

163179

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

MERAM TIP FAKÜLTESİ

İLK VE ACİL YARDIM ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Adil GÖKALP

ANABİLİM DALI BAŞKANI

**TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL SEPSİS
MODELİNDE DÜŞÜK DOZ N-ASETİLSİSTEİN
TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Arif DURAN

Tez Danışmanı

Yard. Doç. Dr. M. Ertuğrul KAFALI

KONYA-2004

KISALTMALAR

TABLO VE RESİMLER

I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. Sepsis.....	3
II.1.1. Tanım.....	3
II.1.2. Epidemiyoloji.....	4
II.1.3. Etyoloji.....	5
II.1.4. Patofizyoloji.....	6
II.1.5. Klinik.....	8
II.1.6. Tedavi.....	9
II.1.7. Prognoz.....	10
II.2. Serbest oksijen radikalleri.....	11
II.2.1. Serbest oksijen radikal kaynakları.....	11
II.2.2. Serbest oksijen radikal ürünleri.....	12
II.2.3. Antioksidan savunma sistemleri.....	13
II.2.4. Serbest oksijen radikallerinin insan fizyolojisindeki rolü.....	16
II.3. N-asetilsistein.....	16
II.4. Deneysel sepsis modelleri.....	17
III. MATERYAL VE METOD.....	18
III.1. Operatif işlem.....	19
III.2. GSH tayini.....	21
III.3. MDA tayini.....	21

III.4. Lökosit sayımı.....	24
III.5. Kan gazı ölçümü.....	24
III.6. Kan kültürü yapılması.....	24
III.7. Biyokimyasal parametrelerin bakılması.....	25
III.8. Dokuların histopatolojik değerlendirilmesi.....	25
III.9. Deneklerin yaşam süreleri tespiti.....	25
III.10. İstatiksel analizler.....	26
IV. BULGULAR.....	27
IV.1. Plazma GSH, MDA ve karaciğer doku MDA sonuçları.....	27
IV.2. Arteriyel kan gazı sonuçları.....	28
IV.3. Biyokimyasal parametrelerin sonuçları.....	28
IV.4. Lökosit sonuçları.....	30
IV.5. Deneklerin yaşam süreleri.....	30
IV.6. Kan kültürü sonuçları.....	31
IV.7. Histopatolojik bulgular.....	31
IV.7.1. Akciğerde tespit edilen histopatolojik bulgular	31
IV.7.2. Karaciğerde tespit edilen histopatolojik bulgular	31
IV.7.3. Böbrekte tespit edilen histopatolojik bulgular	31
V. TARTIŞMA.....	34
VI. ÖZET.....	44
VII. SUMMARY.....	46
VIII. KAYNAKLAR.....	48
IX. TEŞEKKÜR.....	53

KISALTMALAR

CLP: Çekum ligasyonu perforasyonu

DMSO: Dimetilsülfoksit

DTNB: 5.5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit

GSH: Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

GSH-Rd: Glutasyon redüktaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografi

INOS: İndusibl nitrik oksit sentetaz

LBP: Lipopolisakkarit bağlayıcı protein

LPS: Lipopolisakkarit

MDA: Malondialdehid

NAC: N-asetilsistein

NO: Nitrik oksit

O₂⁻: Süperoksit radikali

OH_e⁻: Hidroksil radikali

PCO₂: Parsiyel karbondioksit basıncı

PO₂: Parsiyel oksijen basıncı

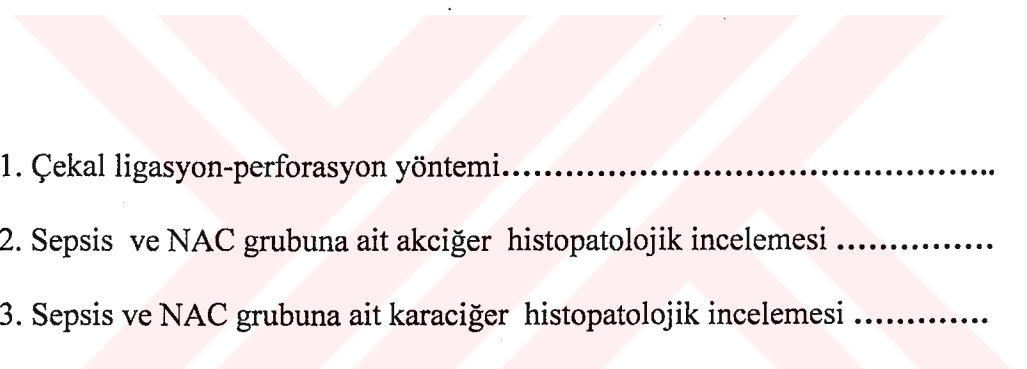
SaO₂: Arteriyel oksijen satürasyonu

SDS: Sodyum dodecyl sülfat

TBA: Tiobarbitürik asit

TCA: Trikloroasetik asit

TABLO ŞEKİL VE RESİMLER

Tablo 1. Sepsis kaskadı.....	8
Tablo 2. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu.....	11
Tablo 3. Antioksidan enzimlerin etkileri.....	12
Tablo 4. Hidrojen peroksidin NADPH ile indirgenmesi.....	14
Tablo 5. Grupların GSH, MDA ve karaciğer MDA düzeyleri	27
Tablo 6. Grupların arteryel kan pH, PO ₂ , PCO ₂ ve SaO ₂ düzeyleri.....	28
Tablo 7. Grupların plazma SGOT, SGPT, LDH ve CRP düzeyleri.....	29
Tablo 8. Grupların plazma üre, kreatinin, lökosit düzeyleri ve yaşam süreleri.....	30
	
Resim 1. Çekal ligasyon-perforasyon yöntemi.....	20
Resim 2. Sepsis ve NAC grubuna ait akciğer histopatolojik incelemesi	32
Resim 3. Sepsis ve NAC grubuna ait karaciğer histopatolojik incelemesi	32
Resim 4. Sepsis ve NAC grubuna ait böbrek histopatolojik incelemesi	33

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis ve septik şok, mortalitesi yüksek, sıklığı giderek artan, oluşan sekellerinin rehabilitasyonu zor, son derece karmaşık patofizyolojik olayların olduğu bir klinik durumdur. Sepsis ve septik şok yüksek morbidite, mortalitesi ve oluşturduğu sekelleri nedeniyle acil ve agresif tedavi gerektirir.

Son zamanlarda hücre biyolojisinin anlaşılmasında kaydedilen ilerlemeler sayesinde sepsisin patofizyolojisi daha iyi anlaşılabilir hale gelmiş, olayda rol alan mediyatörler ve sitokinler tanımlanarak bunların etki mekanizmaları ve vücutta gelişen patofizyolojik metabolik değişimler belirlenmiştir.

Serbest radikal reaksiyonları vücutta istenmeyen bir takım değişikliklere neden olur. Bu süreç, genetik ve çevresel etmenlerin üzerine eklenmesiyle kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir. Serbest radikallerin organizma için fagositoz gibi yararlı işlevleri vardır. Bununla birlikte, aşırı miktarda bulunmaları başta lipidler ve glikoproteinler olmak üzere hücresel yapılar üzerine toksik etki yapmaktadır. Genellikle biyolojik serbest radikal reaksiyonları sonucunda oluşan lipid peroksidasyon ürünleri, özellikle son ürün olan malondialdehid (MDA) seviyesi bize serbest radikal seviyeleri hakkında fikir verir. Ayrıca koruyucu antioksidan savunma sistemi elemanlarının incelenmesi, serbest radikaller ve oluşturdukları doku harabiyeti hakkında fikir verir.

Glutasyon (GSH) serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Serbest radikallere bağlı olduğu düşünülen klinik durumlar başta bağışıklık sistemi bozuklukları, iskemik durumlar, beslenme bozuklukları, madde ve toksinlerin yol açtığı reaksiyonlar olmak üzere karaciğerden göze kadar tüm organları içine

alabilir.

Bu çalışmanın amacı tavşanlarda deneysel sepsis modeli oluşturarak, antioksidan bir ajan olan N-asetilsistein'in, serbest oksijen radikalleri düzeylerine olan etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla N-asetilsisteinin sepsisin neden olduğu organ fonksiyon anormalliklerini, akciğer, karaciğer ve böbrekteki doku hasarını önlemedeki rolü araştırıldı.



II. GENEL BİLGİLER

II.1. Sepsis

II.1.1. Tanım

Sepsis ve septik şok yaygın kullanılan iki terimdir. Bu terimler, aynı klinik tablonun değişik evreleri değildir. Sistemik immün yanıt sendromu (SIRS), sepsis ve septik şok konakçının enfeksiyona karşı olan artmış yanıtını ifade ederler (1,2).

SIRS : Çeşitli etkilere karşı gelişen sistemik yanıttır. Aşağıdaki klinik görünümünden 2 veya daha fazlasının görülmesi ile tanı konur:

-Vücut ısısının $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$

-Kalp hızının $>90/\text{dk}$

-Solunum sayısının $>20/\text{dk}$ veya $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$

-Beyaz küre sayısının $>12000/\text{mm}^3$ veya $<4000/\text{mm}^3$ veya immatür nötrofil $>\%10$

Sepsis : Sistemik inflamatuvar yanıt sendromunda enfeksiyöz bir ajan ya da durum saptanırsa sepsis adını alır. Eğer bu duruma organ disfonksiyonu veya hipoperfüzyonu ya da hipotansiyon eşlik ediyorsa şiddetli sepsis söz konusudur.

Septik Şok : Yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen devam eden sepsise bağlı hipoperfüzyon durumudur. Birlikte organ disfonksiyonu veya hipoperfüzyona bağlı anormallikler mevcuttur. Örneğin; laktik asidoz, oligüri veya mental durum değişiklikleri olabilir. Septik şoktaki hastalarda hipotansiyonla beraber görülen perfüzyon bozukluklarında inotropik veya vazopressör ajanların kullanımı tedavide yetersiz kalır.

Vücutun infeksiyöz etkenlere karşı verdiği klinik yanıtlar dizisini tanımak amacıyla daha önceki tanımlamalardan farklı olarak, Sistemik İnflamatuar Response Sendromu (SIRS) tanımı getirilmiştir.

Sepsis ve sepsisin klinik evreleri ile ilgili tanımların açıklık kazanması ve yaygın bir şekilde benimsenmesi, hastada gelişen fizyopatolojik olayların daha iyi belirlenmesini sağlayacaktır. Böylece tedavinin daha iyi planlanması sağlanacak, bu alanda yapılan klinik çalışmalarda hasta populasyonun daha iyi belirlenecektir. Çalışma sonuçlarından elde edilen veriler değerlendirilerek sepsisin tedavisinde yeni ilaçların kullanımı söz konusu olacaktır. Bu da mortalitesi yüksek olan sepsis tedavisinde hastanın irreversibl safhaya geçişini yavaşlatacak ve verilecek olan antibiyoterapinin etkinliğini arttıracaktır.

II.1.2.Epidemiyoloji

Sepsis yoğun bakım ünitelerinin en sık görülen problemlerinden biridir. Çoklu organ yetmezliğinin eşlik ettiği septik şok yoğun bakım ünitelerindeki en sık ölüm sebebidir. Son yıllarda sepsis olgularının sayısında bir artış görülmektedir. Bu artış tüm yaş gruplarında olmakla birlikte >65 yaş grubundaki artış en fazladır. Bu durum hastalığı ciddi şekilde ağır olan olguların agresif bakımları, immün durumu aşırı bozuk olguların bakımı, mekanik ve invaziv araçların kullanımı (idrâr sondası, mekanik ventilasyon, santral kateter, endotrakeal tüp vs.) ve enfeksiyona eğilimli olguların uzun yaşaması gibi faktörlerden kaynaklanır.

A.B.D' de her yıl 750.000 hastada sepsis gelişir ve bununda yaklaşık 200.000'inin ölümcül olduğu sanılmaktadır (3). Optimal tedavilere rağmen şiddetli sepsis ve septik şokun mortalite hızı yaklaşık olarak %40'dır (4). Genellikle bu olguların büyük bir kısmının nedeni gram negatif bakterilerdir (5). ABD'de gram (-) bakteriyemi gelişen hastaların yıllık sağlık hizmetleri harcamalarının 30-70 milyon dolar arasında olduğu ileri sürülmektedir (3,4,6).

Ülkemizde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastaların %42'sinde gram (-) bakteriyemi gelişmekte ve %45 oranında fatal sonuçlanmaktadır (5).

Prognoz açısından en önemli nokta, sepsis tablosunun erken tanınıp derhal etkin tedavinin başlatılmasıdır. Eğer erken tanı konabilir ve etkin tedavi başlanırsa mortalite % 20'nin altına inmekte, ancak şok ve çoklu organ yetmezliği gelişmiş ise mortalite % 70'in üstüne çıkmaktadır (1).

II.1.3. Etyoloji

Sepsis ve septik şok hastanın klinik durumunu yansıtan terimler olup, mikrobiyolojik yönden bir bilgi vermemektedir. Sepsis tablosu bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitlerden kaynaklanabildiği gibi enfeksiyon dışı olaylarla da gelişebilmektedir. Olguların yarısında etken gösterilememesine karşın, bu grubun çoğunun antibiyotik tedavisine cevap vermesi, bu hastalardada etkenin bakteriyel olduğunu düşündürmektedir. Sepsise neden olan mikroorganizmaların sıklığı sepsisin hastane içi veya hastane dışında gelişmiş olmasına göre değişiklik gösterir. 1950'li yıllarda Gr (+) bakteriler ön sırada olup, sıklıkla Staphilococcus aureus ve Streptococcus pyogenes etken olarak saptanmaktaydı. Ancak antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile bu bakterilerin neden olduğu hastalıklar tedavi edilebilir hale gelmiş ve 1960'lı yıllardan bugüne Gr (-) bakteriler olguların %50 sinden fazlasında etken olarak rol oynamıştır. Son yıllarda ise Gr (+) bakterilere bağlı sepsis insidansında artış gözlenmektedir. Bakteri spektrumunun tekrar Gr (+) mikroorganizmalara kayma nedenleri arasında; hızla kullanıma giren III. kusak sefalosporinler ve kinolonlar gibi Gr (-) bakterilere çok etkili yeni antibiyotiklerin kullanımının artması, tıbbın artan olanakları ile daha uzun süre yaşama imkanı sağlayan kanser, kollajen doku hastalığı gibi hastalıkları olan kişilerde uzun süreli

kalıcı intravasküler kateter uygulanmasının artması, değişik vücut içi protez kullanımının artması kronik ambulatuvar periton diyalizi gibi yöntemlerin geliştirilmesi sayılabilir (5).

Sepsis olgularında etken olarak enterokoklar da giderek artmaktadır. Bu durum geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı ile paralellik göstermektedir. Ayrıca son yıllarda sepsis olgularının %5'inden fazlası kandida başta olmak üzere mantarlarla gelişmektedir. Bu durumu hazırlayan risk faktörleri arasında uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, parenteral hiperalimentasyon, intravasküler kateter uygulanması ve kortikosteroid tedavisi sayılabilir (7).

II.1.4. Patofizyoloji

Sepsis, mikroorganizmaların dokuda kolonizasyonu ve proliferasyonu ile başlar. Konakçının özellikleri ve mikroorganizmaların virulansı, yayılımın ve lokal inflamatuvar cevabın şiddetini belirler. Mikroorganizmaların saldıkları toksinler ve enzimler, konakçı organizmada inflamatuvar cevaba yol açan bir çok mediatör salınmasına yol açar. Bu toksinlerden en önemlisi özellikle (gram (-) basillerden salınan) sepsis ve septik şoka yol açan olaylar dizisini başlatan bir endotoksin olan Lipid A'dır.

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, sepsiste oluşan patolojik olayların bir çoğunun anlaşılmasını mümkün kılmıştır. En çok çalışma Gr (-) bakterilere bağlı sepsis üzerinde yapılmıştır. Gr (-) bakterilerin hücre duvarı içte peptidoglikan tabakası, dışta lipopolisakkaritler (LPS), protein ve fosfolipidlerden oluşur. LPS yapısında olan endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktiftir; ancak hızlı hücre büyümesi veya hücre yıkımı sırasında endotoksin salınımı sonucunda bir dizi olaylar başlar. Endotoksin molekülü üç bölgeden meydana gelir. En dış kısım polisakkarit yapıda olup, her bakteri türünde farklılık gösterir ve spesifik bir immun yanıt oluşumundan da sorumludur.

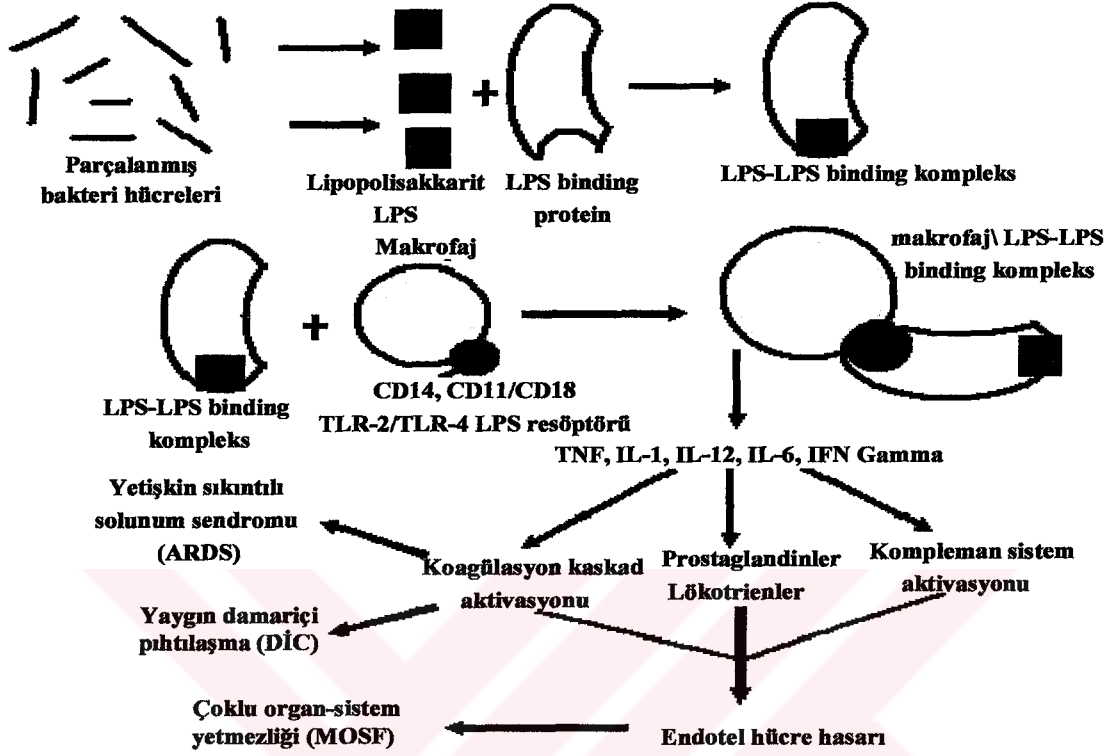
Molekölün en iç kısmında ise Lipid A yer alır. Lipid A normalde bakteri hücrelerinin dış membranına gömülü durumdadır, bütün Gr (-) bakterilerde yapısı aynıdır ve toksisitenin çoğundan sorumludur. Endotoksin sepsisteki olaylar dizisini başlatan anahtar moleküldür. Bu LPS deney hayvanlarına verildiğinde ARDS, akut tübüler nekroz, koagulopati ve hipoglisemi gibi letal etkiler izlenmiştir. LPS monosit ve makrofajlardaki reseptörlere bağlanmakla birlikte doğrudan doğruya etkili olmadığına dair bilgiler vardır (8-10).

Gr (+) bakterilerde ise peptidoglikanlar, ekstrasellüler enzimler ve toksinler septik şokta tetikleyici faktörlerdir. Bakteri lizisinden ortaya çıkan ve bakteri replikasyonu sırasında dökülen dış membranındaki LPS'ler, LPS bağlayıcı protein (LBP) ile kompleks oluştururlar.

Bu kompleks makrofaj/monosit membranındaki CD14 reseptörüne bağlanır. Sonuçta makrofajlardan tümör nekroz faktör (TNF) salgılanır. Ayrıca koagülasyon ve kinin sistemi Hageman faktör üzerinden direkt olarak aktive olur. Bununla beraber kompleman sistemi de aktive olur ve serbest oksijen radikallerinin yapımı artar. Serbest oksijen radikalleri DNA' da hasara, hücre proteinlerinde denatürasyona ve membran lipidlerinde peroksidasyona yol açarak doku hasarına neden olur (Tablo 1). Bu gözlemden çıkan en önemli sonuç, endotoksinin tek başına zararsız olduğu ve etkisini gösterebilmesi için çeşitli endojen sitokinler gereksinimi duymasındır (11).

Bu sitokinler; (TNF), interlokin- 1 (IL-1), prostoglandinler, lökotrienler, platelet aktive edici faktör (PAF) ve endojen nitrik oksit (NO)'dir.

Tablo 1. Sepsis kaskadı.



II.1.5. Klinik

SIRS'e yol açan etken ister Gr (-), isterse Gr (+) olsun semptom ve bulgular benzerdir. Mortalitesi yüksek olan bu klinik tablonun erkenden tanınarak acil ve etkin bir tedavinin uygulanması ile hastanın yaşam şansı önemli ölçüde artabilmektedir. Primer bulgular ve komplikasyonlar arasında kesin bir sınır yoktur. Hipotansiyon, kanama, hipoksi, asidoz, sarılık gibi komplikasyonlar bizi tanıya götüren ilk bulgular olabilir. Öte yandan hiperventilasyon ve vücut ısısındaki değişiklikler de önceden ortaya çıkabilir. Yoğun bakım ünitelerindeki hastaların izlemi sonucunda mental durumdaki değişiklik ve hiperventilasyonun ilk klinik bulgular olduğu anlaşılmıştır. Sepsiste en erken ortaya çıkan metabolik değişiklikler ise respiratuar alkalozdur (12).

II.1.6. Tedavi

Hastanın oksijenizasyonuna yönelik olarak havayolunun değerlendirilmesi öncelikli tedavi seçimidir. Uygun yöntemlerle acil tanı konulması, infeksiyon etkeninin belirlenmesi ve en olası etkene karşı ampirik antimikrobiyal tedavi başlanması, metabolik ve kardiyovasküler bozuklukların destekleyici yöntemlerle düzeltilmesi gerekmektedir. Tedavinin başarısını belirleyen en önemli faktör sepsisin irreversibl faza geçmeden önce tedavinin uygulanmasıdır (13).

Hemodinamik stabilizasyonda sıvı tedavisi ve inotropik destek önemlidir. Septik şok sırasında beyin ve böbrek dokusu gibi yaşamsal organlardaki perfüzyonu sağlayabilmek amacıyla splanknik dolaşım ve deri damarlarında vazokonstriksiyon gelişir. Hemodinamik komplikasyonların düzeltilmesi amacıyla semptomimetik ajanlar kullanılabilir (14).

Şiddetli asidozda ($\text{pH} < 7.2$) bikarbonat kullanımı bazı araştırmacılar tarafından savunulmaktadır, fakat bunun faydası ispatlanmamıştır (15).

Sepsis sonucunda oluşan dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) gelişen hastalarda heparin kullanılabilir. Ancak esas tedavi koagülasyon komponenti eksikliği nedeniyle kanaması olan hastalarda eksik faktörün yerine konulmasıdır. DIC gelişen hastalarda çok acil düzeltilmesi gereken koagülasyon ve fibrinolitik sistemlerin hızlı taze donmuş plazma ve/veya trombosit süspansiyonu transfüzyonuyla yerine konmasıdır (15,16).

Her ne kadar bazı hayvan modellerinde yüksek doz kortikostreoid tedavisinin etkinliği gösterilmişse de, yapılan geniş klinik çalışmalarda kortikosteroid tedavisi alan hastalarla kontrol grubu arasında mortalite açısından fark gösterilememiştir. Bu çalışmalarda kortikosteroid tedavisi alan hastalarda süperenfeksiyon oluştuğu bildirilmiştir. Steroidlerin

kullanımı, klinik olarak şüpheli hastalarda ve adrenal yetmezlikli hastalarda önceliklidir. Sepsisle birlikte ilerleyici dirençli Neisseria meningitis bakteriyemisi, yaygın tüberküloz, AIDS, önceden kortikosteroid kullanımı veya dirençli hipotansiyonda adrenal yetmezlik dikkate alınmalıdır (15,17,18).

Bir antioksidan olan N-Asetilsistein'in (NAC) deneysel sepsis çalışmalarında oksijen salınım kapasitesini ve kardiyak fonksiyonları düzelttiği gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda NAC'in gastrik intramukozal pH ve prognoz üzerine iyileştirici etkisi gösterilmiştir (19). Bununla birlikte yeni yapılan deneysel çalışmalardaki bulgular, NAC'in kuvvetle kardiyak fonksiyonları deprese ettiğini göstermiştir (20).

II.1.7. Prognoz

Tanı ve tedavideki büyük gelişmelere rağmen sepsis ve sepsis sekelleri halen %30-90 arasında ölümcüldür. Mortalite oranlarının bu kadar değişiklik göstermesi yakın zamanlara kadar sepsis tanımında bir görüş birliğinin olmamasına, çeşitli konakçı ve çevre faktörlerine bağlanmaktadır (24). Bu nedenle prognostik faktörlerin belirlenmesi ve kötü prognostik işaretleri taşıyan hasta populasyonunun ortaya konması büyük önem taşımaktadır. Hipotermik hastalarda mortalitenin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Normotermi veya hipotermi esas olarak, hastanın immün sisteminin salıverilen endojen sitokinlere beklenen yanıtı oluşturamayacak kadar suprese olduğunun bir göstergesidir. Sepsiste uç organ yetmezliği gelişmişse ölüm %100'dür (ciddi karaciğer yetmezliği, kalp yetmezliği ve ARDS).

II.2. Serbest oksijen radikalleri

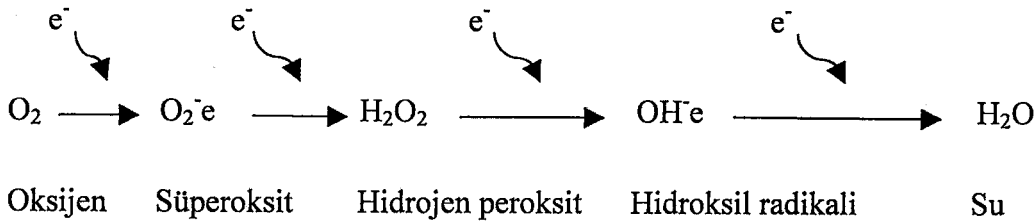
II.2.1. Serbest oksijen kaynakları

Serbest radikaller normal metabolizma sürecinde oluştuğu için, tüm aerobik hücreler bunların yıpratıcı etkilerinden kendilerini koruyacak antioksidan savunma sistemine sahiptir. Hücreler serbest oksijen radikallerini ve bunların metabolitlerini ortadan kaldıracak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan ve serbest radikal toplayıcı sistemlerle donatılmıştır.

Serbest radikaller bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahiptir. Bu nedenle yüksek reaktif ve büyük değişken moleküllerle birleşerek onların fizyo-kimyasal karakterlerini değiştirirler. Normal hücresel metabolizmanın fizyolojik bir ürünü olan serbest oksijen radikalleri, aerobik hücrelerde antioksidan savunma mekanizmalarının etkisiyle karşılaşarak etkisizleştirilir (21,22).

Oksijenin çoğu aerobik metabolizma ile mitokondrideki sitokrom oksidaz enzimi aktivitesiyle suya çevrilir. Kalan kısım indirgenerek superoksit (O_2^-) radikali, hidroksil (OH^-) radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktivitesi yüksek ürünlere çevrilirler (Tablo 2) (23,24).

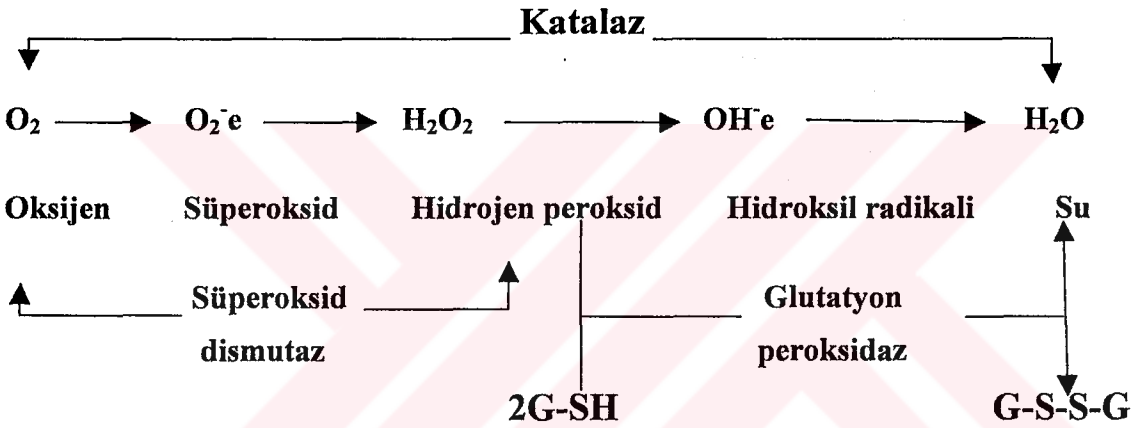
Tablo 2. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu



Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikalının H_2O_2 'e dönüşümünü sağlar. Peroksidazlar ve katalaz H_2O_2 'in su ve oksijene indirgenmesini sağlar.

Süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot) ve singlet oksijen (O_2) serbest radikallerdir. Glutasyon peroksidaz (GSH-px), glutasyon redüktaz (Gsh-Rd), süperoksit dismutaz (SOD) katalaz gibi enzimlerin yardımı ile serbest oksijen radikalleri su ve oksijene çevrilirler (Tablo 3) (25).

Tablo 3 . Antioksidan enzimlerin etkileri



II.2.2. Serbest radikal kaynakları ve ürünleri

Serbest oksijen radikallerinin aerobik canlılar için en önemli kaynağı moleküler oksijendir. Moleküler oksijen normalde %98 oranında sitokrom oksidaz enzimi tarafından suya çevrilir. Geri kalanlar ise indirgenmenin tam olmaması nedeniyle reaktif toksik ürünlere çevrilir. Bu toksik ürünlerin seviyesi herhangi bir patolojik olayda artar ve yetersiz kalan antioksidan sistemlerin de etkisiyle dokuda hasar meydana gelir.

Diğer serbest oksijen radikal kaynakları da enzimlerin katalitik evrelerinin ana ürünleridir. Örneğin hipoksantini ksantine çeviren ksantin oksidaz enzimi, ksantini ürik aside

çevirirken süperoksit radikalleri oluşturur (26). Lipooksijenaz ve siklooksijenaz yolu ile araşidonik asidin enzimatik oksidasyonuna bağı olarak ara ürün halinde ortaya çıkar (25).

Fagositoz yapan hücrelerin fagositoz fonksiyonu sırasında oksijen kullanımları artar. Bunun sonucu olarak da hidrojen peroksit, hipokloroz asit, superoksit radikali ve hidroksil radikali oluşur (24,25).

Lipidlerin hidroperoksidasyonu sonucu aldehit, pentan, etan gibi ürünler oluşur. Bunlardan en toksik olan aldehitlerdir. Üç yada daha fazla çift bağı içeren poliansature yağ asitlerinin reaksiyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. MDA Tiobarbutürik asit (TBA) ile reaksiyon verir (27-29). Dokudaki ve kandaki MDA seviyesi lipid peroksidasyonu derecesi ile orantı gösterir. MDA hücre için toksik bir moleküldür.

II.2.3. Antioksidan savunma sistemleri

Organizmada normal metabolik fonksiyonlar sırasında az miktarda serbest radikal üreten bazı kimyasal bileşikler vardır. Bunlara prooksidan, bu molekülleri ortadan kaldıran, baskılayan yada ters etki gösteren moleküllere ise antioksidan adı verilir. Normal hücre içinde antioksidanlarla prooksidanlar arasında denge vardır. Patolojik durumlarda, iskemi yada travma gibi durumlarda serbest radikal üretimi artar, antioksidan savunma sistemleri yetersiz kalır, oksidanların zararlı etkileri görülür (28-30). Antioksidan savunma sistemleri etkilerini toplayıcı, bastırıcı, tamir edici ve zincir kırıcı etkiler olmak üzere dört şekilde gösterirler (21).

Endojen antioksidanlar: Enzimatik defans mekanizmaları: Serbest radikal reaksiyonlarının başlaması için gerekli radikal miktarını azaltmaları nedeniyle primer antioksidanlar adı verilir.

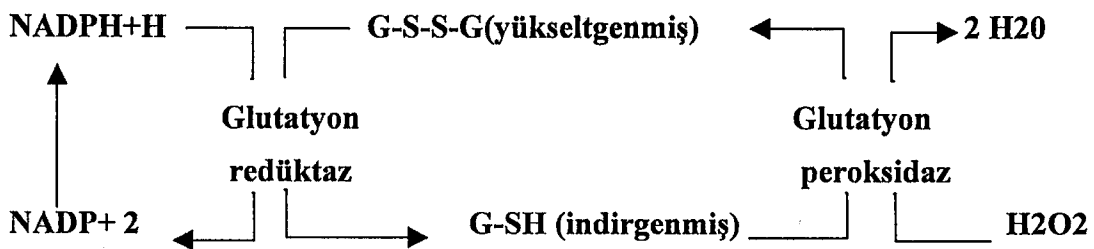
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz: Bu sistem moleküler oksijenin %95-98'ini kullanarak radikal oluşumunu önler (30).

Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksit radikalının toksik etkilerine karşı koruyucu bir enzimdir (26,30).

Katalaz: İki H_2O_2 molekülünden birini elektron alıcısı diğerini ise elektron vericisi olarak kullanıp suya çevirir.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. GSH-Px lipid peroksitlerini toksik olmayan alkole çevirir, H_2O_2 'i detoksifiye eder. Antioksidan etkisi için glutatyona ihtiyaç duyar. Glutasyonun yükseltgenmesinde GSH-Px, indirgenmesinde glutasyon redüktaz (GSH-Rd) enzimi görev alır (30). GSH-Px selenyumlu formu hem H_2O_2 'nin, hemde lipid peroksitlerin yıkılmasında etkilidir (24,30). GSH-Px hidroperoksitleri glutasyonun iki molekülünü glutasyon disülfite oksitleyerek indirger. GSH-Rd NADPH yardımı ile glutasyon disülfiti tekrar glutatyona çevirir. Bu reaksiyonda son elektron vericisi NADPH+H 'dur. Eritrositlerde NADP'ye bağlı NADPH üretiminin tek yolu glukozun heksoz monofosfat şantında oksidasyonudur. Bu metabolik yoldaki bir enzim eksikliği (Glukoz - 6 Fosfat Dehidrogenaz eksikliği gibi) NADPH üretimini ve antioksidan koruyucu sistem aktivitesini azaltır (Tablo 4).

Tablo 4. Hidrojen peroksidin NADPH ile indirgenmesi



Eritrosit GSH konsantrasyonu bazı toplumlarda heksoz monofosfat veya GSH sentez yolundaki defekt nedeniyle azalmıştır. GSH stabilite testi primakinle (G-6-PD eksikliği sonucu ortaya çıkar) kolayca hemoliz olan duyarlı kişilerin belirlenmesine olanak sağlar. Hareketsiz kalanlarda kapalı yan yolların belirlenmesinde stres testi kullanılır. Çünkü GSH sentezi bozuklukları ve gama-glutamil sistein sentetaz eksiklikleri nadir görülen patolojilerdir. Pratikte klinik laboratuvarlarda bu enzim defekti tespiti pek çalışılmaz.

Bütün nonprotein sülfidril grupları eritrositlerde redükte GSH formundadır. Sülfidril grupları 5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) disülfid ile indirgendiğinde kromojen koyu sarı bir şekildedir. İndirgenen kromojen absorbanı 412'nmde ölçülür ve GSH konsantrasyonu ile direkt orantılıdır.

Enzimatik olmayan defans mekanizmaları: Hücrelerde serbest radikallere karşı birçok endojen enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalar vardır. Başlıcaları alfa tokoferol (Vit E), beta karoten (Vit A), askorbik asit (Vit C) ile yürütülen mekanizmalardır. Diğer antioksidan toplayıcılar, toksik oksijen metabolitleri ile direk reaksiyona girerek daha stabil bileşikler oluştururlar. Transferrin ve ferritin demiri bağlayarak sekonder toksik ürünlerin salınımını engeller (24).

Egzojen antioksidanlar: Egzojen antioksidanlar serbest radikallerin salınımını engelleyerek, oluşmuş radikalleri toplayarak veya endojen antioksidan defansı artırarak etki ederler (31). Başlıca bilinen antioksidanlar arasında, glutatyon peroksidaz aktivitesini arttıran N-asetil sistein GSH üzerinden etkisini gösterir

II.2.5. Serbest radikallerin insan fizyolojisindeki rolü

Serbest radikaller, ATP oluşumu için hidrokarbonların oksidatif metabolizması, mikroorganizmaların fagositozla yok edilmesi, ovulasyonun oluşumu ve bazı kimyasal maddelerin enzimatik detoksifikasyonu gibi fizyolojik olaylarda etkin rol almaktadır.

Toksik etkisi olan bazı kimyasal ajanların karaciğer parankimi üzerine olan etkileri, iskemi-reperfüzyon hasarı, iskemik hepatit, iskemik pankreatit, neonatal iskemik kolit, intestinal iskemi-reperfüzyon, miyokard infarktüsü, beyin ve santral sinir sisteminin iskemik hasarı, transplante organ veya deri fleplerinin reddi, akut tübüler nekroz, bazı inflamatuvar hastalıklar (artrit, bağ dokusu hastalıkları, barsak hastalıkları, immun yetmezlik sendromları), yaşlanma, diabetes mellitus, ateroskleroz, hipovolemik şok ve sepsis gibi birçok olayda serbest oksijen radikalleri rol alır (32).

II.3. N-asetilsistein (NAC)

NAC potent antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği olan tiol bileşiğidir (33). Aynı zamanda iyi bilinen bir GSH prekürsörüdür. Direkt hareket etkisiyle serbest oksijen radikallerini, hidroksil radikallerini ve hipoklorik asidi indirgeyerek etkisiz hale getirir (34). Redoks sensitif değişim faktörlerini hızla aktive ederken inflamasyon, immün ve akut faz yanıtını içeren genleri aktive eder (35,36). NAC deneysel çalışmalarda seruleinin maximuma yakın dozlarda uyarılmasıyla koruyucu role sahiptir (36). Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi plazma MDA düzeylerini düşürmüştür (37-40). Ratlarda alkol stresi altında NAC verilmesi sonucunda serum SGOT, SGPT, plazma MDA, GSH ve karaciğer MDA değerleri herhangi bir işlem yapılmamış kontrol gurubu değerleriyle aynı düzeyde ölçülmüştür (40).

II.4. Deneysel sepsis modelleri

Çekum ligasyonu perforasyonu (ÇLP): Bu yöntemle gr (-) bakteriyemiyle seyreden peritonit ve sepsis oluşturulabilir. Uygun anestezi verildikten sonra, deneğin karın traşı ve dezenfeksiyonunu takiben 2 cm'lik orta hat kesisi ile laparotomi yapılır. Laparotomi sonrası çekum izole edilir, çıkan kolon sıvazlanarak çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileoçekal valvin altından 3/0 ipekle bağlanıp, çekum ön yüzü 22 numara intraket iğnesi ile iki defa delinir (41).

E.coli endotoksini (LPS, Lipopolisakkarit) enjeksiyonu: E.Coli endotoksininin çeşitli serotipleri (serotip 2880, serotip 055:B5 vb.) sepsis oluşturmak amacıyla kullanılan deneğe göre dozları ayarlanarak, intraperitoneal veya intravenöz verilebilir. 24 saat içinde sepsis oluşur, 48 saat içinde ölüm gerçekleşir.

Salmonella enteritis endotoksini: Bu endotoksin intrakardiyak olarak uygulanır. 24 saat içinde sepsis oluşur, 72 saat içinde ölüm görülür.

Pseudomonas aeruginoza kolonisi infüzyonu: İntraperitoneal olarak 250.000 koloni verilerek oluşturulur.

III. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi'nde, araştırma merkezi yönetim kurulu ve Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulu'nun izni ile yapılmıştır.

Çalışmada 3.500-4.500 gr (ort 3.900 gr) ağırlıkta Yeni Zelanda tipi 30 dişi deney tavşanı kullanıldı. Tavşanlar 10'arlı 3 gruba ayrıldı. Sham grubu haricindeki tavşanlarda çekal ligasyon-ponksiyon (ÇLP) yöntemi kullanılarak sepsis oluşturuldu (41).

Grup I (Sham grubu, n=10)

Mini laparotomi ile çekum izole edilip Çekal Ligasyon Perforasyon (ÇLP) uygulanmadan batın 2/0 ipekle kontinü suturele kapatıldı. 12. saatte biyokimyasal tetkik, arteryel kan gazı, hemogram ve 24. saatte biyokimyasal tetkik, arteryel kan gazı, hemogram, aerop ve anaerop kan kültürleri için arteriyel kan örneği alındı. Alınan kanların yerine, 3 katı kadar serum fizyolojik her kan alınımını takiben İV olarak verildi. Tavşanlar 24.saat tetkikleri için kan alınımını takiben sakrifiye edildi ve karaciğer, böbrek, akciğer doku örnekleri alınarak % 10 formol çözeltisinde saklanıp, daha sonra histopatolojik olarak incelendi. Ayrıca karaciğer doku örneği alındı, fosfat tamponuna konuldu, derin dondurucuda -80 °C de saklanıp doku MDA çalışıldı.

Grup II (Sepsis grubu, n=10)

Mini laparotomi ile çekum izole edilip ÇLP metoduyla sepsis oluşturularak batın 2/0 ipekle kontinü suturele kapatıldı. 12. saatte biyokimyasal tetkik, arteryel kan gazı, hemogram ve 24. saatte biyokimyasal tetkik, arteryel kan gazı, hemogram, aerop ve anaerop kan kültürleri için arteriyel kan örneği alındı. Alınan kanların yerine, 3 katı kadar serum

fizyolojik her kan alınımını takiben İV olarak verildi. Sonunda ölen tavşanların ölüm saati kaydedilip karaciğer, böbrek, akciğer doku örnekleri alınarak %10 formol çözeltisinde saklandı ve daha sonra histopatolojik olarak incelendi. Ayrıca karaciğer doku örneği alındı, fosfat tamponuna konuldu, derin dondurucuda -80 °C de saklanıp doku MDA çalışıldı.

Grup III (N-asetil sistein grubu, n=10)

ÇLP metoduyla sepsis oluşturularak batın 2/0 ipekle kontünü sütürle kapatıldı. Tavşanlara İV NAC (Assist amp) 10 mg/kg/gün üç eşit dozda verildi. 12. saatte biyokimyasal tetkik, arteryel kan gazı, hemogram ve 24. saatte biyokimyasal tetkik, arteryel kan gazı, hemogram, aerop ve anaerop kan kültürleri için arteriyel kan örneği alındı. Alınan kanların yerine, 3 katı kadar serum fizyolojik her kan alınımını takiben iv olarak verildi. İşlemler sonucunda ölen tavşanların ölüm saati kaydedilip karaciğer, böbrek, akciğer doku örnekleri alınarak %10 formol çözeltisinde saklandı ve daha sonra histopatolojik olarak incelendi. Ayrıca karaciğer doku örneği alındı, fosfat tamponuna konuldu, derin dondurucuda -80 °C de saklanıp doku MDA çalışıldı.

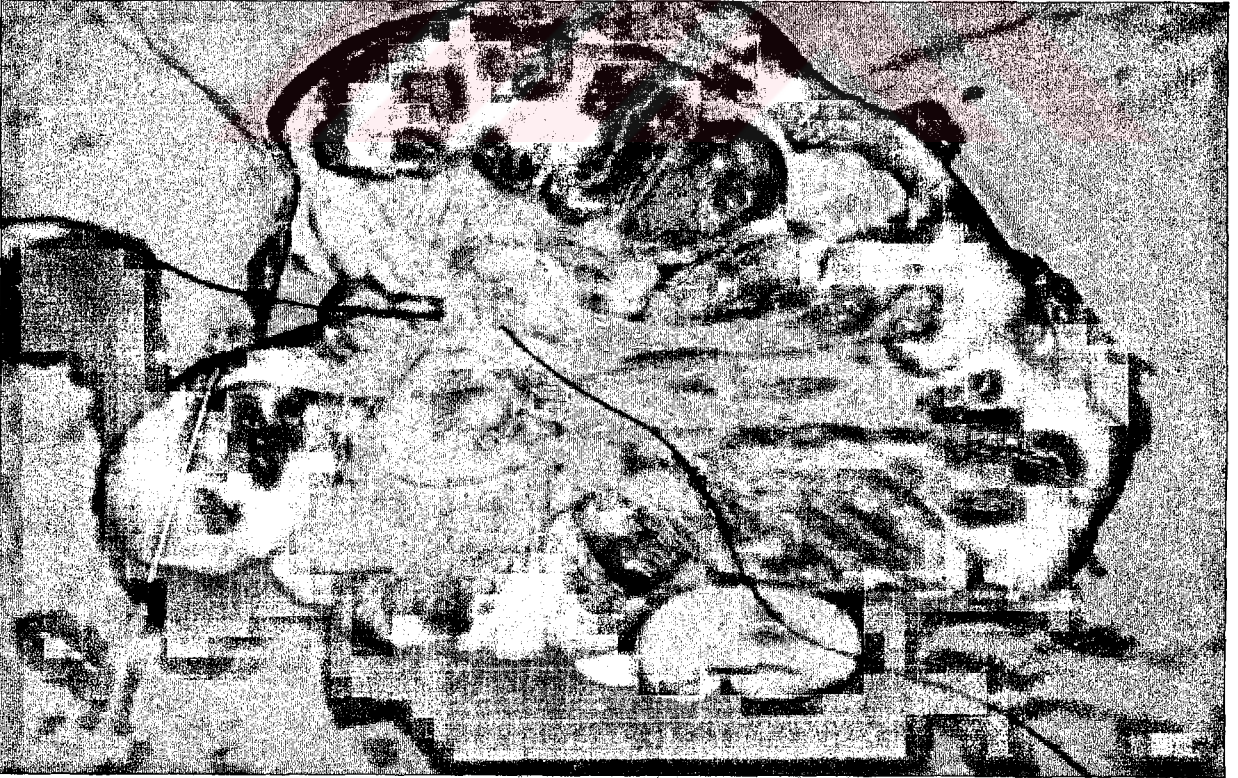
III.1. Operatif işlem

50mgr/kg İM ketamin hydrochloride (Ketodolar flk.) ve 15 mg/kg İM xylasin HCL (Rompun flk.) ile anestezi yapıldı. Tavşanların karın tıraşı ve betadin solüsyonu ile dezenfeksiyonundan sonra 3 cm'lik orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı. Sepsis oluşturmak için ratlarda ÇLP modeli seçildi (41). Laparotomi sonrası çekum izole edildi, çıkan kolon sıvazlanarak çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileocekal valvin altından 3/0 ipekle bağlanıp, çekum ön yüzü 22 numara intraket iğnesi ile iki defa delindi (Resim 1). Sham grubunda ÇLP uygulanmadı, sadece çekum eksplore edildi. Batın 2/0 ipekle devamlı sütürlerle kapatıldıktan sonra tavşanlar kafeslere konularak nemi, ısı ve ışığı kontrol altında

tutulan odalarda tutuldular. Tavşanlara ilaçları önceden belirlenen saatlerde verildi. Postoperatif 12. saatten itibaren standart tavşan yemi ve içme suyu almalarına izin verildi.

Tavşanlardan 12. ve 24. saatlerde arteriyel kan örnekleri alındı ve yerine alınan kanın 3 katı kadar serum fizyolojik iv olarak verildi. Tavşanlar ölüm saatleri için takibe alındı ve öldükleri anda laparotomi ve torakotomi yapılarak akciğerden, karaciğerden ve böbrekten yaklaşık 1'er gr ağırlığında doku örnekleri alındı. Alınan dokular %10 formol çözeltisi içinde saklandı. Heparinli enjektörlerle kan gazı çalışması için 1cc, Na-EDTA içeren tüplerde lökosit çalışması için 1cc, düz tüpe rutin biyokimyasal tetkik için 2cc, heparinli tüpe GSH çalışılmak üzere 3 cc ve heparinli tüpe MDA çalışılmak üzere 2cc kan örneği alındı. MDA düzeyleri tayini için alınan 2cc kan 3000 devir/dk'da 5 dakika santrifüje edilip plazmaları ayrıldı ve plazma -80 °C de derin dondurucuda saklandılar.

Resim 1. Çekal ligasyon-perforasyon yöntemi



III.2. Plazma GSH ölçümü

Deney 3 ml antikoagülanlı tam kanla yapılır. GSH konsantrasyonu çalışmasının yapılması için heparinli veya EDTA'lı antikoagülanlı kanın çöktürülmesini takiben aynı gün içinde çalışılır.

Deneyin yapılışı: Test tüpüne (10 ml'lik) 0.2 ml antikoagülanlı kan örneği alınarak konur, 1.8 ml distile su ilave edilir ve karıştırılır. Derhal 3 ml çöktürme solüsyonu (100 ml'sinde 1.67 gr gliasil metafosforik asit, 0.2 gr disodyum veya dipotasyum EDTA ve 30 gr NaCl distile su eklenerek hazırlanır) eklenerek karıştırılır ve 5 dk. oda ısısında bekletilir. Sonra coarse-grade filtre kağıdı ile süzülür, devamında küvette ajanlar hazırlanır. 2 ml filtrat, 1.2 ml çöktürücü ajan, 0.8 ml distile su, 8 ml sodyum fosfat solüsyonundan, 1 ml DTNB solüsyonu hazırlanır. Bunlar bir tüpde 3 defa altüst edilerek karıştırılır. Hazırlanan örneğin 4 dakika içinde 412 nm'deki absorpsiyonu okunur. Alınan kan örneğinin hematokritine bakılır. Ölçülen GSH kalibrasyonu filtrasyon adımından çıkarılır ve kalibratör eğrisi hazırlanır. GSH konsantrasyonu tayini kan örneğinden rakamsal olarak elde edilir. Bunun sonucunda GSH konsantrasyonu hesaplanır:

$$\text{GSH (mg/dl eritrositte)} = \text{GSH konsantrasyonu} \times \text{Kalibrasyon eğrisi} / \text{Hematokrit.}$$

III.3. MDA tayini

Plazma MDA ölçümü

Drapper ve Hadley (42) yöntemleri ile, TBA ile MDA'nın sıcak ve asidik ortamda oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm'deki absorpsiyonu okunup, molar absorpsiyon katsayısından faydalanılarak MDA konsantrasyonu hesaplanmıştır (Halliwell (43) Holley ve Cheseman (44)).

TBARS metoduna dayanan bir çok MDA tayin yöntemi vardır. Spektrofotometrik fluometrik ölçümler en sık kullanılan yöntemler olmasına karşın, bu yöntemleri arasında en hassas olanı yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC)'dir (Holley ve Cheseman (43)). Bu metotta TBA ile MDA sıcak ve asidik ortamda reaksiyona sokulur, oluşan kompleks HPLC kolonlarında ayrıştırılarak başka maddelerle interferans vermesi önlenir ve spektrofotometrede çok daha hassas bir şekilde ölçülür. En büyük dezavantajı pahalı olması ve her laboratuarda bulunmamasıdır. Bu nedenle çalışmamızda spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem Drapper ve Hadley (1990)'in yönteminin bir modifikasyonu olup, çift kaynatma esasına dayanır (Hammod ve arkadaşları 1995). Birinci ısıtmada bağlı olan MDA proteinlerden serbestleştirilerek proteinler çöktürülür, ikinci ısıtmada ise total MDA, TBA ile reaksiyona girer. TBA-MDA'nın oluşturduğu renkli kompleksin absorbansı 532 nm de ölçülerek MDA'nın molar absorpsiyon katsayısından yararlanılarak konsantrasyonu hesap edilir. Bu yöntemde de oluşabilecek hatalar ve etkileşimler en aza indirilmiştir.

Deneyin yapılışı: Kontrol ve numune olmak üzere iki deney tüpü hazırlandı. Her iki tüpe 2.5 ml %10'luk Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi kondu. Numune tüpüne 0.5 ml plazma, kontrol tüpüne ise 0,5 ml distile su eklendi. Tüpün ağzı kapatılıp 90 °C deki su banyosunda 15 dk. bekletildi. Sonra çıkartılarak her iki tüp soğuk su altında soğutuldu ve 3000 devir/dk' da 10 dk santrifüj edildi. Üstteki süpernatandan 2'şer ml başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine %0.675 lik TBA çözeltisinden 1 ml eklenerek ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra 90 °C de su banyosuna konuldu ve 15 dk bekletildikten sonra soğuk su altında soğutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı numunenin absorbansı ölçüldü. MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinksiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak nmol/ml cinsinden MDA değeri aşağıda belirtilen formülle hesaplanarak bulundu.

Dilüsyon faktörü = 9.09

$A = axbxc$ (A=absorbans, a=molar ekstinksiyon katsayısı, b=ışık yolu,

c = konsantrasyon

$c = A / axb$

$c = [A/(1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm})] \times \text{dilüsyon faktörü}$

$c = (A/1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}) \times 9.09$

$C \text{ (nmol/ml)} = A \times 58.27$

Doku MDA ölçümü

Tavşandan alınan ve -80°C de saklanan karaciğer parçaları çözündükten sonra 0.5 gr doku tartılır, 150 mM soğuk KCL kullanılır, %10'luk homojenat oluşacak şekilde homojenize edilir. Oluşan homojen karışım 10000 devir/dak'da 10 dakika santrifuj edildikten sonra üstteki çözüldüden mikroprotein çalışılır. Aynı zamanda oluşan homojenattan tüpe 0.1 ml alınır üzerine 0.2 ml %8.1 sodyum dodecylsülfat (SDS) solüsyonu, 1.5 ml %20 asetik asit solüsyonu (pH > 3 olacak şekilde NaOH ilave edilir) ve 1.5 ml % 0.8 TBA sıvı solüsyonu konur, vortekste karıştırılır. Oluşan karışım distile su içinde 95°C de 60 dakika kaynatılır. Daha sonra su altında soğutulur, 1 ml distile su ve 5ml n-butanol ve piridin (15:1,v/v) eklenir ve karışım çalkalanır. Oluşan karışım 4000 devir /dk'da 10 dk. çevrilir, üst tabakadaki karışımdan örnek alınarak 532 nm'de kör numune yerine homojenat ilave edilmemiş karışımdan konularak köre karşı absorbansı ölçülür. Sonuçta MDA konsantrasyonu şu formülle elde edilir:

$C = \text{Ölçülen absorbans} \times 320.5 \times \text{dilüsyon faktörü} / \text{homojenat mikroproteini} = \text{nmol/mg doku}$

III.4. Lökosit sayımı

Ca-EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinde STKS-BECKMAN COULTER, Laser System otomatik cihazıyla otomatik olarak lökosit sayımları yapıldı.

III.5. Kan gazları ölçümü

Heparinli enjektöre alınan 1cc kan örneklerinde otomatik olarak ABL 555 DATE BEHRİNG cihazıyla kan gazları ölçümü yapıldı. pH, PO₂, PCO₂, SaO₂, HCO₃ düzeyleri ölçüldü.

III.6. Kan kültürü yapılması

Yaklaşık 3ml arter kan örneği hazır Aerop Bactec Peds Plus/F besiyerine alındı. Laboratuvara gelen kan örnekleri BACTEC 9050 kan kültür sisteminde 5 gün süreyle 37°C'de inkübe edildi. Üreme sinyali veren örnekler cihazdan çıkarılarak % 5 koyun kanlı agara ve EMB (Eosin Methylene Blue) agara pasajları yapıldı. 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonunda üreyen koloniler gram boyama, klasik yöntem ve API (bio Mérieux, Inc./ Fransa) otomatize sistemle tanımlandı.

Anaerop kültür için yaklaşık 3ml arter kan örneği hazır BACTEC Plus + Anaerobic/F besiyerine hazır besiyerine alındı. Laboratuvara gelen kan örnekleri BACTEC 9050 kan kültür sisteminde 5 gün süreyle 35 °C'de inkübe edildi. Üreme sinyali veren örnekler cihazdan çıkarılarak %5 koyun kanlı agara ve EMB (Eosin Methylene Blue) agara pasajları yapıldı. Pasajlar 35 °C'de 36-48 saat anaerobik jar ortamda inkübe edildi, inkübasyon sonunda üreyen koloniler gram boyama, klasik yöntem ve API (bio Mérieux, Inc./ Fransa) otomatize sistemle tanımlandı.

III.7. Biyokimyasal değerlerin ölçümü

Karaciğer ve böbreklerde doku hasarı ve organ fonksiyonlarını belirlemek için otoanalizörle (olympus au 5200) serumda SGOT,SGPT, LDH, üre, kreatinin ve CRP değerleri kolorimetrik olarak ölçüldü.

III.8. Dokuların histopatolojik olarak değerlendirilmesi

Alınan doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonu içine kondular ve çalışma anına kadar saklandılar. Deneklerden alınan akciğer, karaciğer ve böbrek dokularından hazırlanan parafin bloklarından 5 mikron kalınlıkta kesitler alındı. Bu kesitler Hemotoksilen-Eosin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopu altında 40 ve 100 büyütmede incelendiler. İncelemeleri grupları bilmeyen bir patoloji uzmanı yaptı. Patolojik bulgular 0; normal, +1; hafif, +2; orta, +3; ağır olarak yorumlandılar.

Akciğer dokusunun histopatolojik kesitlerinde intraalveolar fibrin birikimi, nötrofil infiltrasyonu, interstisyel ödem, lenfoid hiperplazi, akciğer konjesyonu varlığı ve şiddeti değerlendirildi.

Karaciğer dokusunun histopatolojik kesitlerinde hidropik dejenerasyon, Kupffer hücre hiperplazisi, apopitoz, mononükleer hücre infiltrasyonu ve nötrofil infiltrasyonu varlığı ve şiddeti değerlendirildi.

Böbreklerin kesitlerinde Bowman kapsül aralığındaki genişleme, vakuolizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve tübül hücre ödemi varlığı ve şiddeti değerlendirildi.

III.9. Sepsisle yaşam süreleri tespiti

Çalışma gruplarındaki tüm tavşanlar ÇLP sırasında operasyon saati formlarına kaydedildi. Tavşanların ölüm saatleride aynı deftere kaydedilerek operasyondan sonra yaşam süreleri saat olarak hesaplandı.

III.10. İstatistiki analizler

Veriler önceden hazırlanan formlara kaydedildi. Kaydedilen veriler kodlanarak bilgisayar ortamına aktarıldı. İstatistiksel analizler “SPSS for Windows 10.0” programı yardımıyla yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Post Hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. Non parametrik verilerin analizinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların ortalama ve standard sapma değerleri hesaplandı, tablolar halinde verildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



IV.BULGULAR

IV.1. Plazma GSH, MDA ve karaciğer doku MDA sonuçları

NAC ve sham grupları 12.saat plazma GSH değerleri açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12.saat plazma GSH değerlerinin NAC ve sham gruplarında sepsis grubuna göre arttığı saptandı ($P<0.05$). Grupların 24. saat plazma GSH değerleri açısından ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$) (Tablo 5). NAC ve sham grupları 12. saat plazma MDA değerleri açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma MDA değerlerinin NAC ve sham gruplarında sepsis grubuna göre azaldığı saptandı ($P<0.05$). Grupların 24. saat plazma MDA değerleri açısından ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$) (Tablo 5).

Tablo 5. Grupların plazma GSH, plazma MDA ve karaciğer MDA düzeyleri ortalamaları

	Sham grubu		Sepsis grubu		NAC grubu	
	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat
Plazma GSH ($\mu\text{mol}/\text{dl}$)	24,07 \pm 1,6*	26,36 \pm 3,1	16,21 \pm 1	23,83 \pm 1,1	28,11 \pm 1,8*	25,17 \pm 1,3
Plazma MDA (nmol/ml)	8,93 \pm 0,25*	8,81 \pm 1,09	10,85 \pm 0,46	9,42 \pm 0,66	7,3 \pm 0,18*	9,56 \pm 0,43
Karaciğer MDA (nmol/ml)	2,51 \pm 0,29		3,20 \pm 0,45*		4,30 \pm 0,44*	

*= $P<0.05$

NAC ve sham grupları karaciğer dokusu MDA değerleri açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında, karaciğer dokusu MDA değerlerinin sepsis grubuna göre arttığı saptandı ($P<0.05$) (Tablo 5).

IV.2. Arteriyel kan gazı sonuçları

Grupların 12. ve 24. saat arteriyel kan pH değerleri ve 12. saat PO₂ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (P>0.05) (Tablo 6). NAC ve sham grupları arteriyel kan açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 24. saat arteriyel kan PO₂ değerlerinin sepsis grubuna göre yüksek olduğu saptandı (P <0.05) (Tablo 6).

Tablo 6. Grupların arteriyel kan pH, PO₂, PCO₂ ve SaO₂ ortalama değerleri

	Sham grubu		Sepsis grubu		NAC grubu	
	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat
pH	7,32±0,4	7,30±0,2	7,26±0,17	7,23±0,26	7,26±0,04	7,37±0,02
PO ₂ (mmHg)	71,1±22,7	75,8±8,6*	65,1±21	45,5±21,7	75,24±7,31	79,18±7,16*
PCO ₂ (mmHg)	33,1±11,4	33,5±6,5	42,7±28,9	48,7±25,9	40±3,6	38,97±3,13
SaO ₂ (%)	85,6±16,1*	94,5±2,2	71,5±19	64,8±34*	92,71±2,15*	90,22±3,41

*= P<0.05

Grupların 12. ve 24. saat arteriyel kan PCO₂ değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (P>0.05) (Tablo 6). NAC ve sham grupları arteriyel kan SaO₂ değerleri açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında, 12. saat arteriyel kan SaO₂ değerlerinin sepsis grubuna göre yüksek olduğu saptandı (P<0.05). Sepsis grubu arteriyel kan SaO₂ değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında 24. saat arteriyel kan SaO₂ değerlerinin sepsis grubunda sham grubuna göre düşük olduğu saptandı (P<0.05) (Tablo 6).

IV.3. Biyokimyasal parametre sonuçları

NAC ve sepsis grupları 12. saat plazma LDH değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma LDH değerlerinin NAC ve sepsis gruplarında sham

grubuna göre arttığı saptandı ($P<0.05$). Sepsis grubu 24. saat plazma LDH değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma LDH değerlerinin sepsis grubunda sham grubuna göre arttığı saptandı ($P<0.05$) (Tablo 7). NAC grubu 12. saat plazma SGOT değerleri açısından sham ve sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma SGOT değerlerinin sham ve sepsis gruplarına göre arttığı saptandı ($P<0.05$). Grupların 24. saat plazma SGOT değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$) (Tablo 6).

Tablo 7. Grupların plazma SGOT, SGPT, LDH ve CRP ortalama değerleri

	Sham grubu		Sepsis grubu		NAC grubu	
	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat
SGOT (U/L)	26,8±16,2	40,2±5,5	46,8±11,6	64,7±40,8	120,7±68,8*	55,2±9,3
SGPT (U/L)	44±6	48,8±9,6	68,4±10,6	75,2±12,2	167±97,8*	99,7±51,9*
LDH (mg/dl)	510±215	702±135	1087±259	1310±487	1387±523	1045±348
CRP (U/L)	2,28±0,27	2,76±0,83	29,8±20,3	42,9±15	43,1±23,7	51±28,6

*= $P<0.05$

NAC grubu 12. saat plazma SGPT değerleri açısından sham ve sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma SGPT değerlerinin sham ve sepsis gruplarına göre arttığı saptandı ($P<0.05$). NAC grubu 24. saat plazma SGPT değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında 24. saat plazma SGPT değerlerinin sham grubuna göre arttığı saptandı ($P<0.05$) (Tablo 7). NAC ve sepsis grupları 12. ve 24. saat plazma CRP değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında 12. ve 24. saat plazma CRP değerlerinin sham grubuna göre arttığı saptandı ($P <0.05$) (Tablo 7).

Grupların 12. ve 24. saat plazma üre değerleri açısından ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$) (Tablo 8). NAC grubu 12. saat plazma kreatinin değerleri açısından sham ve sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma kreatinin değerlerinin sham ve gruplarına göre arttığı saptandı ($P<0.05$). Grupların 24. saat plazma kreatinin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Grupların plazma üre, kreatinin, lökosit düzeyleri ve deneklerin yaşam süreleri ortalama değerleri

	Sham grubu		Sepsis grubu		NAC grubu	
	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat
Lökosit (mg/dl)	8,68±2,32	10,80±1,98	8,5±1,8	10,7±4	8,7±1,2	13,5±1,2
Üre (mg/dl)	47,2±21,7	50,2±19,9	69±29,7	72±36,8	67,3±16,3	70,2±19,5
Kreatinin (k/UL)	0,96±0,28	1,3±0,18	1,2±0,6	1,3±1,2	2,08±0,75*	1,5±0,27
Yaşam süreleri (saat)	-		24,1±5,2		25,5±14,1	

*= $P<0.05$

IV.4. Lökosit sonuçları

Grupların 24. saat lökosit sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($P >0.05$) (Tablo 8).

IV.5. Sepsisle yaşam süreleri tespiti

Sepsis gruplarının ÇLP oluşturulduktan sonra ortalama yaşam saatleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$) (Tablo 8).

IV.6. Kan kültürü sonuçları

Sepsis grubunda yapılan aerop kan kültürü sonucunda Streptococcus mitis ve E. Coli ürerken, NAC grubunda Enterobacter cloaca ve S.aureus üredi. Grupların aerop kan kültür sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi Yapılan anaerop kültürlerde üreyen bakteriler fakültatif aerop olduğu için üremelerinde anlamlılık tespit edilmedi ($P>0.05$).

IV.7. Histopatolojik bulgular

IV.7.1. Akciğerde tespit edilen histopatolojik değişiklikler (Resim 2)

Sepsis grubuyla NAC grubu arasında akciğerdeki intraalveolar fibrin birikimi, akciğerdeki nötrofil infiltrasyonu, akciğerdeki intersitisyel ödem, akciğerdeki lenfoid hiperplazi ve akciğer konjesyonu derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$).

IV.7.2. Karaciğerde tespit edilen histopatolojik değişiklikler (Resim 3)

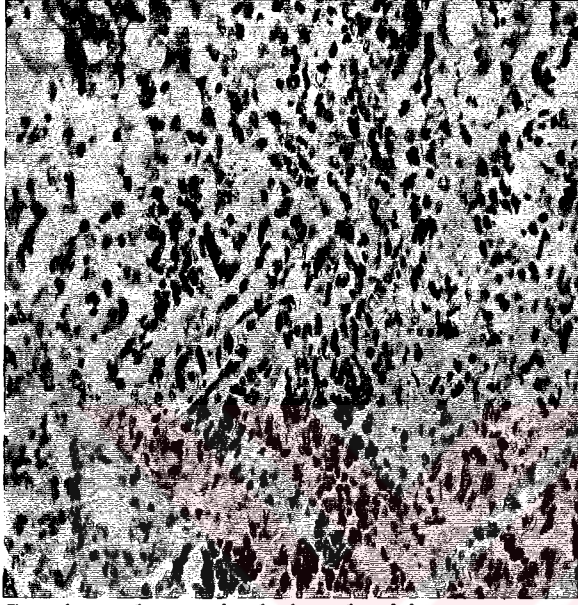
Sepsis grubuyla NAC grubu arasında karaciğerdeki hidropik dejenerasyon, Kupffer hücre hiperplazisi, mononükleer hücre infiltrasyonu ve nötrofil infiltrasyonu derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$). NAC grubuyla Sepsis grubu karaciğerdeki apopitoz derecesi açısından karşılaştırıldığında ise, karaciğerdeki apopitoz derecesinin NAC grubunda sepsis grubuna göre daha düşük olduğu saptandı ($P<0.05$).

IV.8.3. Böbrekte tespit edilen histopatolojik değişiklikler (Resim 4)

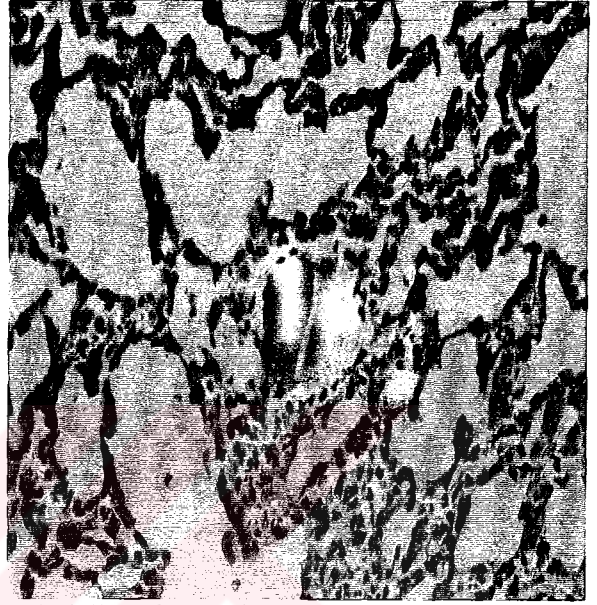
Sepsis grubuyla NAC grubu arasında böbrekteki Bowman aralığında genişleme, böbrek tübül hücrelerinde dejenerasyon ve böbrekteki vakuolizasyon derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$). Buna karşılık NAC

grubunun böbrekteki mononükleer hücre infiltrasyonu derecesinin sepsis grubuyla karşılaştırılmasında böbrekteki mononükleer hücre infiltrasyonu derecesinin NAC grubunda sepsis grubuna göre daha düşük olduğu saptandı ($P<0.05$).

Resim 2 Sepsis ve NAC grubuna ait akciğer histopatolojik İncelemesi

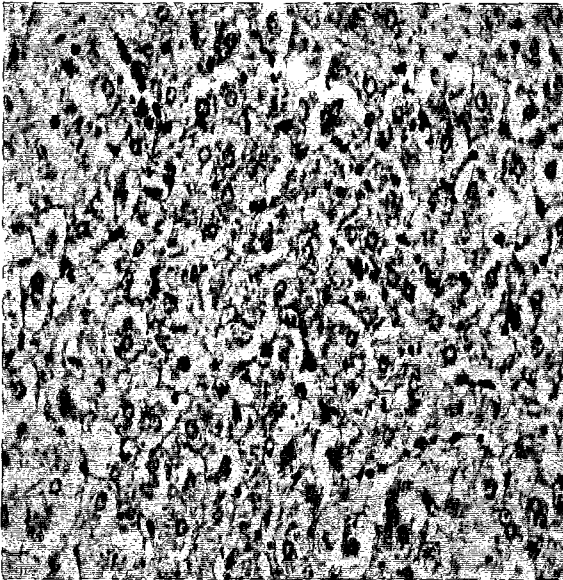


Sepsis grubuna ait akciğer kesiti

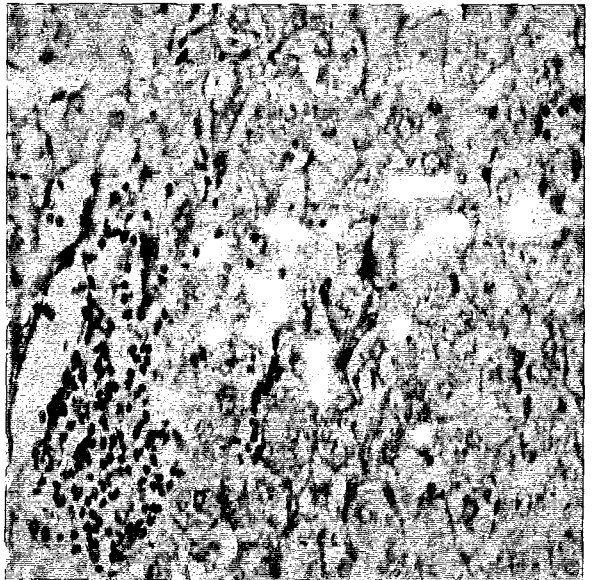


NAC grubuna ait akciğer kesiti

Resim 3. Sepsis ve NAC grubuna ait karaciğer histopatolojik incelemeesi

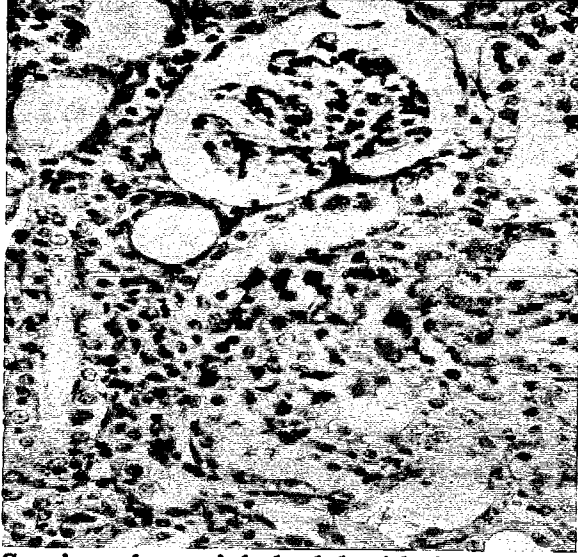


Sepsis grubuna ait karaciğer kesitleri

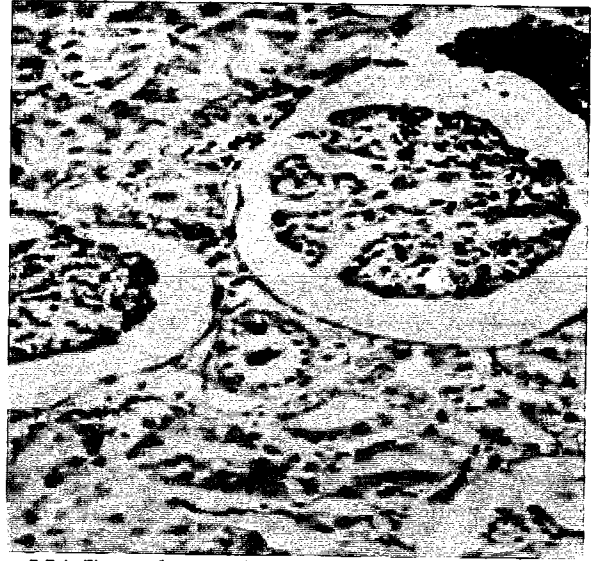


NAC grubuna ait karaciğer kesitleri

Resim 4. Sepsis ve NAC grubuna ait böbrek histopatolojik incelemesi



Sepsis grubuna ait böbrek kesitleri



NAC grubuna ait böbrek kesitleri



V. TARTIŞMA

Septik peritonitli ratlarda diyafram kasının kasılma gücü ve dayanıklılığı azalmıştır. Sepsiste ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin etkilerini nötralize etmek için uygulanan antioksidan ajanların (alfa tokoferol analogları) sepsiste sağ kalımı uzattığı gösterilmiştir (45).

Serbest oksijen radikalleri sepsis patogeneğinde önemli rol oynar. Antioksidan ajanların sepsis veya endotoksemi tedavisinde hücresel yarananmayı azaltarak etkili olduğu, serbest oksijen radikallerinin aktivitesinin ölçülmesiyle gösterilmiştir (46).

Hücresel antioksidan bir ajan olan NAC'in septik hastalar, SIRS'lı hastalarda kullanımı insan, hayvan ve laboratuvar çalışmalarında (sitopatojenik serbest oksijen radikallerine glutatyon ile birlikte olumlu etkisi) gösterilmiştir (47).

Serbest radikal reaksiyonları vücutta istenmeyen bir takım değişikliklere neden olur. Bu süreç, genetik ve çevresel etmenlerin üzerine eklenmesiyle kişisel farklılıklar gösterebilir. Serbest radikallerin organizma için fagositoz gibi yararlı işlevleri vardır. Bununla birlikte, aşırı miktarda bulunmaları başta lipidler ve glikoproteinler olmak üzere hücresel yapılar üzerine toksik etki yapmaktadır (48-52). Serbest radikal seviyelerinin tespiti serbest radikallerin ileri derecede reaktif olmaları, normal koşullarda ömürlerinin kısa olması ve düşük yoğunlukta bulunmaları nedeniyle oldukça güçtür (53). Genellikle biyolojik serbest radikal reaksiyonları sonucunda oluşan lipid peroksidasyon ürünleri, özellikle son ürün olan MDA seviyesi serbest radikal seviyeleri hakkında fikir verir. Ayrıca koruyucu antioksidan savunma sistemi elemanlarının incelenmesi, serbest radikaller ve oluşturdukları doku harabiyeti hakkında fikir verir. Glutatyon seviyesini arttırarak etkisini gösteren NAC'in etkinliğini belirlemek amacıyla plazma GSH ve MDA düzeyleri oluşan SOR hakkında bilgi vericidir.

İnsanlarda MDA düzeyi HPLC ile normal değerleri 5.0 ± 0.4 nM'dur. GSH ve NAC verilen erken sepsisli hastalarda plazma MDA seviyesi tedavi almayan gruba göre anlamlı düzeyde düşük gözlenmiştir. Plazma GSH düzeyi tedavi almayan gruba göre anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (54).

Plazma MDA seviyesi ratlarda Satoh metoduyla 1.8 ± 0.2 nmol/ml olarak tespit edilmiştir ve antioksidan ajan vermekle plazma MDA düzeyleri anlamlı ölçüde düşmüştür (55). Normal ratlarda ölçülen MDA (MDA-TCA metoduyla) değeri 1.75 ± 0.11 nmol/ml, sepsis oluşarlarda 3.8 ± 0.2 nmol/ml olarak ölçülmüştür (56). Ratlarda normal plazma MDA değeri $0,94$ nmol/ml olarak ölçülmüştür. Alkol stresi altında NAC verilmesi sonucu serum plazma MDA değerleri herhangi bir işlem yapılmamış kontrol grubu değerleriyle aynı düzeyde ölçülmüştür (57).

Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi plazma MDA düzeylerini düşürmüştür (38,39,58). Ventilator desteğindeki yoğun bakım hastalarında NAC verilmesi plazma MDA düzeylerini etkileyerek lipid peroksidasyon ürünleri, trakeal mukus ve klinik durumunu etkileyerek daha iyi klinik sonuçlar alınmasını sağlamıştır (40). Ratlarda yapılmış olan bir deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi plazma MDA düzeylerini düşürmüştür (37). Sepsisli hamsterlerde ölçülen plazma MDA düzeyi antioksidan ajan vermekle azalmıştır (59).

Çalışmamızda plazma MDA değeri hiçbir işlem yapılmayan Sham grubunda 12. saatteki ölçülen ortalama değeri $8,93$ nmol/ml ve 24. saatteki ortalama değeri 8.81 nmol/ml bulundu. Herhangi bir tedavi verilmeyen ÇLP metodu ile sepsis oluşturulan sepsis grubunda 12. saatte ölçülen plazma MDA değeri ortalama 10.85 nmol/ml, 24. saatte ölçülen değeri ortalama 9.42 nmol/ml ölçüldü.

NAC tedavisi verilen grupta 12. saatte ölçülen plazma MDA değeri ortalama 7.3 nmol/ml ve 24. saatte ölçülen ortalama değeri 9.56 nmol/ml olarak ölçüldü. NAC tedavisinin 12. saat değerleri gözönüne alındığında tedavinin etkili olduğu ve bunun yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi. Fakat 24. saat değerlerindeki değişimin artma yönünde olması diğer çalışmalarla uyumlu değildi. Bunun sebebi olarak NAC tedavisinin erken dönemde etkili olduğu, ilaç dozunun düşük olduğu, sepsisin ilerleyen saatlerinde etkisini kaybettiği ve kombine tedavilerde etkili olabileceği düşünüldü.

Ratlarda normal karaciğer MDA değeri 49 nmol/100mg protein olarak ölçülmüştür. Alkol stresi altında NAC verilmesi sonucu karaciğer MDA değerleri herhangi bir işlem yapılmamış kontrol grubu değerleriyle aynı düzeyde ölçülmüştür (57). Tavşan karaciğer dokusundaki MDA düzeyi $1,75 \pm 0,18$ nmol/g doku olarak bulunmuştur (38).

Sham gurubuna ait karaciğer doku MDA değerleri ortalama 2,51 nmol/ml olarak ölçüldü. Herhangi bir tedavi verilmeyen sepsis grubunda ölçülen karaciğer doku MDA değeri ortalama 3,20 nmol/ml olarak ölçüldü. Antioksidan ajan olarak verilen NAC verilen gruplarda karaciğer doku MDA değerleri ortalamasının sepsis grubuna göre azalması beklenirken, özellikle NAC gurubunda anlamlı düzeyde artma oldu. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla uyumlu değildi. Bunun sebebi olarak verilen ilacın 10mg/kg/gün dozunun karaciğerde hasara neden olduğu düşünüldü. Bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması aydınlatıcı olacaktır.

Farelerde yapılan bir çalışmada normal GSH düzeyi $4,71 \pm 0,32$ μ mol/dl olarak bulunmuştur (60). Bir başka yapılan mice çalışmasında herhangi bir işlem yapılmamış deneklerin plazma GSH düzeyleri $19,0 \pm 1,8$ μ mol/L olarak bulunmuştur (61). Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi GSH aktivitesini arttırmıştır (62,63). Tavşanlarda NAC

verilmesi ile GSH ve serbest radikal toplayıcılar artmıştır (64). Endotoksemik ratlarda NAC tedavis plazma GSH aktivitesini arttırmıştır (40,65).

Plazma GSH değeri sham grubunda 12. saat değeri ortalama 24,07 $\mu\text{mol/dl}$ ve 24. saat değeri ortalama 26,36 $\mu\text{mol/dl}$ olarak ölçüldü. Sepsis grubunda 12.saat değeri ortalama 16,21 $\mu\text{mol/dl}$ ve 24. saat değeri ortalama 23,83 $\mu\text{mol/dl}$ olarak ölçüldü. Sepsis grubunda oksidatif strese bağlı olarak GSH değeri azaldı. Antioksidan ajan olarak verilen NAC verilen grupta sepsis grubuna göre plazma GSH düzeyinin yüksek olması diğer çalışmalarla uyumaktadır. Vermiş olduğumuz NAC'in serbest radikaller üzerine anlamlı düzeyde etkisi bulundu.

ÇLP metoduyla ratlarda oluşturulan sepsis modelinde antioksidan verilmesi sonucu hayatta kalma süresi uzamıştır (66). Sepsiste antioksidan tedavi endojen antioksidanların etkinliğini artırıp klinik düzelmeyi hızlandırmaktadır (67). Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi makrofaj fonksiyonlarını düzenleyip süperoksid ürünleri ve TNF alfa üzerinden hayatta kalma süresini uzatmaktadır (68). Ventilatör desteğindeki yoğun bakım hastalarında NAC verilmesi plazma GSH ve MDA düzeylerini etkileyerek, lipid peroksidasyon ürünleri, trakeal mukus ve klinik durumunu etkileyerek daha iyi klinik sonuçlar alınmasını sağlamıştır (69).

Tavşanlarda oluşturulan (intraperitoneal E.Coli injeksiyonu ile) septik şok modelinde uygulanan antioksidan (sodium thiosulfate, alpha-tocopherol, desferoksamine ve diethyldithiocarbamate) tedavi sonucunda, sadece antioksidan tedavinin oluşan septisemiye düzeltmediği gösterilmiştir (70). Deneysel sepsis modelinde NAC kullanımının immun yanıt ve sepsis sonucu lenfositlerden salınan endotoksinlere karşı oluşan yanıtı da arttırmış ve sepsisin oluşturduğu oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (71).

Sepsisli deneklerin yaşam süreleri sepsis grubunda ortalama olarak 24.1 saat iken, NAC grubunda ortalama olarak 25.5 saat olarak tespit edildi. NAC grubunun sepsis grubuna göre yaşam süresi ortalamasının sepsis grubuyla yaklaşık aynı olmasının NAC tedavisinin tek başına etkili olmamasına, verilen 10mg/kg/gün dozunun yetersiz olmasına ve verilen tedavi süresinin kısa olmasına bağlandı.

ÇLP modeliyle oluşturulan sepsiste NAC kronik kullanımı (1 hafta) akciğer dokusundaki sepsise bağlı apoptozu antioksidan ve antiinflamatuvar etkiyle önlemiştir (72). NAC'in yoğun bakım hastalarında nötrofil fagositozunu arttırdığı, bakterilerin hücrelere adezyonu, fagositozu ve bakteriyel akciğer zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir (73). Erken septik şokta NAC verilmesi akciğer fonksiyonlarında düzelme sağlamaktadır (74). ARDS gelişen hastalarda yapılan çalışmada NAC verilmesi arteriyel PO₂'i düzeltmiş ve bunun sonucunda hastanın ventilator desteği süresini kısaltmıştır (75). Erken septik şokta NAC ve glutatyon verilmesi peroksidatif stresi azaltmaktadır (76).

Çalışmamızda NAC PO₂ değerlerini düzeltmede diğer çalışmalarla uyum gösterdi. NAC tedavisinin kan PCO₂ değerleri açısından herhangi bir etkisi olmadı. NAC kan SaO₂ değerlerini normale çekerek, kan SaO₂ değerlerine olan etkisiyle diğer yapılan çalışmalarla uyum gösterdi.

Gram (-) sepsiste serum CRP değerlerinin arttığı bilinmektedir (77,78). Deneysel sepsis çalışmalarında NAC tedavisi ile plazma CRP seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (79). Çalışmamızda sham grubuna göre sepsis grubunda serum CRP değerlerinin yüksek seyretmesi diğer çalışmalarla uyumluydu. NAC verilen grupta serum CRP düzeylerinin artması ilacın serum CRP değerini etkilemediğini düşündürdü. Bu sonuç diğer yapılan çalışmalarla uyum göstermedi. Bu uyumsuzluğun nedeni olarak ilacın 10mg/kg/gün dozunun az olması ve uygulama azlığı düşünüldü.

ÇLP ve endotoksemi ile oluşturulan sepsis modelinde renal disfonksiyon ile üre ve kreatinin düzeyleri artmıştır (80). Çalışmamızda üre ve kreatinin değerleri sham grubuna göre sepsis gruplarında yüksek seyretti. NAC grubunda sepsisle aynı düzeyde üre değerlerinin olması, ilacın diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında bu değerler üzerine etkili olmadığını düşündürdü. Özellikle kreatinin değerlerinde olumsuz etkileri olduğu ve bu olumsuzluğun ilacın 10mg/kg/gün dozuyla ilgili olduğu düşünüldü.

ÇLP ve endotoksemi ile oluşturulan sepsis modelinde hepatosellüler disfonksiyon ile SGOT ve SGPT değerleri artmaktadır (81-83). Çalışmamızda sepsis gruplarında SGOT değerleri sham grubuna göre artmıştır. NAC tedavisinin plazma SGOT değerleri üzerine olumsuz etkileri oldu. Bu olumsuz etkinin sepsisle birlikte ilacın karaciğer üzerine olan toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünüldü.

NAC tedavisinin plazma SGPT değerleri üzerine olumsuz etkileri olduğu ve bu olumsuz etkinin sepsisle birlikte ilacın karaciğer üzerine olan toksik etkilerinden kaynaklandığını düşünüldü.

NAC tedavisinin LDH ve lökosit değerleri üzerine herhangi bir etkisi bulunmadı. Bunun yanında biyokimyasal parametreler üzerine olumsuz etkileri olduğu gözlemlendi.

Sepsis grubunda *Streptococcus mitis* ve *E.coli* ürerken, NAC grubunda *Enterobacter cloaca* ve *S.aureus* üredi. Anerop kan kültürlerinde üreyen bakteriler fakültatif aerob olduğu için üremelerinde anlamlılık tespit edilmedi. Kan kültürlerinde üreme olmaması, ardışık kan kültürleri alınamamasına ve sepsiste her zaman kan kültüründe üreme olmamasına bağlandı.

ÇLP modeliyle oluşturulan sepsiste NAC'in kronik kullanımında (1 hafta) akciğer dokusundaki sepsise bağlı apoptozu antioksidan ve antiinflamatuvar etkiyle önlemiştir (72). NAC'in yoğun bakım hastalarında nötrofil fagositozunu arttırdığı bakterilerin

hücrelere adezyonu, fagositozu ve bakteriyel akciğer zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir (73). ÇLP metoduyla yapılan sepsis modelinde akciğerde nötrofil infiltrasyonunun arttığı gözlenmiştir. NAC tedavisi alan grupta da sonuçların ÇLP grubundan histopatolojik olarak farklı olmadığı görülmüştür. Yalnız akciğer epiteliyal hücre apoptozunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görülmüştür (84).

Ratlarda endotoksin verilmesiyle oluşturulan sepsis modelinde alveolar ve interstisyel hemoraji, ödem ve lökosit infiltrasyonu gözlenirken; yüksek doz (275mg/kg/gün-48 saat) NAC verilen gruplarda histopatolojik bulguların gerilediği gözlenmiştir (85).

Çalışmamızda grupların akciğer histopatolojik incelemelerinde intraalveolar fibrin birikimi, nötrofil infiltrasyonu, interstisyel ödem, lenfoid hiperplazi, akciğer konjesyonu derecesi açısından sepsis grubuyla NAC grubu arasında farklılık görülmedi. NAC tedavisinin diğer yapılan çalışmalardaki gibi olumlu etkilerinin olmayışı, ilaç dozlarının düşük olmasına bağlandı. Bu konuda kapsamlı çalışmaların yapılması aydınlatıcı olacaktır.

Çalışmamızda grupların karaciğer histopatolojik incelemelerinde karaciğerdeki hidropik dejenerasyon, Kupffer hücre hiperplazisi, mononükleer hücre infiltrasyonu ve nötrofil infiltrasyonu derecesi açısından sepsis grubuyla NAC grubu arasında farklılık görülmedi. NAC tedavisinin karaciğer histopatolojik incelemelerinde sepsis grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer apoptozu dışında anlamlı düzeyde katkısı olmadığı düşünüldü. Beklenenin aksine karaciğer histopatolojik incelemelerinde anlamlı farklılık olmamasının, ilacın ve sepsisin karaciğer üzerine olan toksik etkilerine bağlı olduğu düşünüldü.

Çalışmamızda grupların böbrek histopatolojik incelemelerinde Bowman aralığında genişleme, böbrek tübül hücrelerinde dejenerasyon ve böbrekteki vakuolizasyon derecesi açısından sepsis grubuyla NAC grubu arasında farklılık görülmedi. NAC tedavisinin böbrek histopatolojik incelemelerinde sepsis grubuna göre böbrek mononükleer hücre infiltrasyonu haricinde anlamlı düzeyde katkısı olmadı. Verilen NAC tedavisiyle, böbrek histopatolojik incelemelerine olumlu etkisinin olmaması, ilacın 10mg/kg/gün dozunun düşük olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Deneklerin yaşam süreleri değerlendirmesinde NAC tedavisi alanlar ile tedavi almayan sepsis grubunun yaşam süreleri değerleri yakın bulundu. NAC tedavisinin yaşam süresini uzatmada etkinliği tespit edilmedi. Deneklerin yaşam sürelerinin sepsis grubuyla benzer olmasının, ilacın biyokimyasal parametreler ve doku hasarlarını önlemede etkisiz olmasına bağlı olduğu düşünüldü.

NAC tedavisinin sepsiste plazma GSH, MDA, arteriyel kan PO₂ ve SaO₂ değerleri dışındaki bakılan kan parametrelerine anlamlı düzeyde olumlu katkısı olmadı. NAC tedavisinin beklenenin aksine sepsis tedavisinde etkinliğinin az olmasının nedeninin, düşük (10mg/kg/gün) dozda verilmesine bağlı olduğu düşünüldü. NAC tedavisinin sepsis tedavisi için doz hesaplaması NAC'ın (Assist amp) prospektüs bilgileri ve rutin kullanımdaki dozu baz alınarak yapılmıştır. Sepsis modelinde uygulanan NAC dozu 75 mg/kg/gün (54), antioksidan etkinlik için en az 275 mg/kg/gün ve en fazla da 950mg/kg/gün/48saat olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (86). Deneysel sepsis modelinde NAC tedavisi dozunun bu değerlerin dikkate alınmasıyla, sepsis tedavisinde antioksidan bir ajan olarak NAC'inde yeri tartışılabilir.

Sonuç olarak; deneysel sepsis modelinde antioksidan ajan olan NAC'in düşük doz uygulanmasında serbest oksijen radikallerinin plazma düzeylerine ve arteriyel kan gazı

sonuçlarına olumlu etkileri mevcuttur. Sadece serbest oksijen radikalleri üzerine etkileri hedeflendiğinde verilen doz yeterlidir ve daha yüksek dozlar verilmesi gereksizdir. NAC'in sepsisin neden olduğu organ fonksiyon anormalliklerini düzeltmede ve akciğer, karaciğer ve böbrekteki doku hasarını önlemede etkisiz olduğu tespit edildi. NAC'in biyokimyasal parametreler ve doku hasarını önlemek için daha yüksek dozlara gereksinim vardır. Çalışmamızda dstk doz uygulanmasına rağmen karaciğer ve böbrek üzerine olan olumsuz etkilerin yüksek doz uygulamalarında daha da fazla olacağı dşnlmş ve bu nedenden dolayı da düşük doz tercih edilmiştir. NAC'in organ fonksiyon ve doku hasarlarını önlemedeki etkinliğini belirlemek için, yüksek dozda yapılacak yeni çalışmalar olası olumlu etkilerini daha da belirgin hale getirecektir. Böylece sepsis tedavisinde NAC'in önemi, etkinliği ve etkin dozu değerlendirilecektir.

VI. ÖZET

Tavşanlarda Oluşturulan Deneysel Sepsis Modelinde Düşük Doz N-Asetilsistein

Tedavisinin Etkinliği

Amaç: Deneysel sepsis modelinde antioksidan bir ajan olan N-asetilsistein'in (NAC) serbest oksijen radikalleri ve plazma düzeylerine olan etkilerini belirlemektir. NAC'in sepsisin neden olduğu organ fonksiyon bozuklukları, akciğer, karaciğer ve böbrekteki doku hasarını önlemedeki rolü araştırıldı.

Materyal ve metod: Çalışmada Yeni Zelanda tipi 30 diş tavşan kullanıldı. Tavşanlar 10'arlı gruplara ayrıldılar. Tavşanlarda çekum ligasyon perforasyon (ÇLP) yöntemiyle sepsis oluşturuldu. Sham grubu, sepsis grubu ve sepsis + NAC (10 mg/kg/gün) şeklinde gruplar oluşturulup, ilaçları ÇLP'den hemen sonra, 12.ve 24. saatte verildi. Aynı saatlerde kan gazları, plazma glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA), SGOT, SGPT, LDH, CRP, üre, kreatinin ve lökosit değerleri tayini için kan örnekleri alındı. Ayrıca doku hasarını belirlemek, karaciğer dokusunda MDA tayini, akciğer, karaciğer ve böbrekten histopatolojik inceleme için deneklerin ölümünü takiben doku örnekleri alındı.

Bulgular: Sepsis grubuyla kıyaslandığında NAC grubunda plazma GSH artmış ($P<0.05$) ve MDA değerleri azalmış bulundu ($P<0.05$). NAC grubundaki karaciğer doku MDA düzeyleri sepsis grubuyla aynı olarak bulundu. NAC grubu ve sepsis grubunda lökosit, LDH, CRP ve üre değerleri aynı derecede artmış olarak bulundu ve gruplararası anlamlı farklılık tespit edilmedi. NAC grubunda SGOT, SGPT ve kreatinin değerleri sepsis grubuna göre artmış bulundu ($P<0.05$). NAC grubunun arteriyel kan PO_2 ve SaO_2 değerleri sepsis grubuna göre artmış bulundu ($P<0.05$). NAC grubunun arteriyel kan PCO_2 değerleri sepsis grubu ve sham grubu arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. NAC grubunun akciğerin histopatolojik bulguları açısından sepsis grubuyla

karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı. NAC grubunda karaciğerin histopatolojik incelemesinde apoptoz derecesi sepsis grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştı ($P<0.05$). NAC grubu ile sepsis grubu arasında karaciğer hidropik dejenerasyon, Kuppfer hücre hiperplazisi, karaciğer mononükleer hücre infiltrasyonu, karaciğer nötrofil infiltrasyonu derecesi yönünden anlamlı farklılık gözlenmedi. NAC grubunun böbrekteki mononükleer hücre infiltrasyonu derecesi sepsis grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olarak bulundu ($P<0.05$). NAC grubu ile sepsis grubu arasında böbrek Bowman kapsül aralığındaki genişleme, böbrek vakuolizasyon, ve tubulus hücre ödemi derecesi yönünden anlamlı farklılık saptanmadı. Yaşam süresi karşılaştırıldığında ise sepsis grupları arasında anlamlı farklılık görülmedi.

Sonuç: Deneysel sepsis modelinde antioksidan bir ajan olan NAC'in düşük doz uygulanmasında plazma MDA, GSH düzeylerine ve akciğer fonksiyonlarına olumlu etkileri mevcuttur. Düşük doz NAC tedavisi, sepsise bağlı organ fonksiyon anormallikleri, akciğer, karaciğer ve böbrekteki doku hasarını önlemede etkili olmamıştır. Daha kapsamlı ve yeni çalışmalarla NAC'in değişik dozlarda verilmesiyle sepsis tedavisinde NAC tedavisinin önemi daha iyi anlaşılacaktır.

VII.SUMMARY

Efficacy of low dose N-acetylcystein therapy on experimental rabbit sepsis model

Purpose: The effect of NAC therapy to determine on plasma levels of free oxygen radicals in experimental sepsis model. Also, to determine the protective role of NAC therapy on lung, liver and renal tissue injury and organ dysfunction caused by sepsis.

Material and method: 30 female New Zealand type rabbits were divided into 5 groups, each composed of 10 rabbits. Sepsis was constituted by caecum ligation perforation technique. Groups named sham, sepsis and sepsis + NAC (10mg/kg/day) were formed and medication was given 12 and 24 hours after caecum ligation and perforation. At the same time blood samples to measure blood gases, plasma glutathion (GSH), malondialdehyde (MDA), AST, ALT, CRP, urea, creatinine and leucocyte count were collected. Tissue samples for tissue MDA in liver histopatologic evaluation, and from lung, liver and kidney were obtained following the death of rabbits.

Findings: Plasma GSH levels were elevated in NAC group with respect to sepsis group ($P<0.05$). Plasma MDA levels were decreased in sepsis group when compared to NAC group ($P<0.05$). Liver tissue MDA levels were found to be same in both groups. Leucocyte count, LDH, CRP, and urea levels were found to be elevated in both groups. AST, ALT and creatinine values were elevated significantly in NAC group when compared to sepsis group ($P<0.05$). Arterial blood PCO₂ values in sepsis and sham groups did not differ significantly. No significant histopatologic difference was found between the lung of NAC and sepsis group was found. Apoptosis in liver tissue was significantly decreased in NAC group when compared to sepsis group ($P<0.05$).

No difference was determined in hydropic degeneration level, Kupffer cell hyperplasia, degree of mononuclear and neutrophilic infiltration of liver, between sepsis and NAC

group. Degree of mononuclear infiltration in kidneys were decreased in NAC group when compared to sepsis group ($P < 0.05$). Enlargement grade of Bowman's capsule, kidney vacuolisation and grade of tubulus edema between NAC and sepsis group did not differ significantly. There was not any difference with respect to survival between the experiment groups.

Conclusion: Application of low dose NAC, an antioxidative agent, in experimental sepsis model has beneficial effects on pulmonary functions and plasma MDA, GSH levels. However it has not any beneficial effect on organ dysfunction and tissue injury at lung, liver and kidney. More and comprehensive studies which tests different NAC doses are needed to determine a role for NAC in experimental sepsis model.

KAYNAKLAR

1. Niderman MS, Fein AM. Sepsis syndrom, the adult respiratory distresssyndrome, and nosocomial pneumonia: a common clinical sequence. *Clin Chest Med.* 1990; 11: 633-56
2. Bone RC. Sepsis syndrome: new insights into its pathogenesis and treatment. *Infectious Diseases Clin North.Am* 1991; 793-805.
3. Bone RC, Fischer CJ, Clemmer TP. Sepsis syndrome: A valid clinical entitiy. *Crit Care Med.* 1989; 17: 389-399.
4. Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multiorgan failure: A plea for comparable definitions. *Ann Inter Med.* 1991; 114: 332-333.
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Society of critical care medicine consensus conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovite therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992; 20: 864-74.
6. Angus DC, Linde –Zwirble WT, Lidicker J. Epidemiology of severe sepsis inthe United States: analysis of incidence, outcome and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 2001; 29: 1303-1310.
7. Bernard GR, Wheeler AP, Russel JA. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The ibuprofen in sepsis study group. *N Engl J Med.* 1997; 336: 912.
8. Bone RC, Balk RA, Fein AM. A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin. Results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 study group. *Crit Care Med.* 1995; 23: 994-1006.
9. Parker MM, Parillo JE. Septic shock: hemodynamics and pathogenesis. *JAMA* 1983; 250: 3324-3327.
10. Wenzel RP. Antiendotoxin monoclonal antibodies: a second look. *N Eng J Med* 1992; 326: 1151-1153.
11. Bone RC, Fischer CJ, Clemmer TP. A controlled clinical trial of high dose methylprednisolone in treatment of severe sepsis and septic shock. *N Eng J Med.* 1987; 317: 653-658.
12. Uzun Ö, Akalın HE, Hayran M, Ünal S. Factors influencing prognosis in bacteremia due to gram-negative organisms: evaluation of 448 episodes in a Hacettepe University hospital. *Clin infect Dis.* 1992; 15: 866-873.
13. Cadet JL. Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. *Int J Neurosci* 1988; 40:13-18.
14. Lutenberg B, van Alphen A. Molecular architecture and function of outer membrane of E.Coli and other gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1983; 737:51-115.

15. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv immunol.* 1979; 28: 293-450.
16. Young LS, Proctor RA, Beutler B. University of California davis interdepermental conferanse on gram-negative septicemia. *Rev Infect Dis.* 1991;13: 666-87.
17. Michalek SM, Moore RN, Mc Ghee JR. The primary role of lymphoreticular cells in the medication of host responses to bacterial endotoxin. *J Infect Dis.* 1980;141: 55-63.
18. Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflamatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur. J Clin invest.* 1991; 21: 559-573.
19. Shapiro L, Gelfand JA. Cytokines and sepsis : pathophysiology and therapy. *New Horizons* 1993; 1: 13-22.
20. Jonathan J. Septic shock. *Emergency Medicine.* 2000; 229-239
21. Marzatico F, Cafe C. Oxygen radicals and other toxic metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Funct Neurol.* 1993; 8:51-66.
22. Akkus I, Gultekin F, Akoz M, Caglayan O, Bahceci S, Can UG, Ay M, Gurel A. Effect of moderate alcohol intake on lipid peroxidation in plasma, erythrocyte and leukocyte and on some antioxidant enzymes. *Clin Chim Acta.* 1997 31; 266: 141-147.
23. Best A, Haenen G. Oksidants and antioksidants: State of the art. *Am J Med* 1991;91:25-135.
24. Klebanof SJ: Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. *Ann Int Med.* 1980;93:480-489.
25. Lunec J, Blake D. Oxygen free radicals: Their revelance to disease processes. *Balliere Tindal* 1990; 189-212.
26. Sauthard HJ, Marsh DC, Me Anulty JF, Belzer FO. Oxygen derived free radical damage in organ preservation: Activity of superoxidase dismutase and xantine oxidase. *Surgery* 1987; 101: 566-70.
27. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15: 129-135.
28. Liu KZ, Cuddy TE, Pierce GN. Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. *Am Heart Journal* 1992; 123: 285-290.
29. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 479-480.
30. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: cruosity, cause, or consequence *Lancet* 1994; 344:721-724.
31. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. 1991; 161: 488-503.

32. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and toxic properties of phagocytes. *Ann Int Med.* 1980;93:480-489.
33. Cotgreave IA. N-Acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications, *Adv. Pharmacol.* 1997; 38: 205–227.
34. Oka S, Kamata H, Kamata K, Yagisawa H, Hirata H. N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of InB kinases. *FEBS Lett.* 2000; 472: 196– 202.
35. Kim H, Seo J, Roh KH, Lim JW, Kim KH, Suppression of NF κ B activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29: 674–683.
36. Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Legros F, Louis H, Le Moine O. N-Acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice, *Pancreas* 2000; 20: 161– 169.
37. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in Escherichia coli endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146: 730-734.
38. Ilker D, Murat K, Burak MYC, Serap B, Seranay E, Serdar HO. the effects of cyclosporine on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in rabbit hepatic tissues. *Transplant Immunology* 2002; 10: 255-258.
39. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in Escherichia coli endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:730-734.
40. Konrad F, Schoenberg MH, Wiedmann H, Kilian J, Georgieff M. The application of n-acetylcysteine as an antioxidant and mucolytic in mechanical ventilation in intensive care patients. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind study *Anaesthesist.* 1995; 44: 651-658
41. Anton EO, Quinella AG, Sato AL, Liova J, Perez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001; 33: 77-79.
42. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.
43. Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 1992; 12: 93-95.
44. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 481-493.

45. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg* 1999; 57: 86-88.
46. Goode HF, Webster NR. Free radicals and antioxidants in sepsis clinical oxidant research Group. *Crit Care Med* 1993; 21: 1770-1776.
47. Henderson A, Hayes P. Acetylcysteine as a cytoprotective antioxidant in patients with severe sepsis: potential new use for an old drug. *Australia Ann Pharmacother* 1994; 28: 1086-1088.
48. Buckman TD, Kling AS, Eiduson S, Sutphin MS, Steinberg A. Glutathion peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia, *Biol Psychiatry* 1987; 28:1349-1356.
49. Cadet JL. Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview, *Int J Neurosci* 1988; 40:13-18.
50. Halliwell B. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; 23:1396-8.
51. Mc Creadie RG, Mc Donald E, Wiles D, Campbell G, Paterson JR. The Nithsdale schizophrenia survey XIV. Plasma lipid peroxide and serum vitamin E level in patient with and without tardive dyskinesia and in normal subject, *Br J Psychiatry* 1995; 167:610-17.
52. Reddy R, Sahebarao M, Mukherjee S. Enzymes of the antioxidants defence system in chronic schizophrenic patients, *Biol Psychiatry* 1991; 30:409-12.
53. Southorn PA, Garth P. Free radicals in the medicine. II. involvement in human disease. *Mayo Clin Proc.* 1998; 63:390-408.
54. Oreste O, Anna C, Angelo Raffaele De G, Elisa M, Qirina C, Gianpaolo N. The effects of Glutathione and NAC on Lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am j respire Care Med.* 2000; 161: 1907-1911.
55. Giyasettin B, Okkes Y, Sait C, Abdullah Y, Ferit M. G. Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation and homocysteine levels in rats. *Archives of Medical Research* 2002; 33: 515-519.
56. Bhattacharyya J, Data AG. Studies on the effects of lipopolysaccharide on lipid peroxidation of erythrocyte and its reversal by mannitol and glycerol. *Journal of Physiology and pharmacology* 200; 52:145-152.
57. Ozaras R, Tahan V, Aydin S, Uzun H, Kaya S, Senturk H. N- acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats. *World J Gastroenterol.* 2003 9:791-794.
58. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in Escherichia coli endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146:730-734.
59. Katsuya M, Kahoru N, Shun-ichi K, Hidefumi O. Propofol attenuates diaphragmatic dysfunction induced by septic peritonitis in hamsters. *Anesthesiology* 2001; 94: 652-660.

60. Govinder JS, Flora K, Prahlad KS. Beneficial effects of s-adenosyl-l-methionine on aminolevulinic acid dehydratase glutathione and lipid peroxidation during acute lead- ethanol administration in mice. *Alcohol* 1999; 18: 103-108.
61. Christian L, Li LJ. Glutathione and glutathione ethyl ester supplementantation of mice after glutathione homeostasis during exercise. *Am Society for Nutritional Sciences*. 1998; 2420-2426.
62. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabed M, Buurman WA, Vincent JL. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am J Physiol*. 1994; 266: 1746-754.
63. Sanz AG, Obeso A, Agapito MT, Gonzalez C. Reduced to oxidized glutathione ratios and oxygen sensing in calf and rabbit carotid body chemoreceptor cells. *Journal of Physiology* 2000; 537: 209-220.
64. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabed M, Buurman WA, Vincent JL. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am J Physiol*. 1994; 266: 1746-54.
65. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol*. 1992; 140: 390-399.
66. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg*. 1991; 57: 86-88.
67. Goode HF, Webster NR. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21:1770-1776.
68. Victor VM, Guayerbas N, Garrote D, Del Rio M, De la Fuente M. Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *Biofactors*. 1999; 10: 347-357.
- 69 Konrad F, Schoenberg MH, Wiedmann H, Kilian J, Georgieff M. The application of n-acetylcysteine as an antioxidant and mucolytic in mechanical ventilation in intensive care patients. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind study *Anaesthesist*. 1995; 44: 651-658.
70. Broner CW, Shenep JL, Stidham GL, Stokes DC, Fairlough D, Rehg JE, Hildner WK. Effect of antioxidants in experimental *Escherichia coli* septicemia. *Circ Shock* 1989; 29: 77-92.
71. De la Fuente M, Victor VM. Ascorbic acid and N-acetylcysteine improve in vitro the function of lymphocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res*. 2001; 35: 73-84.
72. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L et al; The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock*. 2003;19: 366-372.

73. Heller AR, Groth G, Heller SC, Breitskreutz R, Nebe T, Quintel M, Koch T. N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit Care Med.* 2001 29:272-6.
74. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock? *Chest.* 1998; 113: 1616-1624.
75. Domenighetti G, Suter PM, Schaller MD, Ritz R, Perret C. Treatment with N-acetylcysteine during acute respiratory distress syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *J Crit Care* 1997; 12: 177-182.
76. Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1907-1911.
77. Dornbusch HJ, Strenger V, Kerbl R, Lackner H, Schwinger W, Sovinz P, Urban C. Procalcitonin and C-reactive protein do not discriminate between febrile reaction to anti-T-lymphocyte antibodies and Gram-negative sepsis. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32: 941-945.
78. Kepa L, Oczko-Grzesik B. Usefulness of plasma C-reactive protein (CRP) estimation in patients with bacterial sepsis *Przegl Epidemiol.* 2001; 55: 63-67.
79. Molnar Z, Szakmany T, Koszegi T. Prophylactic N-acetylcysteine decreases serum CRP but not PCT levels and microalbuminuria following major abdominal surgery. A prospective, randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 749-755.
80. Ruetten H, Thiemermann C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol.* 1997; 121: 695-704.
81. Rawson JS, Achord JL. Shock liver. *South Med J* 1985; 78: 1421-1425.
82. Wang P, Ba ZF, Tait SM, Zhou M, Chaudry IH. Alterations in circulating blood volume during polymicrobial sepsis. *Circ Shock* 1993; 40: 92-98.
83. Hong KW, Kim KE, Rhim BY, Lee WS, Kim CD. Effect of rebamipide on liver damage and increased tumor necrosis factor in a rat model of endotoxin shock. *Dig Dis Sci.* 1998; 43:154-159
84. Hideki Y, Tomohiro W, Hatsue M, Kazuo E, Tsunemichi H, akio K, Ravi G, Shoichi F. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of long-evans cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. *Free Radical Biology and Med.* 2001; 30: 547-554.
85. Ali O, Ismail C, Oguz K, Leyla C, Dincer A, Ali U, Hulya O, Murat D, Ugur O. The protective effects of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock* 2003; 19: 366-372.

86. Corinne RS, Miranda A, Winkelhuyzen-janssen L, Colinda JMA, Johannes FLM van O, Tjomme Van Der B. Low-dose n-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157:1283-1293.



TEŞEKKÜR

En başta bu günlere gelmem için sırtındaki ceketini satmayı bile göze alan babama ve benim için uykusuz gecelerin sahibi anneme, sevgili kardeşlerim Ayşe, Hatice ve Murat'a, tez çalışmam sırasında yardımlarından ve pozitif desteğinden dolayı eşim Semahat'a ve oğullarım Ömer Furkan ile Ahmet Kadir'e, tezimin en başından sonuna kadar desteğini esirgemeyen ve bizlerin yetişmesine vesile olan hocam Yrd.Doç.Dr. M. Ertuğrul Kafalı'ya, pozitif desteklerini hiç esirgemeyen ve bizlerin yetişmesine vesile olan hocalarım Doç. Dr. Adil Gökalp, Yrd.Doç.Dr. Ahmet Ak, Doç.Dr.Mustafa Şahin, Uzm.Dr. Mehmet Gül, Uzm.Dr.Ayşegül Bayır, Uzm.Dr. A. Sadık Girişgin, Uzm.Dr. Sedat Koçak'a, tezin biyokimyasal parametrelerini çalıştığımız Uzm.Dr. Öznur Köylü'ye, tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Dr.Metin Bircan, Dr. Kemal Aydın, Dr. Halil Kaya, Dr.Şerife Camcı'ya, yardımlarından dolayı tüm acil tıp AD'daki asistan arkadaşlarıma, acil servisteki hemşire hanımlara, acil personeline, deneysel araştırma personeline, istatistiksel çalışmamda yardımcı olan Prof.Dr. Sait Bodur hocama teşekkürü bir borç bilir sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Dr.Arif DURAN

04.04.2004