-NAME, nitrik oksit sentaz inhibitörü- 3×10^{-4} M; MEN 10376, nörokinin reseptör antagonisti- 10^{-8} M) uygulanarak EAU ile oluşan kasılma ve gevşeme yanıtları tanımlandı.

Deneyleerin başlangıç aşamasında ayrı seri deneyleerde Na^+ kanal blokörü olan tetrodotoxin (TTX, 3×10^{-6})'in EAU ile elde edilen nörojenik kasılma yanıtları üzerine olan etkisine bakıldı.

3.4.2.2.Kolostominin EAU yanıtları üzerine etkisi

Elektriksel alan uyarılarına başlamadan 30 dk. önce izole organ banyolarına sempatik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için sempatik ganglion blokeri olan guanetidin (10^{-6} M) ve prostoglandinlerin etkilerini ortadan kaldırmak için prostoglandin sentez inhibitörü olan indometazin (10^{-5} M) eklendi. Takiben EAU ile 2 dk. ara ile değişken uyarım frekansları (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 Hz) kullanılarak kasılma yanıtları alındı. Frekans(Hz)-yanıt eğrisi alındı. Opere gruptan alınan frekans-yanıt eğrileri, kontrol grubundan alınan frekans-yanıt eğrileri ile karşılaştırıldı.

3.4.3.Kolostominin kolinerjik sistem üzerine etkisinin araştırılması

3.4.3.1.EAU ile oluşan kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlar üzerine kolostominin etkisi

Elektriksel alan uyarılarına başlamadan 30 dk. önce izole organ banyolarına sempatik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için sempatik ganglion blokeri olan guanetidin (10^{-6} M), prostoglandinlerin etkilerini ortadan kaldırmak için prostoglandin sentez inhibitörü olan indometazin (10^{-5} M) ve nitrerjik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için de NOS inhibitörü olan L-NAME (10^{-4} M) eklendi. Takiben, her iki gruptan da EAU ile 2 dk ara ile değişken uyarım frekansları (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 Hz) kullanılarak kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı kasılma yanıtları elde edildi. Dokuların EAU'na bağlı kasılma yanıtları, dokuların kuru ağırlıkları ile orantılanarak değerlendirildi.

3.4.3.2.EAU'na bağlı nörojenik kasılmalar üzerinde atropinin etkisi

Elektriksel alan uyarılarına başlamadan 30 dk. önce izole organ banyolarına sempatik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için sempatik ganglion blokeri olan guanetidin (10^{-6} M) ve prostoglandinlerin etkilerini ortadan kaldırmak için prostoglandin sentez inhibitörü olan indometazin (10^{-5} M) eklendi. Takiben EAU ile 2 dk ara ile değişken uyarım frekansları (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 Hz) kullanılarak kasılma yanıtları alındı. Frekans(Hz)-yanıt eğrisi alındıktan sonra ortama muskarinik reseptör antagonisti olan atropin (10^{-6} M) eklendi. Antagonist uygulanmasından 30 dk. sonra Frekans(Hz)-yanıt eğrisi tekrar alındı. Dokuların EAU'na bağlı kasılma yanıtları, dokuların kuru ağırlıkları ile orantılanarak değerlendirildi.

3.4.3.3.Ekzojen karbakol ile oluşan kasılma yanıtları

Muskarinik reseptör agonisti olan karbakolün ekzojen olarak uygulanması, izole kolon düz kaslarında kasılma yanıtlarına neden olmaktadır. Bu çalışmada karbakol 10^{-8} - 10^{-4} arasındaki molar konsantrasyonlarda kullanılarak kasılma yanıtları alındı. Dokuların kasılma yanıtları, dokuların kuru ağırlıkları ile orantılanarak değerlendirildi.

3.4.4. Kolostominin nitrerjik sistem üzerine etkisinin araştırılması

3.4.4.1.EAU ile oluşan nitrerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlar üzerine kolostominin etkisi

Elektriksel alan uyarılarına başlamadan 30 dk. önce izole organ banyolarına sempatik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için sempatik ganglion blokeri olan guanetidin (10^{-6} M), prostoglandinlerin etkilerini ortadan kaldırmak için prostoglandin sentez inhibitörü olan indometazin (10^{-5} M) ve kolinerjik sistemin etkisini ortadan kaldırmak için de muskarinik reseptör antagonisti olan atropin (10^{-6} M) eklendi. Takiben, her iki gruptan da EAU ile 2 dk ara ile değişken uyarım frekansları (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 Hz) kullanılarak nitrerjik-peptiderjik ağırlıklı kasılma yanıtları elde edildi. Dokuların EAU'na bağlı kasılma yanıtları, dokuların kuru ağırlıkları ile orantılanarak değerlendirildi.

3.4.4.2.EAU'na bağlı nörojenik kasılmalar üzerinde L-NAME'in etkisi

Elektriksel alan uyarılarına başlamadan 30 dk. önce izole organ banyolarına sempatik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için sempatik ganglion blokeri olan guanetidin (10^{-6} M) ve prostoglandinlerin etkilerini ortadan kaldırmak için prostoglandin sentez inhibitörü olan indometazin (10^{-5} M) eklendi. Takiben EAU ile 2 dk ara ile değişken uyarım frekansları (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 Hz) kullanılarak kasılma yanıtları alındı. Frekans-yanıt eğrisi alındıktan sonra ortama nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME (10^{-4} M) eklendi. İnhibitör madde uygulanmasından 30 dk. sonra Frekans-yanıt eğrisi tekrar alındı. Dokuların EAU'na bağlı kasılma yanıtları dokuların kuru ağırlıkları ile orantılanarak değerlendirildi.

3.4.4.3.Ekzojen Sodyum nitroprusiat (SNP), L-arginin ve sildenafil ile oluşan gevşeme yanıtları

Dokulardan, 40 mM KCl ile kasılmasının ardından, NO donörü olan SNP (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M), NO Prekürsörü olan L-Arginin (10^{-4} , 3×10^{-3} , 10^{-3} M) ve fosfodiesteraz inhibitörü olan sildenafil (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) kullanılarak gevşeme yanıtları alındı. Deneylerin sonunda papaverin (10^{-4} M) uygulanarak maksimal gevşeme yanıtları alındı. SNP, L-Arginin ve sildenafil aracılı gevşeme yanıtları, papaverin gevşeme yanıtlarına orantılanarak ifade edildi. Bu deney protokolü ile dokuların NO'e verdiği yanıtlar değerlendirildi.

3.4.5.Kolostominin kolinerjik ve nitrerjik sistem dışındaki sistemlere olan etkisinin araştırılması

Elektriksel alan uyarılarına başlamadan 30 dk. önce izole organ banyolarına sempatik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için sempatik ganglion blokeri olan guanetidin (10^{-6} M), prostoglandinlerin etkilerini ortadan kaldırmak için prostoglandin sentez inhibitörü olan indometazin (10^{-5} M), nitrerjik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için NOS inhibitörü olan L-NAME (10^{-4} M) ve kolinerjik sistemin etkilerini ortadan kaldırmak için de muskarinik reseptör antagonisti olan atropin (10^{-6} M) eklendi. Takiben, her iki gruptan da EAU ile 2 dk ara ile değişken uyarım frekansları (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 Hz) kullanılarak peptiderjik sistem ağırlıklı kasılma yanıtları elde edildi. Dokuların EAU'na bağlı kasılma yanıtları, dokuların kuru ağırlıkları ile orantılanarak değerlendirildi.

3.5.Deneylerde kullanılan besleyici solüsyon ve ilaçlar

Banyo solüsyonu olarak kullanılan Krebs-Henseleit çözeltisi, 118 mM NaCl; 4.7 mM KCl ; 25 mM NaHCO₃; 0.9 mM NaH₂PO₄-2H₂O; 1.26 mM CaCl₂-2H₂O; 0.54 mM MgCl-6H₂O; 11 mM Glukoz monohidrat kullanılarak hazırlandı.

40 mM KCl'lük Krebs-Henseleit çözeltisi, 82.7 mM NaCl; 40 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 0.9 mM NaH₂PO₄-2H₂O; 1.26 mM CaCl₂-2H₂O; 0.54 mM MgCl-6H₂O; 11 mM Glukoz monohidrat kullanılarak hazırlandı.

Atropin sülfat, N-Nitro-L-Arginin Metil Ester hidroklorid(L-NAME), İndometazin, Tetrodotoxin(TTX), Karbakol klorid, Guanetidin sülfat, Sodyum nitroprussiat(SNP), Sildenafil sitrat, L-arginin, papaverin Sigma Chemical Co. (St.Louis MO, ABD)'dan alınmıştır. İndometazin ve papaverin hariç kullanılan maddelerin stok çözeltileri distile suda çözülerek hazırlandı. Stok çözeltilerden dilisyonlar günlük olarak distile su ile hazırlandı. İndometazin ve papaverin, dimetilsülfoksit (DMSO)'da çözüldü. DMSO'nun deney sonuçları üzerine etkisi olmadığı saptandı.

3.6.Bulguların sunuluşu ve istatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi “SPSS for Windows 13.0” programı ile bilgisayar ortamında yapıldı. Deneysel sonuçlar, ortalama değer $\pm$ standart hata ile ifade edildi. Kontrol ve kolostomi grupları arasındaki farklılıkların test edilmesi amacı ile Mann Whitney-U testi kullanıldı. $p<0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

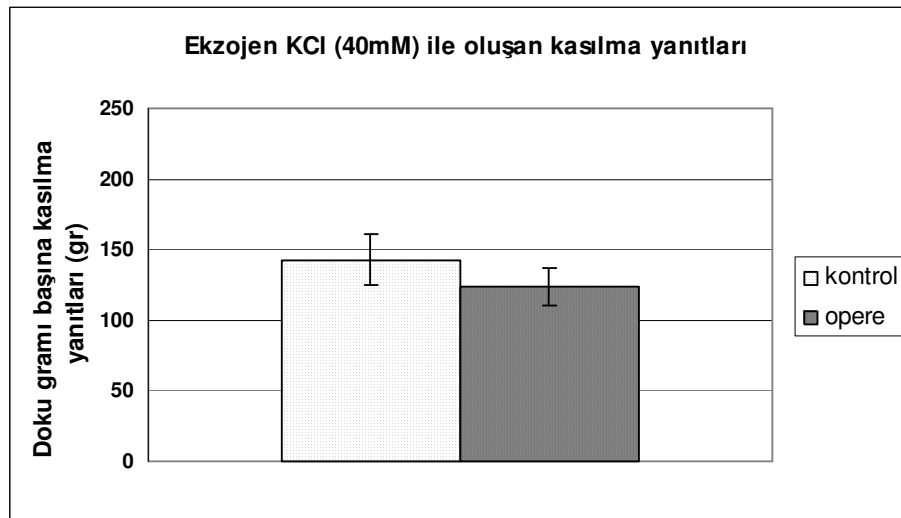
4.1. Kolostominin dokunun ağırlığı ve düz kas fonksiyonları üzerine olan etkisi

4.1.1.Kolostominin doku ağırlığı üzerine olan etkisi

Eşit boyutlarda hazırlanan sirküler sigmoid kolon preparatlarının ağırlığı opere grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$). Kontrol grubunda ortalama doku ağırlığı 0.058 ± 0.004 gr.(hayvan sayısı=8, doku sayısı=32) saptanırken, opere grupta ortalama doku ağırlığı 0.038 ± 0.003 gr.(hayvan sayısı=12, doku sayısı=48) olarak saptandı. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

4.1.2.Kolostominin 40 mM KCl ile oluşan kasılma yanıtları üzerine olan etkisi

40 mM KCl ile oluşan kasılma yanıtları doku ağırlığına orantılanılarak, doku gramı başına düşen kasılma miktarı(g) hesaplandı. 40 mM KCl ile oluşan kasılma yanıtlarında kontrol grubu (hayvan sayısı=8, doku sayısı=32) ile opere grup (hayvan sayısı=12, doku sayısı=48) arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil-8).



Şekil-8: Kontrol ve opere grupta Ekzojen 40mM KCl ile oluşan kasılma yanıtları. Kasılma yanıtları doku ağırlığına orantılanılarak ifade edilmiştir.

4.1.3.Kolostominin papaverin ile oluşan gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi

Direkt düz kas gevşeticisi olan papaverin her iki grupta da 10^{-4} M konsantrasyonda uygulandı ve 40 mM KCl ile kasılmış dokularda %100 gevşeme sağladı.

4.2.Kolostominin EAU yanıtları üzerine olan etkisi

4.2.1.EAU'nın tanımlanması:

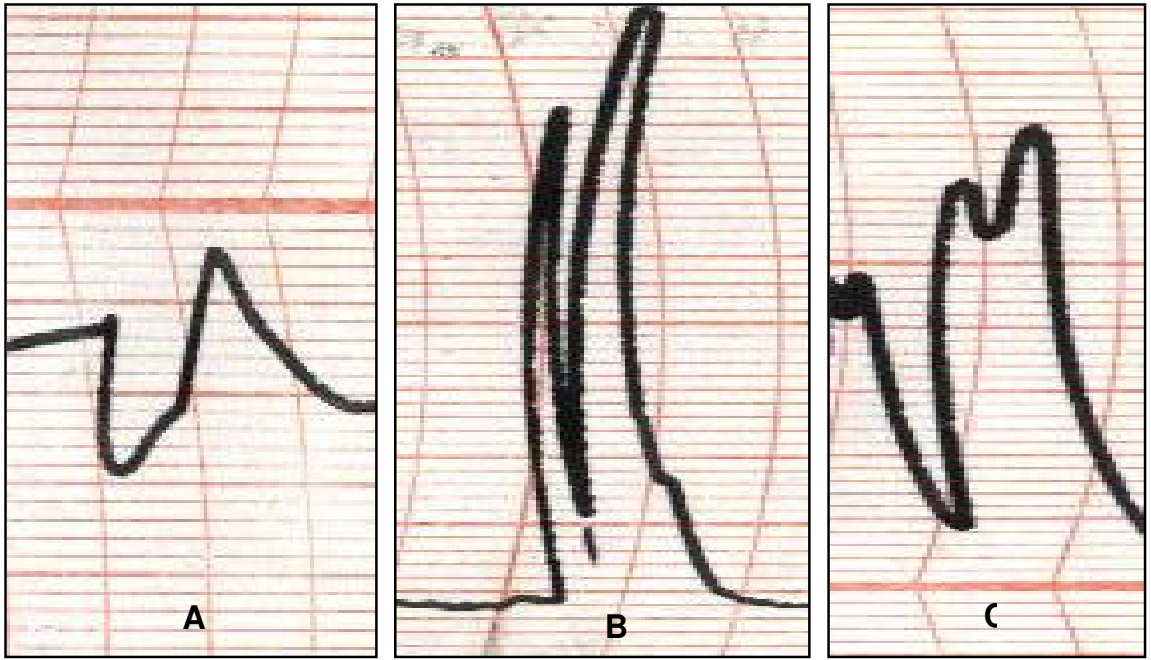
Na^+ kanal blokörü olan TTX (3×10^{-6}) EAU'na bağlı yanıtları ortadan kaldırdı.

Ön çalışmalarda dokular değişen frekans, voltaj ve sürelerde uygulanan EAU'larına bifazik ve trifazik olarak yanıt verdi.

Bifazik yanıtlar: İki şekilde bifazik yanıtlar elde edildi. Önce gevşeme sonra kasılma yanıtlarının ortaya çıktığı bifazik yanıtlarda ilk gevşeme fazından ağırlıklı olarak NO, ikinci kasılma fazından da asetilkolin sorumlu idi (şekil 9-A). Bu yanıtlar daha çok 0.5-4 Hz arasındaki düşük frekanslarda oluştu. Ayrıca çoğunlukla 32 Hz ve daha yüksek frekanslarda gevşeme yanıtlarının görölmediği bifazik kasılma yanıtları elde edildi (şekil 9-B). Bu bifazik kasılma yanıtlarının birinci fazı muskarinik reseptör antagonisti olan atropin tarafından inhibe edilirken, ikinci faz nörokinin reseptör antagonisti tarafından azaltıldı. Her iki paterndeki yanıtlarda da L-NAME kasılma yanıtlarını artırdı.

Trifazik yanıtlar: Bu yanıtlar daha çok 8 ve 16 Hz'de görüldü. Gevşeme yanıtı olan birinci faz L-NAME ile kayboldu. İkinci ve üçüncü fazlar kasılma yanıtlarıydı. İkinci faz atropin ile kaybolurken, üçüncü faz nörokinin antagonistleri ile azaldı. L-NAME ayrıca ikinci ve üçüncü fazdaki kasılma yanıtlarını artırdı (şekil 9-C).

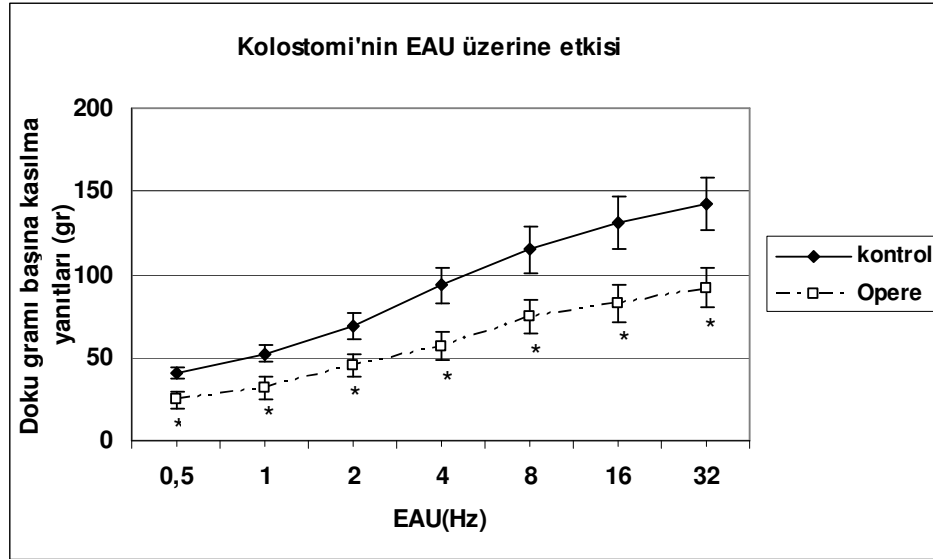
Fakat hem bifazik hem de trifazik paterndeki bu yanıtlar kontrol grubunda stabil değildi ve bütün dokularda aynı frekanslarda, aynı paternde görülmedi. Bundan dolayı bu çalışmada, kolostominin kolinerjik ve nitrerjik sistem üzerine olan etkisi muskarinik reseptör antagonisti olan atropin ve NOS inhibitörü olan L-NAME'in iki gruptaki EAU ile oluşan kasılma yanıtları üzerine olan etkileri karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil-9: Tavşan izole kolon sirküler düz kasından EAU ile elde edilen (A)bifazik gevşeme ve kasılma, (B)bifazik kasılma, (C)trifazik yanıtlar.

4.2.2.Kolostominin EAU yanıtları üzerine etkisi

Kontrol grubu ile opere grup karşılaştırıldığında EAU'na bağlı kasılma yanıtları bütün frekanslarda (0,5- 32 Hz) anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$) (Şekil-10, Tablo-3).

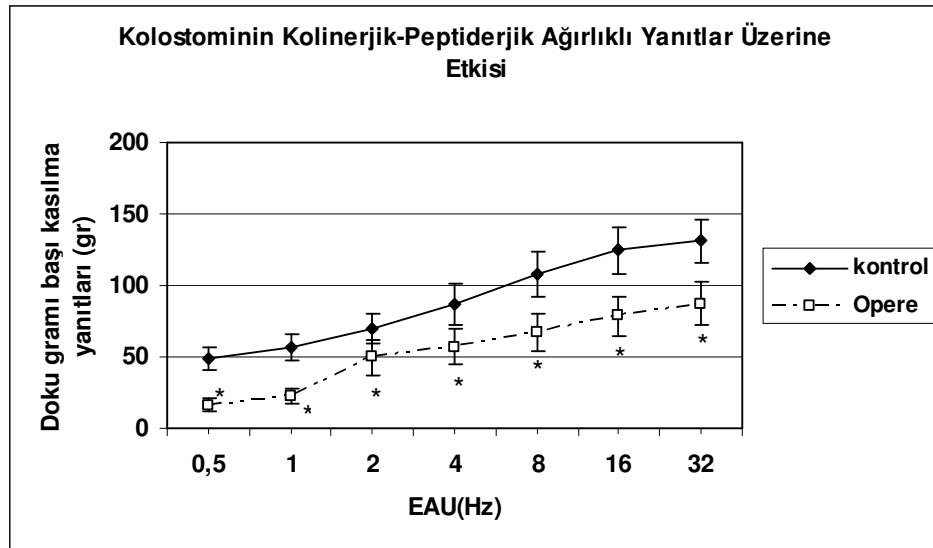


Şekil-10: EAU ile oluşan kasılma yanıtlarına (0,5-32 Hz) kolostominin etkisi. Deneyler guanetidin (10^{-6} M) ve indometazin (10^{-5} M)'li ortamda yapılmıştır. Yanıtlar doku ağırlığına orantılanılarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10) ,* $p<0,05$

4.3.Kolostominin kolinerjik sistem üzerine etkisi

4.3.1.EAU ile oluşan kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlar üzerine kolostominin etkisi

Kontrol grubu ile opere grup karşılaştırıldığında EAU'na bağlı kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtların tamamı bütün frekanslarda (0,5- 32 Hz) anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$) (Şekil-11, Tablo-3).



Şekil-11: EAU ile oluşan kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlara (0,5-32 Hz) kolostominin etkisi. Deneyler guanetidin (10^{-6} M), indometazin (10^{-5} M) ve L-NAME (3×10^{-4} M)'li ortamda yapılmıştır. Yanıtlar doku ağırlığına orantılanılarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10) ,* $p<0,05$

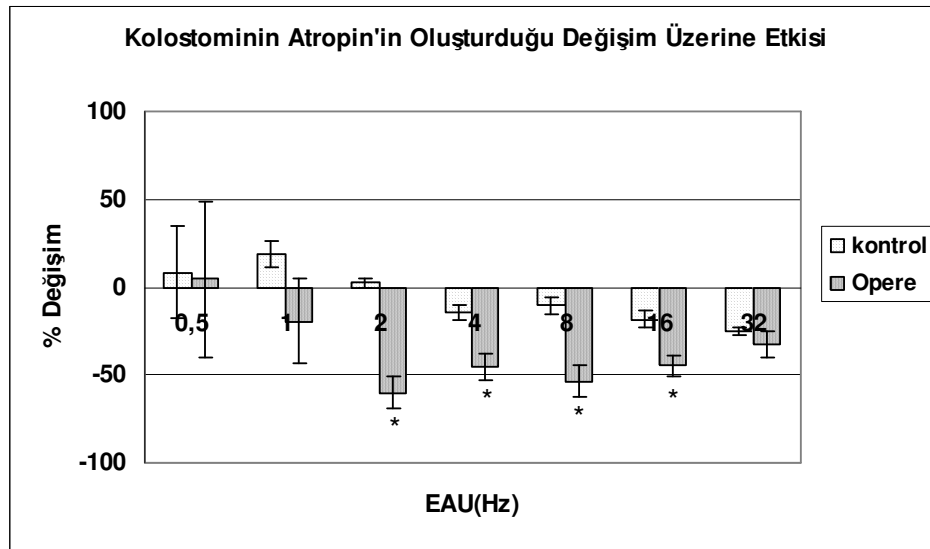
		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz	4 Hz	8 Hz	16 Hz	32 Hz
EAU'na bağı nörojenik kasılmalar	kontrol/opere	40,28/24,35	52,42/32,05	69,08/45,62	93,53/56,82	114,79/74,70	131,11/82,89	142,48/91,73
	% değişim	-39,55	-38,86	-33,96	-39,25	-34,92	-36,78	-35,62
EAU ile oluşan nitrejik-peptiderjik ağırlıklı kasılma yanıtları	kontrol/opere	44,75/12,03	70,63/15,33	80,69/18,55	88,9/26,43	98,77/39,13	115,29/56,47	121,77,16
	% değişim	-73,12	-78,30	-77,01	-70,27	-60,38	-51,02	-36,23
EAU ile oluşan kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı kasılma yanıtları	kontrol/opere	48,72/16,37	56,98/22,57	69,95/49,36	86,88/57,17	108,35/66,97	124,36/78,79	131,03/87,44
	% değişim	-66,40	-60,39	-29,44	-34,20	-38,19	-36,64	-33,27
EAU ile oluşan peptiderjik sistem ağırlıklı kasılma yanıtları	kontrol/opere	57,06/5,50	72,19/14,67	86,28/23,71	98,85/33,68	108,05/47,96	114,37/60,02	119,63/77,19
	% değişim	-90,36	-79,68	-72,52	-65,93	-55,61	-47,52	-35,48

Tablo-3: Kontrol grubunda ve opere grupta EAU(0.5-32 Hz)'na bağı oluşan kasılma yanıtları (gr) ve kolostominin bu yanıtlarda oluşturduğu değişimin yüzdesi.

4.3.2. Atropin'in EAU'na bağı kasılma yanıtları üzerine yaptığı değişimlere

kolostominin etkisi

Atropin kontrol grubunda 4 Hz'den itibaren yüksek frekanslarda EAU'na bağı kasılma yanıtlarını azaltmıştır. Opere grupta ise atropin, EAU'na bağı kasılma yanıtlarını 2 Hz'den itibaren azaltmıştır. Atropinin azaltıcı etkisi opere grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazlaydı($p<0,05$) (şekil-12).

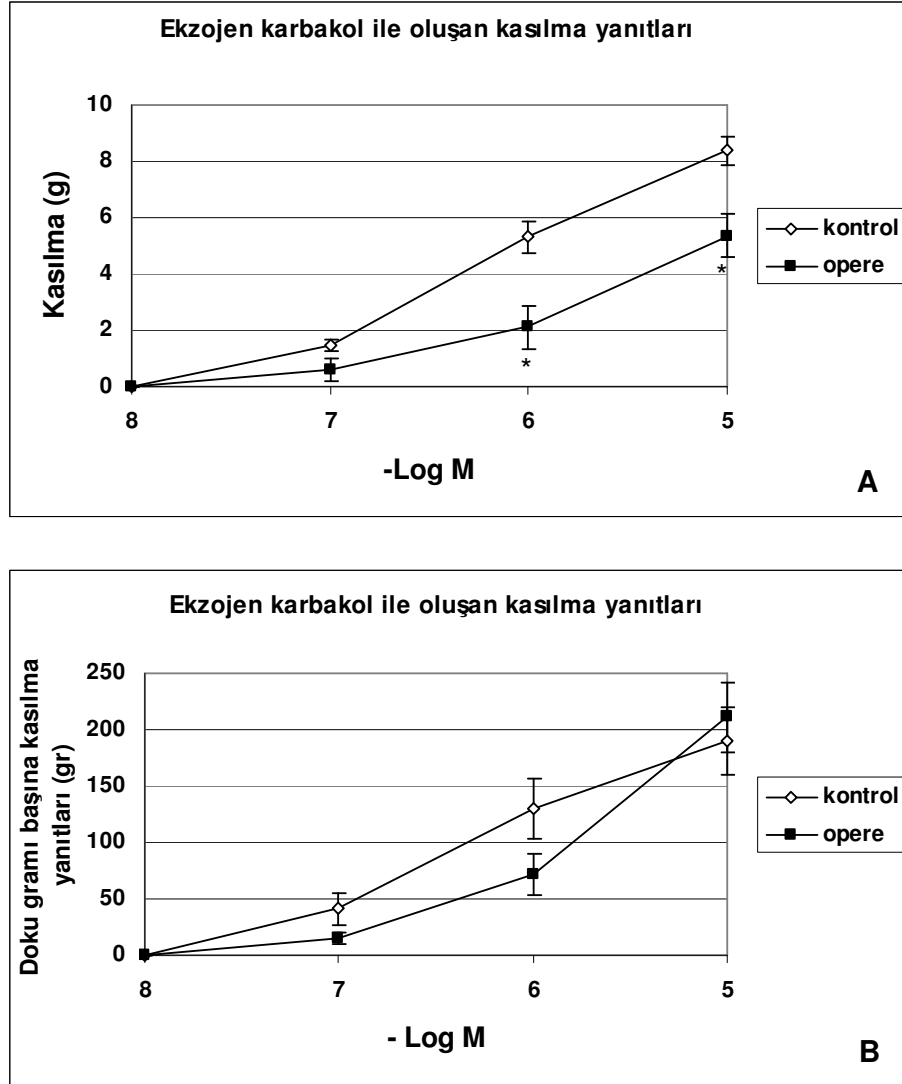


Şekil-12: Atropin(10^{-6} M)'in EAU'na bağı kasılma yanıtları üzerine yaptığı değişikliğe kolostominin etkisi. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10) ,* $p<0,05$

4.3.3. Kolostominin Karbakol ile oluşan kasılma yanıtları üzerine olan etkisi

Karbakol ile oluşan kasılma yanıtları gram olarak opere grupta ($n=10$), kontrol grubuna ($n=8$) göre anlamlı olarak azaldı($p<0,05$) (Şekil-13 a). Karbakol ile oluşan kasılma yanıtları doku ağırlığına orantılandığında maksimal etki (E_{max}) açısından iki grup arasında

fark olmadığı saptandı. Fakat 10^{-7} ve 10^{-6} M gibi düşük konsantrasyonlarda opere grupta kontrol grubuna göre kasılma yanıtlarında azalma görüldü (Şekil-13 b).

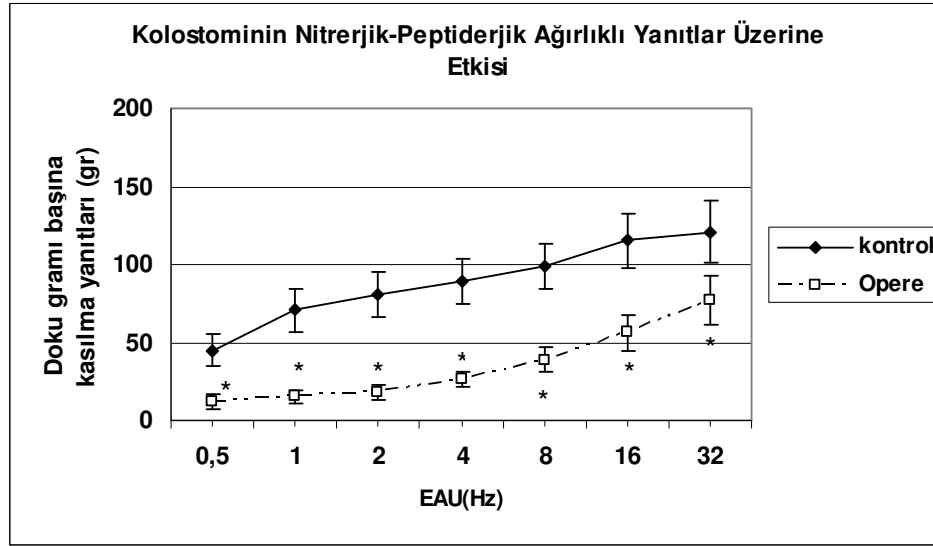


Şekil-13: Kolostominin ekzojen karbakol ile oluşan kasılma yanıtlarına etkisi. Ekzojen karbakol yanıtları (A) gram olarak ve (B) doku ağırlığına orantılanılarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), * $p<0,05$.

4.4.Kolostominin nitrerjik sistem üzerine etkisi

4.4.1.EAU ile oluşan nitrerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlar üzerine kolostominin etkisi

Kontrol grubu ile opere grup karşılaştırıldığında EAU'na bağlı nitrerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtların tamamı bütün frekanslarda (0,5- 32 Hz) anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$) (Şekil-14, Tablo-3).

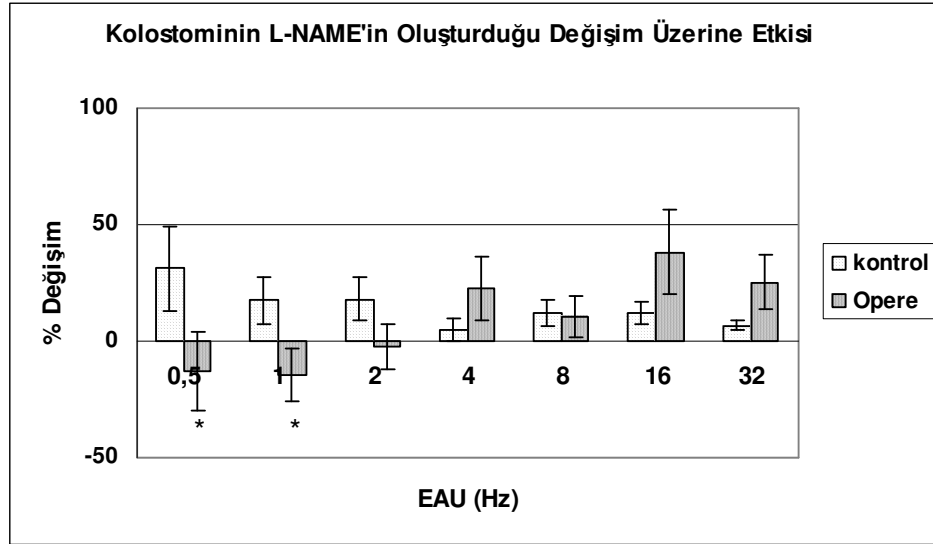


Şekil-14: EAU ile oluşan nitrerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlara (0,5-32 Hz) kolostominin etkisi. Deneyler guanetidin (10^{-6} M), indometazin (10^{-5} M) ve atropin (10^{-6} M)'li ortamda yapılmıştır. Yanıtlar doku ağırlığına orantılanılarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10) ,* $p<0,05$

4.4.2.L-NAME'in EAU'na bağı kasılma yanıtları üzerine yaptığı değişimlere

kolostominin etkisi

L-NAME, kontrol grubunda EAU'na bağı kasılma yanıtlarını arttırmıştır. Opere grupta ise düşük frekanslarda (0,5- 2 Hz) L-NAME'in etkisi ortaya çıkmamıştır (Şekil-15).



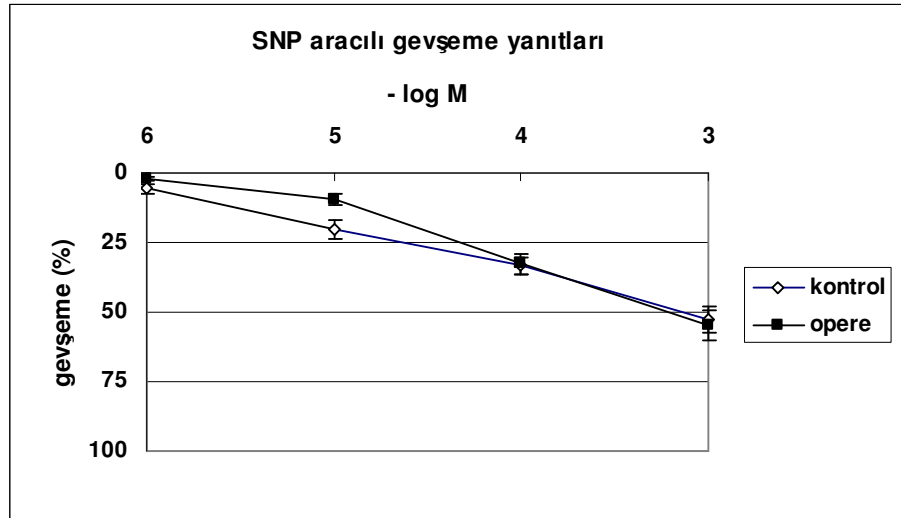
Şekil-15: L-NAME(3×10^{-4} M)'in EAU'na bağı kasılma yanıtları üzerine yaptığı değişikliğe kolostominin etkisi. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), * $p < 0,05$

4.4.3.Kolostominin gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi

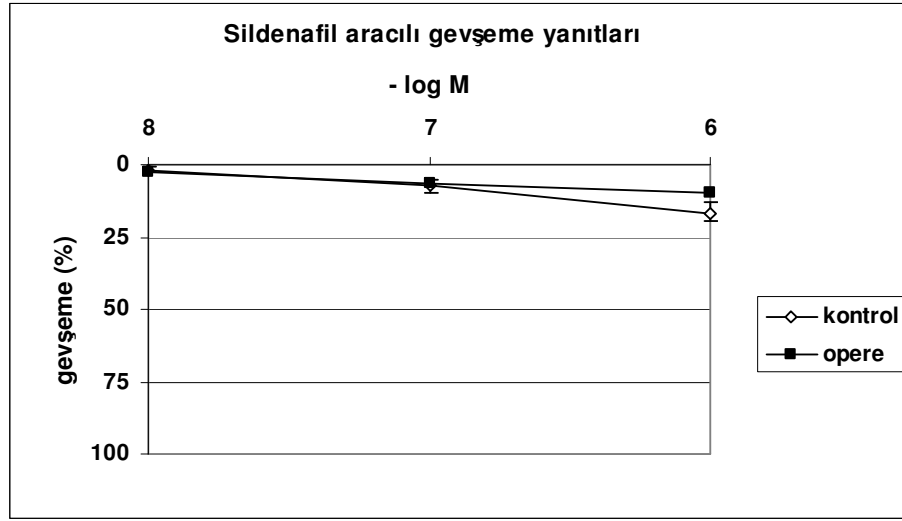
Dokular 40 mM KCl ile kasılıp stabilize olduktan sonra gevşeme yanıtları alındı. Papaverin (10^{-4} M) ile dokuların maksimal gevşeme yanıtları saptandı ve gevşeme yanıtları papaverin gevşeme yanıtlarına orantılanılarak ifade edildi.

Kontrol grubunda SNP'nin E_{max} 'ı $52,67 \pm 4.61$, sildenafilin E_{max} 'ı $16,63 \pm 3.06$, L-Argininin E_{max} 'ı $6,16 \pm 1,88$ olarak saptandı.

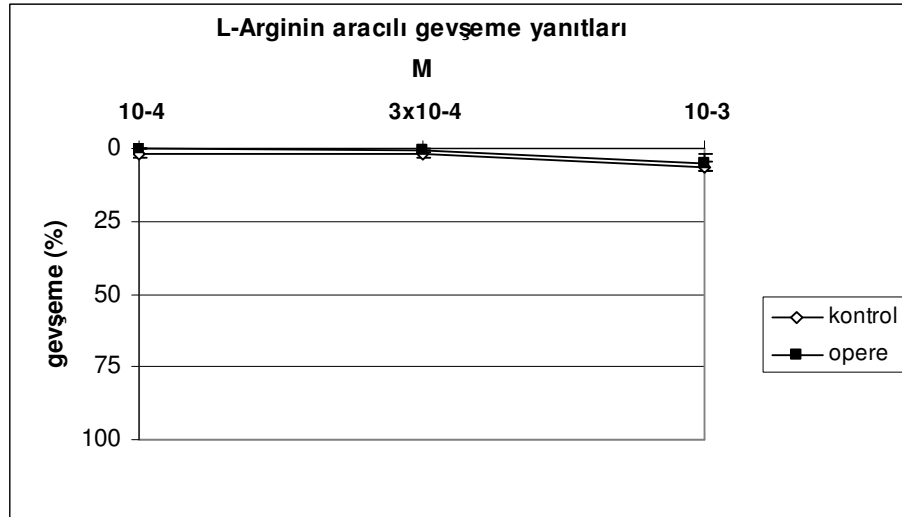
SNP ile oluşan gevşeme yanıtlarında yüksek konsantrasyonlarda (10^{-4} ve 10^{-3} M) kontrol grubu (n=8) ile opere grubu (n=10) arasında fark saptanmadı. Her iki grupta da SNP'nin oluşturduğu maksimal etkide fark yoktu. Düşük konsantrasyonlarda (10^{-6} ve 10^{-5} M) opere grupta kontrol grubuna göre gevşeme yanıtlarında azalma eğilimi olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil-16). Sildenafil ve L-Arginin ile oluşan gevşeme yanıtlarında her iki grup arasında fark saptanmadı (Şekil-17 ve 18).



Şekil-16: Kolostominin ekzojen SNP ile oluşan gevşeme yanıtlarına etkisi. Gevşeme yanıtları 40mM KCl ile kasılan dokulardan alınmış ve papaverin gevşeme yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10).



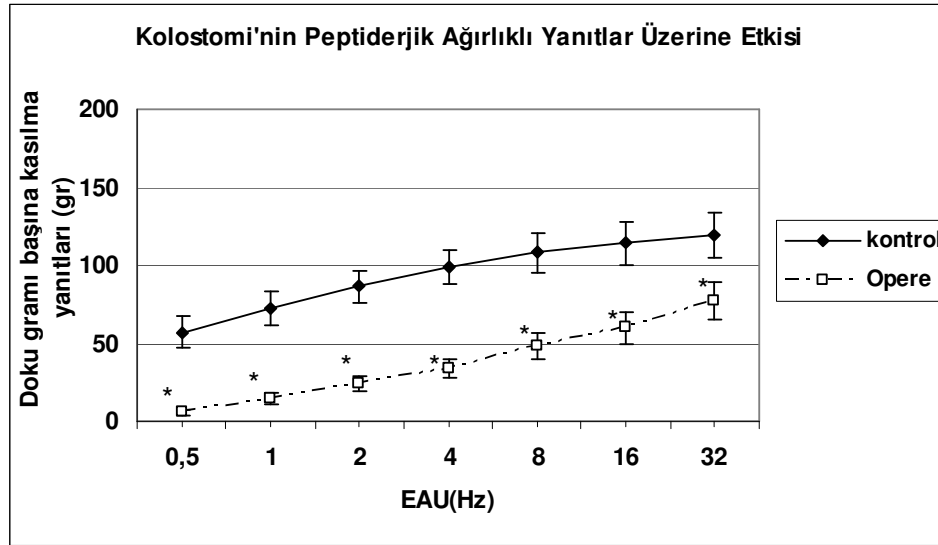
Şekil-17: Kolostominin ekzojen sildenafil ile oluşan gevşeme yanıtlarına etkisi. Gevşeme yanıtları 40mM KCl ile kasılan dokulardan alınmış ve papaverin gevşeme yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10).



Şekil-18: Kolostominin ekzojen L-Arginin ile oluşan gevşeme yanıtlarına etkisi. Gevşeme yanıtları 40mM KCl ile kasılan dokulardan alınmış ve papaverin gevşeme yanıtlarının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10).

4.5.Kolostominin kolinerjik ve nitrerjik sistem dışındaki sistemlere olan etkisi

Kontrol grubu ile opere grup karşılaştırıldığında EAU'na bağlı kolinerjik ve nitrerjik sistem dışı yanıtlar, bir başka deyişle peptiderjik ağırlıklı kasılma yanıtlarının tamamı bütün frekanslarda (0,5- 32 Hz) anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$) (Şekil-19, Tablo-3).



Şekil-19: EAU ile oluşan peptiderjik ağırlıklı kasılma yanıtlarına (0,5-32 Hz) kolostominin etkisi. Deneyler guanetidin (10^{-6} M), indometazin (10^{-5} M), atropin (10^{-6} M) ve L-NAME (3×10^{-4} M)'li ortamda yapılmıştır. Yanıtlar doku ağırlığına orantılanılarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), opere grup (hayvan sayısı=6, doku sayısı=10), * $p<0,05$

5.TARTIŞMA

Özellikle konjenital nedenlerle yaşamın erken dönemlerinde yapılmış geçici kolostomiler kapatılırken, kolostominin distalinde kalan barsak segmentinin, proksimal segmentlerden çap ve duvar kalınlığı açısından farklı olduğu gözlenir. Buradan hareketle, atrofiye giden distal barsak segmentlerindeki, kas yapılarının fonksiyonları ve motilitesinde herhangi bir değişiklik olup olmadığını, geçici kolostominin motiliteden sorumlu yolakları ve kas yapılarının fonksiyonlarını ne şekilde etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Deneylerde kullanılmak üzere aynı boyutlarda hazırlanmış olan sirküler düz kas striplerinin ağırlıkları, deneylerden sonra kurutularak hassas bir terazi yardımı ile ölçülerek kaydedildi. Kolostomi yapılan gruptaki dokuların kuru ağırlığının, kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük olduğu saptandı. Ortalama doku ağırlığı kontrol grubunda $0,058 \pm 0,004$ iken, kolostomi yapılan grupta $0,038 \pm 0,003$ olarak hesaplandı. İki grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Bizim bu bulgularımız, literatürde kolostominin distalinde fonksiyon dışı kalan barsak segmentinde atrofi oluştuğunu gösteren çeşitli çalışmalarla da desteklenmektedir(2,9,20,21,22).

Çalışmamızda, kolostominin distalinde oluşan atrofinin, düz kasların kasılabilirliği ve gevşeyebilirliği üzerine bir etkisi olup olmadığına bakıldı. Yüksek konsantrasyonda K^+ uygulanması hücrelerin depolarize olmasını sağlayarak voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarının açılmasına neden olmaktadır. Hücre dışından, voltaj bağımlı Ca^{++} kanalları vasıtasıyla hücre içine giren kalsiyum, dokuda kasılma yanıtı ortaya çıkarır. Bu şekilde ekzojen KCl (40mM) verilerek oluşturulan kasılma yanıtları doku ağırlığına orantılanılarak hesaplandı. Kontrol grubu ile opere grup arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil-8).

Papaverin ise, direkt etkisiyle bütün düz kasları gevşetir. Diğer düz kas gevşeticilerinin etkinlikleri, farmakolojik deneylerde papaverininki ile kıyaslanmak suretiyle belirlenir. İlaçların bir reseptörü etkilemeksizin oluşturdukları düz kas gevşetici etkiye papaverin benzeri etki denir. Papaverinin düz kas hücreleri üzerindeki gevşetici etkisinin fosfodiesteraz enzimini inhibe etmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu etki ile cAMP'nin inaktivasyonu azalır ve cAMP miktarı artar ve düz kas hücrelerinde gevşeme oluşur(7). Çalışmamızda, ekzojen papaverin (10^{-4} M) ile her iki gruptaki düz kas stripleri de %100 oranında gevşediler. Elde ettiğimiz bu bulgular, kolostomi distalindeki kalın barsaklarda oluşan makroskopik atrofinin, distalde kalan barsakların düz kaslarının kasılabilirliği ve gevşeyebilirliği üzerine etkisinin olmadığını göstermektedir.

Ön çalışmalarda; opere grupta kolostominin distalinden ve kontrol grubunda aynı distal kolon segmentlerinden hazırlanan sirküler düz kas stripleri, EAU'na bifazik ve trifazik yanıtlar verdi. Genellikle 0,5-4 Hz arasındaki frekanslarda görülen bifazik yanıtta, ilk fazından ağırlıklı olarak NO'nin sorumlu olduğu gevşeme ve ikinci fazından asetilkolinin sorumlu olduğu kasılma yanıtı izlendi (Şekil-9A). Ayrıca çoğunlukla 32 Hz ve daha yüksek frekanslarda gevşeme yanıtlarının olmadığı, iki kasılma yanıtının ardı ardına görüldüğü bifazik kasılma yanıtı saptandı. Bu kasılma yanıtlarının birinci fazından kolinerjik sistem, ikinci fazından peptiderjik sistem sorumluydu (Şekil-9B). Trifazik yanıtlar ise daha çok 8-16 Hz aralığında görülen; nitrejik sistemin sorumlu olduğu gevşeme, kolinerjik sistemin ekili olduğu kasılma ve peptiderjik sistemin etkili olduğu ikinci bir kasılma yanıtından oluştuğu izlendi (Şekil-9C). Tüm yanıtlardaki kasılma yanıtlarının L-NAME ile arttığı izlendi. Bu sonuç EAU ile oluşan bütün fazlarda NO'nin salıverildiğini düşündürmektedir. EAU ile oluşan

tüm bu yanıtlar Na^+ kanal blokörü olan tetrodotoxin(TTX) ile tamamen kaybolmuştur. EAU ile oluşan yanıtların TTX ile kaybolması, yanıtların nörojenik kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Daha önceleri kolon sirküler düz kasları ile ilgili yapılan ve benzer invitro yöntemlerin kullanıldığı insan ve hayvan deneylerinde çeşitli fazik yanıtlar elde edilmiştir. Tomita ve ark.(38)'nin çalışmasında EAU'na insan sirküler düz kas striplerinin; %75'inin önce gevşeme sonra kasılmanın izlendiği bifazik yanıt, %25'inin ise monofazik kasılma yanıtı verdiği saptanmış. Bu çalışmada EAU standart olarak 5 Hz ile verilmiş olup oluşan bifazik yanıt çalışmamızdaki 0,5 – 4 Hz arasında elde ettiğimiz yanıtı uymaktadır. Axelrod ve ark.(3) deneylerinde yenidoğan, juvenil ve yetişkin tavşanları kullanmış olup düşük frekanslardaki EAU'na yine aynı şekilde önce gevşemenin sonra kasılmanın izlediği bifazik yanıtlar almışlardır. Aynı çalışmada 32 – 64 Hz gibi yüksek frekanslarda çalışmamızda elde ettiğimiz şekilde bifazik kasılma yanıtları elde edilmiştir. Çiftçi ve ark.(10)'nin yaptıkları insan çalışmasında da yüksek frekanslarda benzer şekilde bifazik kasılma yanıtları elde edilmiştir. Snape ve ark.(36)'nin tavşanlarda yapılan ve tüm EAU'nın 8 Hz ten verildiği çalışmasında, tüm segmentlerdeki sirküler düz kas striplerinden, önce gevşemenin ve onun ardından iki adet kasılma yanıtının görüldüğü trifazik yanıtların kaydedildiği bildirilmiştir. Bu trifazik yanıt çalışmamızda 8 – 16 Hz'te elde ettiğimiz trifazik yanıtı uymaktadır.

Çalışmamızda, elektriksel alan uyarılarına alınan yanıtların stabil olmaması nedeni ile, kolostominin kolinerjik ve nitreerjik sistem üzerine olan etkisi muskarinik reseptör antagonisti olan atropin ve NOS inhibitörü olan L-NAME'in kontrol grubu ve kolostomi yapılmış olan opere gruptaki, EAU ile oluşan kasılma yanıtları üzerine olan etkileri karşılaştırılarak

değerlendirildi. Literatürdeki birçok çalışmada sistemlerdeki değişiklikler bu şekilde inhibitörlerin veya antagonistlerin etkisi ile araştırılmıştır(3,8,10,23,24,27,37).

Opere gruptan ve kontrol grubundan elde edilen izole kolon sirküler düz kas striplerine, sempatik sistemin ve prostoglandinlerin etkilerini ortadan kaldırmak için ortama, guanetidin (10^{-6} M) ve indometazin (10^{-5} M) eklendi ve değişik frekanslarda (0,5–32 Hz) EAU uygulandı. İki grup karşılaştırıldığında, EAU'na bağlı kasılma yanıtlarının bütün frekanslarda anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil-10,Tablo-3). EAU çalışmaları daha sonra L-NAME (3×10^{-4} M)'li ortamda yapılıp kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlar, atropin (10^{-6} M)'li ortamda yapılıp nitrejik-peptiderjik ağırlıklı yanıtlar ve L-NAME ile birlikte atropinli ortamda yapılıp peptiderjik ağırlıklı yanıtlar elde edildi. Bu çalışmalarda ayrıca, ortama atropin veya L-NAME eklenmesi sonucunda EAU aracılı yanıtlarında oluşan değişiklikler de her iki grupta ayrı ayrı hesaplandı.

Kolostominin kolinerjik sistem üzerine olan etkisine bakıldığında; kontrol grubu ile opere grup karşılaştırıldığında EAU'na bağlı kolinerjik-peptiderjik ağırlıklı yanıtların tamamı bütün frekanslarda anlamlı olarak azalmıştır (Şekil-11,Tablo-3). Atropinin EAU'na bağlı kasılma yanıtları üzerine yaptığı değişimlere kolostominin etkisi değerlendirildiğinde ise, atropinin azaltıcı etkisinin opere grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü (Şekil-12).Atropinin etkisindeki bu artış kolinerjik sinir uçlarından sinaptik aralığa asetilkolin salıverilmesinde azalma olduğunu düşündürmektedir. Atropin muskarinik reseptörlere bağlanmak için asetilkolin ile yarışır, bir başka deyişle kompetitif antagonisttir, dolayısıyla ortamda asetilkolin miktarının azalması, atropinin etkisini arttırır. Bu etki 2–16 Hz frekansları arasında görüldü. Bu aralık, literatürde EAU ile oluşan ve atropin ile kaybolan

kasılma yanıtlarının görüldüğü frekanslar olan 8 Hz (36), 2–16 Hz (3) ve 5 Hz frekansları (8,38) ile uyumludur.

Kolinerjik sisteme dair son olarak da, ekzojen karbakol ile oluşan yanıtlarla postsinaptik etki değerlendirilmiştir. Bu yanıtlar gram olarak ifade edildiğinde, opere grupta kontrol grubuna göre daha az bulundu. Ancak bulunan sonuçlar doku ağırlığı ile orantılandığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil-13). Bu farkın, doku ağırlığındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünüldü. Bu bulgular postsinaptik membranda değişikliğin olmadığını, EAU'na bağlı kasılma yanıtlarındaki azalmanın presinaptik uçtan asetilkolin salıverilmesindeki bozulmadan kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu bulgularımızın doğruluğunu daha kesin olarak ispatlayabilmek için radyoimmünolojik yöntemlerle kolostomi distalindeki kolinerjik sinir uçlarından asetilkolin salıverilmesindeki değişikliklerin daha detaylı olarak incelenmesine ihtiyaç vardır.

Kolostominin nitretrjik sistem üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde ise; nitretrjik-peptiderjik ağırlıklı kasılma yanıtlarının tüm frekanslarda belirgin olarak azaldığı izlendi. Opere grupta, 0.5-2 Hz'te L-NAME'in, NO sentezini inhibe ederek oluşturması beklenen, kasılmayı artırıcı etkisi ortaya çıkmamıştır (Şekil-15). Ekzojen SNP, sildenafil, L-arginin ile oluşan gevşeme yanıtlarında her iki grup arasında fark saptanmamıştır. Bu bulgular, nitretrjik sistemde postsinaptik membranda bir değişikliğin olmadığını, dokunun NO'e cevap verebildiğini fakat, NO'in presinaptik sinir uçlarından salıverilmesinde bir azalma olduğunu göstermektedir.

Chaudhury ve ark.(9) kolostomi yaptıktan 45 gün sonra, ratların kolostomi distalinde kalan barsak segmentlerini immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir. NADPH diaphoraz

pozitif olan myenterik pleksus hücrelerinin yani; nitreerjik sistem nöronlarının atrofiye olduğunu saptamışlardır. Nitreerjik sistem aracılığı ile oluşan gevşeme yanıtları daha çok düşük frekanslarda etkili olup, bu gevşeme yanıtları yüksek frekanslarda ya kaybolmakta(3) ya da kasılma yanıtlarına nazaran daha etkisiz kalmaktadır(10). Biz de çalışmamızda, NO'in daha fazla etkili olduğu düşük frekanslarda, opere grupta L-NAME'in, EAU'na bağlı kasılma yanıtlarının amplitüdlerini arttırmadığını saptadık. Bu bulgu, nitreerjik nöronlardan NO'in presinaptik salıverilmesinde bir azalma olduğunu göstermektedir.

Gevşeme yanıtlarında papaverin ile oluşan yanıtlarla karşılaştırıldığında, SNP ile sirküler düz kas striplerinde tam bir gevşeme oluşmamıştır. Bu durum, sistemde bir başka gevşetici nörotransmitter varlığını düşündürmektedir. Literatürdeki çalışmalarda da NO dışında olası bir başka gevşetici ajanın varlığından söz edilmektedir(10,36). Axelrod ve ark.(3) NO'nun yanında etkili olması muhtemel gevşetici nörotransmitterin vazodilatör intestinal polipeptid (VIP) olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, ATP'nin de P2Y reseptörleri üzerinden etki ederek NO'in nöronal salıverilmesini arttırdığı gösterilmiştir(40).

Peptiderjik ağırlıklı EAU yanıtları, iki grup karşılaştırıldığında tüm frekanslarda anlamlı olarak azalmıştır (Şekil-19,Tablo-3). Çeşitli çalışmalarda atropin insensitif kasılma yanıtlarından ağırlıklı olarak nörokininlerin, substance P'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir(36,37). Çalışmamızda da, EAU ile 8-16 Hz frekans aralığında elde edilen trifazik yanıtların ve 32 Hz ve üzerindeki frekanslarda elde edilen bifazik kasılma yanıtlarının her ikisinde de ikinci kasılma fazı nörokinin antagonistleri ile inhibe olmuştur. Peptiderjik ağırlıklı yanıtların bozulması kolostominin distal barsaktaki peptiderjik aşınımı da etkilediğini göstermektedir.

Literatürde, kolostominin distaldeki fonksiyon dışı kalan barsak segmenti üzerindeki etkilerini fonksiyonel olarak invitro yöntem ile araştıran bir tek çalışma vardır(42). Bu çalışmada fonksiyon dışı kalan barsak farmakolojik ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Farmakolojik incelemede kolostomi distalinden ve proksimalden alınan örnekler karşılaştırılmıştır. Her iki segmentte sadece 10 Hz'de EAU'na verilen yanıtların amplitüdleri karşılaştırılmış olup, değişik parametrelerle EAU ve inhibitörler ile çalışmalar yapılmamıştır. Ayrıca histopatolojik olarak myenterik pleksusun boyutu değerlendirilirken, bu parametre myenterik plexus boyutunun muskularis propria kalınlığına oranı şeklinde belirtilmiştir. Bu çalışmada distal ve proksimal segmentler arasında bakılan farmakolojik ve histopatolojik parametreler arasında fark bulunmadığı belirtilmiştir. Fakat farmakolojik sonuçların; hastaların yaşlarının genellikle ileri olması, yaşların ve primer hastalıkların heterojen olması, farmakolojik değerlendirmenin kolostominin distali ile proksimali arasında yapılması ve deneyin tek parametre ile yapılması nedeniyle etkilenebileceği düşünülmüştür. Literatürdeki çalışmalarda distal ve proksimal kolonun EAU'na değişik şekillerde yanıtlar verdiği gösterilmiştir(3,36). Ayrıca, hastalara yapılan kolostomilerin bir kısmının tam bir diversiyon sağlamıyor olması da hem farmakolojik hem de histopatolojik sonuçları etkileyebileceği düşünülmüştür. Histopatolojik çalışmada ise, myenterik plexus boyutunun farklı çıkmamasının hesaplamada; myenterik plexus boyutunun, atrofiye olan muskularis proprianın kalınlığı ile orantılanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Chaudhury ve ark.(9)'nın kolostomi yaptıkları ratların distal segmentlerini, kontrol grubunun aynı segmentleriyle karşılaştırdıkları çalışmalarında; myenterik nöronların volümlerinin ve nöron

nukleus çaplarının belirgin olarak azaldığını, ayrıca myenterik pleksustaki nitrerjik nöronlarda belirgin atrofi oluştuğunu saptamışlardır.

Anorektal malformasyonlar ve Hirschsprung hastalığı, çocuk cerrahisi pratiğinde kolostominin kullanıldığı durumların çoğunu oluşturmaktadır. Bu hastalıklarda uygulanan cerrahi tedavinin sonuçları distal kolonun motilitesinden etkilenmektedir (4,19,25,29,30,44,45,46). Kolostominin kapatılmasını takiben enterokolit ve dışkılama bozukluklarına sıkça rastlanmaktadır. Anorektal malformasyonlu hastalarda, özellikle de yüksek tip anomalilerde kolostomi kapatıldıktan sonra cerrahi tedavinin başarısı dışkı kontrolü ile değerlendirilmektedir. Anorektal malformasyonlu hastaların dışkılama düzeninin ve dışkı kontrolünün, kolonik motiliteyle yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir(19,29,46). Hirschsprung hastalığında ise, kolostomi kapatıldıktan sonra oluşan dışkılama ve dışkı kontrol bozukluklarının, internal anal sfinkter disfonksiyonuna bağlı olduğu kadar, kolondaki dismotilitenin de buna etkisi olabileceği ifade edilmiştir(4,44,45). Pena ve Levitt(30) Hirschsprung hastalığında, kolostomi kapatılmasının ardından ve sıklıkla ilk iki yılda görülen enterokolitin staz sonucu oluştuğunu ve bunun da normogangliyonik barsakta görülen motilite bozukluğundan kaynaklandığı bildirmişlerdir. Menezes ve Puri(25)'de stazın enterokoliti arttırdığını ve dışkılama bozukluğu olan hastalarda enterokolit sıklığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hirschsprung hastalığındaki enterokolitin etyolojisinde, kolonda oluşan stazın etkili olduğunu ve sıklıkla enterokolitin kolostomi kapatılmasından sonraki ilk iki yıl içinde görüldüğünü bildiren başka yazarlarda olmuştur(13,41). Fakat, kolostomi kapatıldıktan sonra görülen bu stazın nedeni tam olarak ortaya koyulamamıştır. Enterokolitin ve stazın, özellikle ameliyattan sonraki ilk yıllar içinde oluşup, daha sonraki yıllarda azalması kolonda geçici bir

motilite bozukluğu olabileceğini akla getirmektedir. Son yıllarda artan sıklıkla uygulanan tek evreli ameliyatlardan sonra, hastaların dışkılama özelliklerinin ve kolon motilitesinin daha iyi olduğunu ve ameliyat sonrası meydana gelen enterokolitin daha az görüldüğünü bildiren yayınlarda vardır(35,44).

Sonuçta, kolostominin distalinde kalan barsak segmentinde makroskopik olarak atrofi oluşmasına rağmen, kolon sirküler düz kaslarının kasılabilirliği ve gevşeyebilirliği değişmemektedir. Ancak kolostominin distalindeki kolonda, presinaptik uçtan sinir uyarımına bağlı asetilkolin, nitrik oksit ve nöropeptidler gibi nörotransmitterlerin salıverilmesinin azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla her ne kadar kolonun düz kas yapısı kolostomi açılmasından etkilenmemekte ise de kolonda nörotransmisyon bozulduğu için kolostominin distalindeki kolonda motilite bozukluğu olmaktadır. Ancak bu çalışmamızda gösterdiğimiz motilite bozukluğunun, düzelip düzelmediği, düzeliyorsa da ne kadar zaman içinde normale döndüğünü araştırmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.ÖZET

Kolostomi, çocuk ve yetişkinlerde birçok hastalığın tedavisi sırasında geçici veya kalıcı olarak kullanılan bir cerrahi yöntemdir. Çocuklarda Hirschsprung hastalığı ve anorektal malformasyon gibi konjenital hastalıkların tedavisinde çok evreli ameliyatlara ilk aşaması olarak, kolorektal ameliyatlardan sonrasında anastomoz kaçağını engellemek amacıyla veya gecikmiş kolon perforasyonu gibi durumlarda acil şartlarda kullanılabilir. Çocuklarda genellikle geçici bir süre için kullanılan kolostominin distalindeki fonksiyon dışı kalan segmentlerde motiliteyi etkileyen yollarda herhangi bir değişikliğin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada, kolostominin distalinde bir süre işlev dışı kalan barsak segmentindeki kolinerjik ve nitrejik sistemler fonksiyonel olarak invitro yöntem ile incelendi.

Bu çalışmada ağırlıkları 2000-2500 gr arasında değişen 20 adet erkek Yeni-Zelanda Albino tavşan kullanıldı. Tavşanlara iki aylık genel anestezi altında steril şartlarda sigmoid kolostomi yapıldı ve distal uç Hartmann poşu şeklinde karına bırakıldı. İki aylık bekleme süresini takiben kolostomi yapılan tavşanlar, barsak segmentleri invitro deneylerde kullanılmak üzere çıkartıldıktan sonra kurban edildi. Kontrol grubunda ise, 4 aylık hayvanlar kullanıldı.

Bu çalışmada deneyler, distal kalın barsaktan hazırlanan izole sirküler düz kas stripleri ile organ banyolarında invitro olarak yapıldı. Çalışmada ekzojen KCl ve papaverin verilerek sirküler düz kasların sırasıyla kasılabilirliği ve gevşeyebilirliği değerlendirildi. Ardından guanetidinli ve indometazinli ortamda değişen frekans, voltaj ve sürelerde uygulanan elektriksel alan uyarısı (EAU) ile kas striplerinin nörojenik yanıtları değerlendirildi. Bu

yanıtların nörojenik kaynaklı olduğu ise, ortama tetrodotoxin eklenmesini takiben kaybolması ile anlaşıldı. Takiben, EAU çalışmaları atropinli, L-NAME'li ve atropin ile birlikte L-NAME'li ortamda tekrarlanarak elde edilen yanıtlar karşılaştırıldı. En son olarak, postsinaptik reseptörlerden oluşacak etkiyi değerlendirmek için ortama karbakol eklenerek kasılma; Sodyum nitroprusiat(SNP), sildenafil ve L-arginin eklenerek gevşeme yanıtları elde edildi.

Sonuçta, kolostominin distalinde kalan barsak segmentinde makroskopik olarak atrofi gelişmesine rağmen, kolon sirküler düz kaslarının kasılabilirliği ve gevşeyebilirliği değişmemektedir. Ancak kolostominin distalindeki kolonda, presinaptik uçtan sinir uyarımına bağlı asetilkolin, nitrik oksit ve nöropeptidler gibi nörotransmitterlerin salıverilmesinin azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla her ne kadar kolonun düz kas yapısı kolostomi açılmasından etkilenmemekte ise de kolonda nörotransmisyon bozulduğu için kolostominin distalindeki kolonda motilite bozukluğu olmaktadır. Ancak bu çalışmamızda gösterdiğimiz motilite bozukluğunun, düzelip düzelmediği, düzeliyorsa da ne kadar zaman içinde normale döndüğünü araştırmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7.YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)

Transient or permanent colostomy is widely used as an option of treatment in paediatric and adult surgery. In children it is mostly used as a first stage procedure in Hirschsprung's disease and anorectal malformation. It is also performed as a prevention in colorectal surgery to secure the distal colonic anastomosis and as a transient procedure in emergency surgery to decrease the risk of anastomotic breakdown. Although it is widely used in surgical practice the affect of the colostomy on the innervation and the motility of the distal bowel isn't known clearly. In this study we evaluated the affect of the colostomy on cholinergic and nitreergic systems of the distal colon with an in-vitro method.

In this study two months old New Zealand rabbits were used. The animals were randomly allocated into two groups: control (n=8), study (n=12). The rabbits were operated on under sterile conditions. A sigmoid colostomy were performed to the rabbits of the study groups and distal bowel were closed as Hartmann and left in the peritoneal cavity. After two months of waiting period colon segments were harvested and rabbits were sacrificed thereafter. In the control group the segments from the same part of the colon were harvested for invitro experiments when the rabbits become four months old. In the invitro part of the experiment the isolated circular muscle strips which were prepared from the harvested distal colon were used. First the contraction and relaxation responses of the smooth muscles are detected by using KCl and papaverine as smooth muscle stimulant agents. Then the neurologic responses of the muscle strips to the electrical field stimulation (EFS) were evaluated in an environment with guanethidine and indomethacin. These responses were accepted as neurological responses when they were disappeared after adding tetrodotoxin in

the environment. Then the EFS studies were repeated in atropine, L-NAME, atropine and L-NAME added environments. To evaluate the affect on the postsynaptic receptors, carbachol evoked contraction responses and sodium nitroprusside(SNP), sildenafil and L-arginine derived relaxation responses recorded.

As a result although macroscopic athrophy had developed in the distal colonic segment of the colostomy, the contraction and relaxation capacity of the smooth muscles did not change. However, the presynaptic secretion of the neurotransmitters such as acetylcholine, nitric oxide and neuropeptides were diminished. Though the contraction capacity of the smooth muscle was not affected, the motility of the distal colon was deteriorated by the defective secretion of the presynaptic neurotansmitters. We believe that further investigation will be needed to evaluate the possibility to cure this motility disorder.

8.KAYNAKLAR

1. Altschuler SM: Neurology of the Gut: Pediatric Gastrointestinal Disease. Wyllie R, Hyams JS (ed) WB Saunders, Philadelphia 1993, S:74-94
2. Appleton GV, Williamson RC: Hypoplasia of defunctioned rectum. Br J Surg 76: 787-789, 1989
3. Axelrod R, Martin J, Ryan JP: Response of colonic smooth muscle from newborn and adult rabbits to electrical field stimulation. Pediatric Research 35: 470-473, 1994
4. Baillie CT, Kenny SE, Rintala RJ, Booth JM, Lloyd DA: Long-term outcome and colonic motility after the duhamel procedure for Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg 34: 325-329, 1999
5. Başaklar AC: Pediatrik Gastrointestinal Stomalar: Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. 1.Baskı. Başaklar AC (ed) Palme Yayıncılık, Ankara 2006, S:527-543
6. Başaklar AC, Demiroğulları B: Kabızlık: Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. 1.Baskı. Başaklar AC (ed) Palme Yayıncılık, Ankara 2006, S:579-603
7. Birincioğlu M, Kayaalp SO: Periferik Vazodilatörler: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11.Baskı. Kayaalp SO (ed) Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara 2005, S:388-394

8. Cellek S, John AK, Thangiah R, Dass NB, Bassil AK, Jarvie EM, Lalude O, Vivekanandan S, Sanger GJ: 5-HT₄ receptor agonists enhance both cholinergic and nitregeric activities in human isolated colon circular muscle. *Neurogastroenterol Motil* 18: 853-861, 2006
9. Chaudhury A, Shariff A, Srinivas M, Sabherwal U: Changes in nitregeric innervation of defunctionalized rat colon after diversion colostomy. *Neurogastroenterol Motil* 16: 475-487, 2004
10. Ciftci AO, Sara Y, Tanyel FC, Bozdağ O, Orer HS, Onur R: The role of nitregeric system on the contractility of colonic circular smooth muscle in hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 34: 1477-1481, 1999
11. Costa M, Brookes SJ, Hennig GW: Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47: 15-19, 2000
12. Çimen A: Sindirim Sistemi: Anatomi. 5. Baskı. Çimen A (ed) Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa 1995, S:363-435
13. Engum SA, Grosfeld JL: Long-term results of treatment of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 13: 273-285, 2004
14. Gabella G: Detection of nerve cells by a histochemical technic. *Experientia* 25: 218-219, 1969
15. Holschneider AM, Ure BM: Hirschsprung's Disease: Pediatric Surgery. Aschcraft KW (ed) WB Saunders Company, Philadelphia 2000, S:453-472
16. <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/neuro/c7.48.17.synapse.jpg>

17. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Sindirim Kanalı: Temel Histoloji. 7.Baskı. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (ed) Barış Kitabevi, İstanbul 1993, S: 336-370
18. Kayaalp SO: Santral Sinir Sistemi Farmakolojisinin Temelleri: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11.Baskı. Kayaalp SO (ed) Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara 2005, S:623-659
19. Kenny SE, Connell MG, Rintala RJ, Vaillant C, Edgar DH, Lloyd DA: Abnormal colonic interstitial cells of cajal in children with anorectal malformations. J Pediatr Surg 33: 130-132, 1998
20. Kissmeyer-Nielsen P, Christensen H, Laurberg S: Diverting colostomy induced mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. Gut 35: 1275-1281, 1994
21. Kissmeyer-Nielsen P, Christensen H, Laurberg S: Trophic effects of biosynthetic growth hormone on normal and defunctioned left colon in rats. Scand J Gastroenterol 30: 246-251, 1995
22. Kissmeyer-Nielsen P, Mortensen FV, Laurberg S, Hessov I: Transmural trophic effect of short chain fatty acid infusions on atrophic, defunctioned rat colon. Dis Colon Rectum 38: 946-951, 1995
23. Leclerc PG, Prins NH, Schuurkes AJ, Lefebvre RA: 5-HT₄ receptors located on cholinergic nerves in human colon circular muscle. Neurogastroenterol Motil 17: 366-375, 2005

24. McKirdy HC, Richardson CE, Gren JT, Rhodes J, Williams GT, Marshall: Differential effect of nitric oxide synthase inhibition on sigmoid colon longitudinal and circular muscle responses to nicotine and nerve stimulation in vitro. *British J Surg* 91: 229-234, 2004
25. Menezes M, Puri P: Long-term outcome of patients with enterocolitis complicating Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 22: 316-318, 2006
26. Moore KL, Dalley AF: *Abdomen: Clinically Oriented Anatomy*. 4th ed. Moore KL, Dalley AF (ed) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 1999, S:174-330
27. Onori L, Aggio A, D'alo S, Muzi P, Cifone MG, Mellillo G, Ciccocioppo R, Taddei G, Frieri G, Latella G: Role of nitric oxide in the impairment of circular muscle contractility of distended, uninflamed mid-colon in TNBS-induced acute distal colitis in rats. *World J Gastroenterol* 11:5677-5684, 2005
28. Paran TS, Rolle U, Puri P: Enteric nervous system and developmental abnormalities in childhood. *Pediatr Surg Int* 22: 945-959, 2006
29. Pena A: Anorectal malformations. *Semin Pediatr Surg* 4: 35-47, 1995
30. Pena A, Levitt MA: Colonic inertia disorders in pediatrics. *Curr Probl Surg* 39: 661-732, 2002
31. Puri P, Shinkai T: Pathogenesis of Hirschsprung's disease and its variants: recent progress. *Semin Pediatr Surg* 13: 18-24, 2004
32. Rolle U, Nemeth L, Puri P: Nitroergic innervation of the normal gut and in motility disorders of childhood. *J Pediatr Surg* 37: 551-567, 2002

33. Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG: Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* 9: 229-234, 1983
34. Shuttleworth CW, Xue C, Ward SM, de Vente J, Sanders KM: Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 56: 513-522, 1993
35. Singh R, Cameron BH, Walton JM, Farrokhyar F, Borenstein SH, Fitzgerald PG: Postoperative Hirschsprung's enterocolitis after minimally invasive swenson's procedure. *J Pediatr Surg* 42: 885-889, 2007
36. Snape WJ Jr, Kim BH, Willenbacher R, Koelbel CB, Mayer EA Jr, Walsh JH: Differences in the response of proximal and distal rabbit colonic muscle after electrical field stimulation. *Gastroenterology* 96: 321-326, 1989
37. Stanton MP, Hengel PT, Southwell BR, Chow CW, Keck J, Hutson JM, Bornstein JC: Cholinergic transmission to colonic circular muscle of children with slow-transit constipation is unimpaired, but transmission via NK₂ receptors is lacking. *Neurogastroenterol Motil* 15: 669-678, 2003
38. Tomita R, Munakata K, Tanjoh K: Role of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves in the colon of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 33: 48-52, 1998
39. Ulus İH, Kayaalp SO: Otonom Sinir Sistemi, Nörotransmitterleri ve İlaçları Hakkında Temel Bilgiler: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11.Baskı. Kayaalp SO (ed) Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara 2005, S:919-944

40. VanCrombruggen K, Lefebvre RA: Nitroergic-purinerbic interactions in rat distal colon motility. *Neurogastroenterol Motil* 16: 81-98, 2004
41. Vieten D, Spicer R: Enterocolitis complicating Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 13: 263-272, 2004
42. Violi V, Cobianchi F, Adami M, Torri T, Ferraro G, Roncoroni L: Human defunctionalized colon: A Histopathological and pharmacological study of muscularis propria in resection specimens. *Digestive Diseases and Sciences* 43: 616-623, 1998
43. Yılmaz ED, Kayaalp SO: Peptid Yapılı Otakoidler ve Nitrik Oksid: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11.Baskı. Kayaalp SO (ed) Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara 2005, S:1265-1278
44. Zhang SC, Bai YZ, Wang W, Wang WL: Stooling patterns and colonic motility after transanal one-stage pull-through operation for Hirschsprung's disease in children. *J Pediatr Surg* 40: 1766-1772, 2005
45. Zhang SC, Bai YZ, Wang W, Wang WL: Long-term outcome, colonic motility, and sphincter performance after Swenson's procedure for Hirschsprung's disease: a single-center 2-decade experience with 346 cases: *American J Surg* 194: 40-47, 2007
46. Zuccarello B, Romeo C, Scalfari GF, Impellizzeri P, Montalto AS, D'Oppido D, Campenni A, Formica I, Baldari S: Scintigrafic evaluation of colonic motility in patients with anorectal malformations and constipation. *J Pediatr Surg* 41: 310-313, 2006