

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK İNTRAABDOMİNAL SEPSİS OLUŞTURULAN
RATLARDA AMİODARON'UN BÖBREKLER ÜZERİNE KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

Onur YALÇIN

Tez Danışmanı

Doç.Dr. Akgün ORAL

Uzmanlık Tezi

ERZURUM

2014

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK İNTRAABDOMİNAL SEPSİS OLUŞTURULAN
RATLARDA AMİODARON'UN BÖBREKLER ÜZERİNE KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

Onur YALÇIN

Tez Danışmanı

Doç.Dr. Akgün ORAL

Uzmanlık Tezi

ERZURUM

2014

ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sepsis Tarihçe ve Tanımlamaları	4
2.2. Epidemiyoloji	7
2.3. Etiyoloji.....	8
2.4. Sepsis Fizyopatolojisi.....	9
2.5. Sepsis ve Akut Böbrek Yetmezliği	13
2.5.1. Tanım	13
2.5.2. Sepsiste ABY Patogenezi.....	15
2.5.2.1. Sistemik mediatörler	16
2.5.2.2. Lokal mediatörler	17
2.6. Sepsis Tedavisi.....	20
2.7. Amiodaron.....	25
2.7.1. Farmakolojik Etkileri	27
2.7.2. Klinik Farmakokinetik Özellikleri	27
2.7.3. Yan etkiler	28
2.7.4. Amiodaron ve antioksidan aktivite	29
3. MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Deney Hayvanları.....	30
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	30
3.2. Metod	31
3.2.1. Deney Planı	31
3.2.2. Sepsis Modeli	32
3.2.3. Biyokimyasal Çalışmalar	33
3.2.3.1. Böbrek Dokusunda Yapılan Analizler	33

3.2.3.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini	33
3.2.3.1.2. Total Glutasyon (GSH) tayini.....	35
3.2.3.1.3. Tiyoarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) miktarının tayini	35
3.2.3.2. Serumda Yapılan Analizler	37
3.2.3.2.1. Serum Üre Seviyesinin Ölçülmesi	37
3.2.3.2.2. Serum Kreatinin Seviyesinin Ölçülmesi	38
3.2.3.3. İstatistiksel Analiz	38
3.2.4. Real Time PCR.....	38
3.2.4.1. RNA İzolasyonu:	38
3.2.4.2. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi:.....	38
3.2.4.3. Real Time PCR ile 5-HT7 Reseptör mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi	39
3.2.4.4. İstatistiksel Analiz	41
3.2.5. Histolojik Çalışmalar.....	41
3.2.5.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskop	41
4. BULGULAR	42
4.1. Histolojik Bulgular	42
4.1.1. Sham-Opere Edilmiş Kontrol Grup Işık Mikroskopik Bulguları;	42
4.1.2. Sham + Amiodaron (50 mg/kg) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;	43
4.1.3. CLP (Cecal Ligation and Puncture) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;	43
4.1.4. CLP + Amiodaron (25mg/kg) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;	43
4.1.5. CLP + Amiodaron (50 mg/kg) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;	44
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	47
4.2.1. Serum sonuçları.....	47
4.3. Moleküler Çalışmalar	51
4.3.1. IL-1 β and TNF- α mRNA Düzeyleri.....	52
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR.	

ONAY

Bu çalışma için;

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı' nın
01.04.2013 tarih ve 43 sayılı yazısı gereğince; Cerrahi Tıp Bölümleri Bölüm
Başkanlığı' nın 11.04.2013 tarih ve 01 sayılı oturumunun 9 no lu kararı ile onay
alınmıştır. Mütakiben,

Atatürk Üniversitesi Etik Komite Başkanlığı' nın 31.05.2013 tarih
ve 1 no lu oturumunun 16 no lu kararı ile etik açıdan uygunluk izini alınmıştır.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarına hoşgörölü, teşvik edici, eğitici ve öğretici kişilikleri ile yön veren; ilgi ve desteğiyle, eğitimime önemli katkılar sağlayan tez hocam Doç.Dr. Akgün ORAL'a Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ahmet Bedii SALMAN ve değerli hocalarım Doç.Dr. Murat YİĞİTER'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda desteği ve dostluğuyla yanımda olan değerli meslektaşım Dr.Tuba Dikmen'e ve desteğini ve yardımını gördüğüm servisimiz ve ameliyathane hemşire ve diğer çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince, yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımnda yolumu aydınlatan saygıdeğer hocalarım Prof.Dr.Zekai Halıcı, Doç.Dr.Yasin Bayır, Doç. Dr. Elif ÇADIRCI, Yrd. Doç. Dr. Beyzagöl POLAT, Doç. Dr. Emre KARAKUŞ ve Doç. Dr. Deniz Ünal'a en içten teşekkürlerimi sunarken,

Ayrıca bugünlere gelmemde emekleri çok büyük olan canım annem, babam ve kardeşlerime, cesaretimi artıran ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hayat arkadaşım sevgili eşime ve ailesine en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Sepsis, enfeksiyonun tüm vücutta yaygın inflamatuvar yanıt oluşturduğu ciddi bir tıbbi durumdur. Bu kompleks patolojinin sonucunda ciddi hipotansiyon, metabolik asidoz, organ hasarı, multiple organ yetmezliği akut respiratuvar distres sendromu/ Akut akciğer hasarı ve ölümle sonuçlanabilen değişik sonuçlar gözlenebilir.

Amiodaron kalp hücrelerinde etkili nonkompetitif α - ve β -adrenergic bloker ve multi kanal bloker özelliği olan klas III anti aritmik ajandır. Ventriküler ve supraventriküler taşiaritmilerin geniş varyasyonlarında kullanılan etkili anti aritmiktir, özellikle yüksek riskli hayatı tehdit eden ventriküler taşiaritmilerde altın standart olarak değerlendirilir.

Bu çalışmada biz Amiodaron'un eksperimental olarak oluşturulmuş çekal ligasyon puncture modelinde rat böbrek dokusu üzerindeki koruyucu etkisini inceledik.

Her bir grupta 20 rat bulunan beş grup rat kullanıldı. Grup I: Sham-opere edilmiş kontrol grup, Grup II: 50 mg/kg amiodaron verilmiş kontrol sağlıklı grup, Grup III: Çekal ligasyon perforasyon oluşturulan grup, Grup IV: 25 mg/kg amiodaron verilmiş çekal ligasyon perforasyon oluşturulan grup, Grup V: 50 mg/kg amiodaron verilmiş çekal ligasyon perforasyon oluşturulan grup.

Batınlar traşlandı, daha sonra periton açıldı. Diafram ekspozite edildi, abdominal organlar ve çekum izole edildi ve ileoçekal valvin hemen distalinden 3/0 ipek sütür ile ligasyon yapıldı. İki adet delik mezenterin aksi yönünde çekumda ligasyon yerinin distalinde 22 numara iğne ile oluşturuldu. Çekum batına batına yerleştirildi. 16 saat sonra tüm gruplar sakrifiye edildi ve böbrekler ve kan örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal analizler için alındı skorlama ve değerlendirme yapıldı.

Serum sitokin seviye ölçümleri, ELISA ve oksidan/ antioksidan enzim ölçümleri ile yapıldı. SPSS 19.0 sürümü istatistik paket programı ile one-way ANOVA kullanılarak yapıldı.

Çekal ligasyon ve puncture grubunda çok ciddi inflamatuvar hücre infiltrasyonları tüm periferik ve interstisyel bölgelerin vasküler yapılarında mevcuttu. Hiperkromatik nükleuslu ve eozinofilik sitoplazmalı pek çok sayıda nekrotik hücre mevcuttu. Sham ve Amiodaron gruplarında hiçbir histopatolojik anormallik mevcut değildi. Düşük doz ve yüksek

doz Amidaron kullanılan çekal ligasyon ve puncture grupları mukayese edildiklerinde 50 mg/kg Amiodaron+CLP grubunda, 25 mg/kg Amiodaron+CLP grubuna göre çok daha ciddi oranda enflamasyonun gerlimeiş olduğu görüldü. Tüm gruplar içerisinde en düşük enflamasyon skoru 50 mg/kg Amiodaron+CLP grubunda mevcuttu. Histopatolojik skorlar ve değerlendirme sonuçları biyokimyasal analiz sonuçları ile uyum içerisindeydi.

Sonuçlarımız göstermektedir ki Amiodaron kullanımı oksidatif stres ve sitokin etkisini engellemektedir ve sepsis durumunda böbrek dokusunu korumaktadır. Bu perspektif ile bakıldığında Amiodaron'un antiaritmik kimliğinin dışında farklı bir pleiotropik bir etkisinin olması gerekmektedir. Bu çalışma ratlarda yapılmış deneysel bir çalışmadır. Klinik perspektifle bakıldığında daha başka doz bağımlı ve zaman bağımlı çalışmalarında yapılması zorunludur.

Anahtar Kelimeler; Amiodaron, Rat, Polimikrobial Sepsis, Akut Böbrek Hasarı

ABSTRACT

Sepsis is a serious medical condition that is characterized by a whole-body inflammatory state and the presence of a known or suspected infection. Results of this complex pathophysiology can be watched in different ways such as serious hypotension metabolic acidosis, tissue damage and multiple organ failure, acute respiratory distress syndrome /acute lung injury, and even death.

Amiodarone is a class III antiarrhythmic agent, a multichannel blocker, and anoncompetitive α - and β -adrenergic blocker in cardiac cells. Amiodarone is an effective antiarrhythmic and is used to treat a wide variety of ventricular and supraventricular tachyarrhythmias especially considered the gold standard for the pharmacological treatment of life-threatening ventricular tachyarrhythmias in high-risk patients

The present study aimed to determine whether amiodarone was protective against experimentally induced cecal ligation and puncture sepsis in rat kidney tissue.

Five groups of rats were used, each composed of 20 rats: (1) the sham-operated control group; (2) the CLP group; (3) the 25-mg/kg amiodarone-treated control healthy group; (4) the 50-mg/kg amiodarone-treated CLP group; and (5) the 50-mg/kg amiodarone-treated CLP group.

The abdomen was shaved and then the peritoneum was opened. Once the diaphragm exposed the abdominal organs, the cecum was isolated and ligated with a 3/0 silk ligature just distal to the ileocecal valve. Two punctures were made twice on the opposite side of the mesentery with a 22-gauge needle through the cecum distal to the point of ligation, and the cecum was returned to the peritoneal cavity. All groups were sacrificed 16 h later, and kidney and blood samples were analyzed histopathologically and biochemically.

Data for the serum cytokine levels measured by ELISA and oxidant and antioxidant enzymes were subjected to one-way ANOVA using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS version 19.0) software.

In the cecal ligation and puncture group there were serious inflammatory cell infiltrations located at both peripheral and interstitial areas of the vascular structure. There were many necrotic cells which had hyperchromatic nucleus and eosinophilic cytoplasm. There were no histopathological abnormalities in the sham+amiodarone group. When histopathological changes were evaluated in both low-dose and high-dose amiodarone+CLP application groups, amiodarone 50 mg/kg reduced the inflammation stronger than the amiodarone 25 mg/kg dose.

The CLP+amiodarone 50 mg/kg group had the lowest inflammation score among CLP groups. Histopathological scores and examinations were in accordance with the biochemical results.

Our results indicate that administration of amiodarone prevented oxidative stress and cytokine action and protected kidney tissue during sepsis cascade. From this perspective, amiodarone should be assessed with its different pleiotropic actions, not with its antiarrhythmic identity. This is an experimental study on rats, and for clinical perspective, dose-dependent and time-dependent studies should be performed.

Key Words : Amiodarone, Rat, Polymicrobial Sepsis, Acute Renal Injury,

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TNF : Tumor Nekrosis Faktör

ILs : Interlökin

ABY : Akut Böbrek Yetmezliği

SAB : Sistolik Arter Basıncı

OAB : Ortalama Arter Basıncı

LPS : Lipopolisakkarid

TNF : Tumor Nekrosis Faktör

PAF : Trombositleri Aktive Eden Faktör

GM-CSF : Granulosit-Monosit-Koloni-Stimulan Faktörlerin

DİK : Dissemine İntravasküler Koagülasyon

NO : Nitrik Oksit

SOD : Süperoksit Dismutaz

MDA: Malondialdehit

GSH: Glutasyon

CAT : Katalaz

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz

ANP : Atrial Natriüretik Peptid

TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

GSH :Glutasyon

TBARS : Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddeleri

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

RNA: Ribonükleik Asit

mRNA: Messenger RNA

Ca : Kalsiyum

Cu: Bakır

Zn: Çinko

Na : Sodyum

K : Potasyum

SIRS : Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu

PaO₂ :Parsiyel Arteriel Oksijen Basıncı

PEEP :Pozitif end Ekspiratuar Basıncı

FİO₂: Fraksiyone İnspire Edilen Oksijen

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

LBP:Lipopolisakkarid Bağlayıcı Protein

TLR : Toll-like Reseptörler

DİK :Disemine İntravasküler Koagülasyon

GFR: Glomerül Filtrasyon Hızı

ADH:Antidiüretik Hormon

PGE₂:Prostaglandin E₂

cAMP :Siklik Adenozinmonofosfat

TxA₂:Tromboksan A₂

ARDS:Akut Respiratuar Distres Sendromunda

MI:Miyokard İnfarktüs

AMI:Akut Miyokard İnfarktüs

CYP: Sitokrom

CLP:Çekal Ligasyon Perforasyon

DTPA: Diethilen triamin penta asetik asid

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

H₂O:Su

SD : Standard Deviasyon

AMD: Amiodaron

OH: Hidroksil Radikali

O₂⁻: Süperoksid Anyon

ROS:Reaktif Oksijen Türleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Enfeksiyon,sepsis ve SIRS arasındaki ilişkinin şematik gösterimi.....7
Şekil 2.	Sepsise neden olan enfeksiyöz nedenlerin yıllara göre dağılımı.....8
Şekil 3.	Sepsis patogeneğinde mediatörler11
Şekil 4.	Sepsiste organ yetersizliği gelişimi13
Şekil 5.	RIFLE sınıflamasının şematik sunumu14
Şekil 6.	Amiodaron'un moleköl yapısı25
Şekil 7.	Sham-opere edilmiş kontrol grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskobik görüntüler.....45
Şekil 8.	Sham + Amiodaron (50 mg/kg) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskobik görüntüler.....46
Şekil 9.	CLP (Cecal Ligation and Puncture) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskobik görüntüler.....46
Şekil 10.	CLP + Amiodaron (25mg/kg) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskobik görüntüler.....47
Şekil 11.	CLP + Amiodaron (50 mg/kg) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskobik görüntüler.....47
Şekil 12	Sıçan böbreklerinde IL-1 β (A) ve TNF- α (B) mRNA ekspresyon seviyeleri.....52

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.	AKIN sınıflama/dereceleme sistemi	14
Tablo 2.	Deney Planı	32
Tablo 3.	Deney gruplarında serum kreatinin ve üre değerleri ve istatistiksel karşılaştırması.....	48
Tablo 4.	Deney gruplarında SOD, GSH ve MDA değerleri ve istatistiksel karşılaştırması.....	49

1. GİRİŞ

Sepsis; şok, organ yetmezliği ve ölüme kadar giden, acil tedavi edilmesi gereken sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. İnsidansı dünya genelinde artmakta olup Amerika Birleşik Devletleri'nde, 1979-2000 yılları arasında %8.7 lik bir artış bildirilmiş ve yılda yaklaşık olarak 5-10 milyar dolarlık mali yüke neden olduğu bildirilmiştir^{1, 2}. Septik şokta pek çok fizyopatolojik olaylar meydana gelmesine karşılık moleküler biyoloji alanındaki son yıllardaki hızlı gelişmeler, sepsiste oluşan patolojik olayların bir çoğunun anlaşılmasını mümkün kılmıştır. Temel olarak ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri DNA'da hasara, hücrel proteinlerde denaturasyona ve membran lipidlerinde peroksidasyona yol açarak doku hasarına oluşturmaktadır^{3, 4}. Yapılan çalışmalar serbest oksijen radikallerinin etkilerini nötralize etmek için uygulanan antioksidan ajanların sağ kalımı anlamlı şekilde uzattığı gösterilmiştir⁵.

Yoğun bakım ünitelerinde görülen ölümlerin en sık nedenleri arasında sepsis, septik şok ve bunların sonucu gelişen multipl organ yetmezliği yer almaktadır. Sepsisin tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen, enfeksiyon ajanlarının oluşturduğu inflamasyonun yanı sıra hücrel fonksiyonlarda bozuklukların erken tanınmasındaki güçlük, tedavide yetersizlik ve gecikme gibi nedenlere bağlı olarak mortalite oranları yüksektir⁵⁻¹⁰.

Sepsis patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat patojen ve konakçı immun sistemi arasında kompleks bir etkileşimi içerir. Tümör Nekrosis Faktör (TNF) ve interleokinler (ILs) gibi bir takım sitokinler indüklenir¹¹. Normal fizyolojik koşullarda az miktardaki serbest oksijen radikalleri selüler aktivitelerin korunmasında önemli fonksiyon görür. Ancak yüksek konsantrasyonlara ulaştığında hücre hasarı ortaya çıkmaktadır. Çok sayıda çalışma oksidatif stres ile tetiklenen apoptotik süreç ile akciğer hasarı arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir^{12, 13}.

Sepsiste organ yetmezliğinin insidansı organ yetmezliklerinin tanımlama kriterlerine göre değişmektedir. Solunum yetmezliği sepsiste erken dönemde görölen organ yetmezliklerinden biridir. Diğer organ sistemlerinden koagölasyon sistemi, karaciğer, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve böbreklerin yetmezliği sıklıkla görölebilen ve mortaliteyi artıran diğer sorunlardır.

Sepsiste intravasköler volömin azalması, periferel vazodilatasyonun oluşması, miyokardiyel depresyon ve mikrovasköler dolaşının bozulması ile doku oksijen dağılımı ve tüketimi arasında dengesizlik oluşmaktadır. Bu dengesizlik sonucunda global doku hipoksisi meydana gelmektedir. Bu doku hipoksisinin giderilmesi mortalitenin azalmasına neden olmaktadır¹⁴. Akut böbrek yetmezliği (ABY) sepsisin sık görölen ve prognozu kötöleştiren bir komplikasyonudur. ABY'si olan septik hastalarda mortalite %74.5 iken, böbrek yetmezliği olmayan septik hastalarda %45.2 olarak bildirilmiřtir¹⁵. Sistemik hipotansiyon sonucu oluşan renal iskemi ABY için çok önemli bir faktör olmakla birlikte etkili tek faktör de değerdir. Vazodilatör ve vazokonströktör etkisi olan maddelerin dengesizliği sonucunda ortaya çıkan intrarenal vazokonströksiyon, böbreği infiltre eden inflamatuvar hücrelerin lokal hasarlarına, lökosit-endotel ilişkisi sonucunda medöller konjesyona bağlı bölgesel kan akımının daha da azalmasına, intraglomeröler trombozlar gibi faktörlerin hepsi sepsiste ABY oluşmasında rol oynar.

Amiodaron Class III antiaritmik ajan, multikanal blokeri (Ca^{++} , Na^{+} , K^{+}) ve kardiyak hücrelerde nonkompetitif α ve β -adrenergik blokerdir¹⁶. Bu ilacın tiroid fonksiyonları ve fosfolipid metabolizmasında da etkili olduğu bildirilmiřtir¹⁷. Amiodaron'un serbest oksijen radikal hasarını azaltarak multiorgan yetmezliğine gidişi azalttığı, sepsis ve endotoksemili farklı hayvan deneylerinde mortaliteye azalttığı bildirilmiřtir¹⁸. Deneysel çalışmalarda Amiodaron'un antienflamatuvar ve antioksidan özellikleri raporlanmıřtır¹⁹. Bu

güne kadar yapılmış başka sepsis ve endotoksemili hayvan modeli çalışmalarda Amiodaron'un serbest oksijen radikal hasarını engelleyerek multiorgan yetmezliğine gidişi engellediği, ve mortaliteyi de azalttığı gösterilmiştir⁹. Bazı çalışmalarda da Amiodaron'un antienflamatuar etkinliği de gösterilmiştir¹⁰. Amiodaron'un abdominal sepsis oluşturulan hayvan deneylerinde pek çok organ üzerinde koruyucu etkisi gösterilmiş olmasına rağmen sepsisin etkilediği en önemli organlardan biri olan böbrek üzerine ne şekilde bir etkisi olduğunu konu alan her hangi bir deneysel çalışma web of science tabanlı literatür araştırmasında bulunmamaktadır.

Yukarıda belirtilen hususlar sepsiste mortaliteyi ciddi bir şekilde etkileyen ABY'ne gidişi azaltmaya yönelik tedavi yöntemlerini araştırmanın önemini göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis Tarihçe ve Tanımlamaları

İlk kez Homer' in yazıtlarında 2700 yıl önce rastlanan sepsis terimi, Hippocrates tarafından M.Ö. 400 yılında vücutta oluşan tehlikeli, biyolojik bir çürüme olarak tanımlanmıştır. Yunanca bakteri varlığında hayvan ya da organik maddenin bozulması anlamına gelen “sepo” kelimesinden türemiştir²⁰.

Enfeksiyona karşı sistemik inflammatuar yanıt olarak tanımlanan sepsis, yaşamı tehdit eden önemli bir sağlık sorunudur²¹. Amerika Birleşik Devlet'lerinde her yıl 215.000'i ölümle sonuçlanan 751.000 sepsis olgusu görülmekte ve tedavi maliyeti yılda 17 milyar dolara ulaşmaktadır²². Avrupa'daki yoğun bakımlarda ise ağır sepsis prevalansı %9-25'tir²³. Ağır sepsise bağlı ölüm oranı, günümüzde gelişmiş merkezlerde bile %30-50 arasında değişmektedir^{23, 24}.

1991 yılına kadar sepsis ve ilişkili terimler netlik kazanmamış ve birbirlerinin yerine kullanılmıştır. Bu da sepsis ve ilişkili durumların yeterince anlaşılmasına ve özellikle klinik çalışmaların yorumlanmasında karmaşaya neden olmuştur. Bu karmaşa sebebiyle Amerikan Göğüs Hastalıkları Uzmanları Derneği [American College of Chest Physicians (ACCP)] ve Yoğun Bakım Dernekleri [Society of Critical Care Medicine (SCCM)] tarafından 1991 yılında bir uzlaşma konferansı düzenlenmiştir. Bu toplantı sonrası sepsis ve ilişkili durumlar aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır²¹.

* Enfeksiyon: Patojen mikroorganizmalar tarafından indüklenen enflamatuvar cevap veya normalde steril olan dokuların mikrobiyal patojenler ile invazyonu

* Bakteriyemi: Kanda canlı bakteri varlığı

* Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu [Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)]: Şu kriterlerden iki veya daha fazlasının varlığı;

-vücut ısısı: < 36°C veya > 38°C,

-taşikardi: > 90 atım/dk,

-takipne: solunum sayısı > 20 /dk veya $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg,

-lökosit sayısı $> 12000/\text{mm}^3$ veya $< 4000/\text{mm}^3$ ya da $> \%10$ immatür bant formu varlığı

* Sepsis: Enfeksiyona bağlı oluşan sistemik enflamatuvar yanıt

*Ciddi Sepsis: Sepsis ile birlikte organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon bulguları veya hipertansiyon varlığıdır.

* Septik Şok: Yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen, vazopressör ya da inotroplara dirençli, doku perfüzyon bozukluğunun eşlik ettiği sepsis kaynaklı hipotansiyon.

* Sepsise Bağlı Hipotansiyon: Sistolik arter basıncı (SAB) < 90 mmHg olması ya da hipotansiyona yol açacak başka neden yokken SAB' nın bazal değerinden 40 mmHg' dan fazla düşüş göstermesi.

* Çoğul Organ Yetersizliği Sendromu: Akut kritik hastada organ işlev bozukluğu ve homeostazın müdahale olmadan sağlanamamasıolarak tanımlanmıştır.

2001 yılında uluslararası sepsis tanımlamaları toplantıları ile klinisyenler sepsis fizyopatolojisinde güncellenen bilgiler sebebiyle, tanımlamaları yeniden düzenlemişler ve sepsis şu şekilde tanımlanmıştır²⁵; kanıtlanmış ya da şüphe edilen enfeksiyon (bir mikroorganizma tarafından oluşturulan patolojik süreç) varlığı ile beraber aşağıdaki kriterlerden birkaçının bulunması;

1. Genel değişkenler

· Ateş ($1\text{S}_1 > 38,3$ °C)

· Hipotermi ($1\text{S}_1 < 36$ °C)

· Kalp atım sayısı > 90 /dk ya da yaşa göre normal değerlerinden standart sapma > 2

· Takipne > 30 /dk

- Mental durum değişikliği
- Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte > 20mL/kg)
- Diyabet yokluğunda hiperglisemi (plazma glukoz > 7,7 mmol/L ya da >140mg/dL)

2. Enflamatuvar değişkenler

- Lökositoz (> 12000/mm³)
- Lökopeni (< 4000/mm³)
- Beyaz küre sayısı normal olsa da immatür formların > % 10
- Plazma C-reaktif protein düzeyi, normal değerlerden standart sapma > 2
- Plazma prokalsitonin düzeyi, normal değerlerden standart sapma > 2

3.Hemodinamik değişkenler

- Arteriyel hipotansiyon: Sistolik arter basıncı (SAB) < 90 mmHg, ortalama arter basıncı (OAB) <70 mmHg ya da SAB' nin, diğer hipotansiyon nedenleri yok iken, hastanın normal değerlerine göre > 40 mmHg düşmesi veya yaşına göre normal değerlerden standart sapma <2
- Mikst venöz oksijen satürasyonu <% 65
- Santral venöz oksijen satürasyonu <% 70
- Kardiyak indeks > 3,5 L/dk

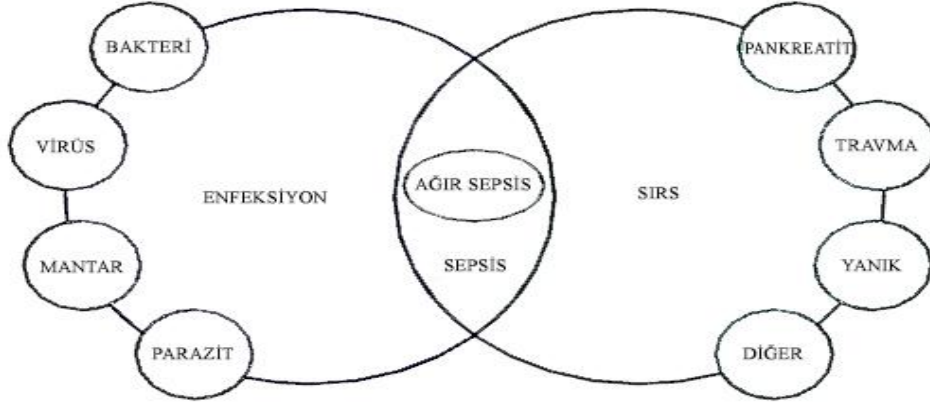
4.Organ disfonksiyon değişkenleri

- Arteriyel hipoksemi (PaO₂/FİO₂ < 300)
- Akut oligüri (idrar çıkışının en az iki saat <0.5 mL/kg/h olması)
- Kreatin artışı (0,5 mg/dl veya 44.2 µmol/l)
- Koagülasyon anormallikleri (INR >1,5 veya aPTT > 60 saniye)
- İleus (bağırsak seslerinin yokluğu)
- Trombositopeni (trombosit sayısı < 100.000/ µl)

- Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin >4 mg/dL veya >70 μ mol/l)

5.Doku perfüzyon değişkenleri

- Hiperlaktatemi (>1 mmol/L)
- Kapiller dolmanın azalması veya beneklenme



Şekil 1: Enfeksiyon,sepsis ve SIRS arasındaki ilişkinin şematik gösterimi²¹

2.2. Epidemiyoloji

Tanımlamaların değişmesi, laboratuvar ve görüntüleme yöntemlerinin gelişmesiyle son 100 yılda sepsis epidemiyolojisinde önemli değişiklikler olmuştur. Buna rağmen oldukça genel sonuçlar çıkarılabilmektedir²⁶.

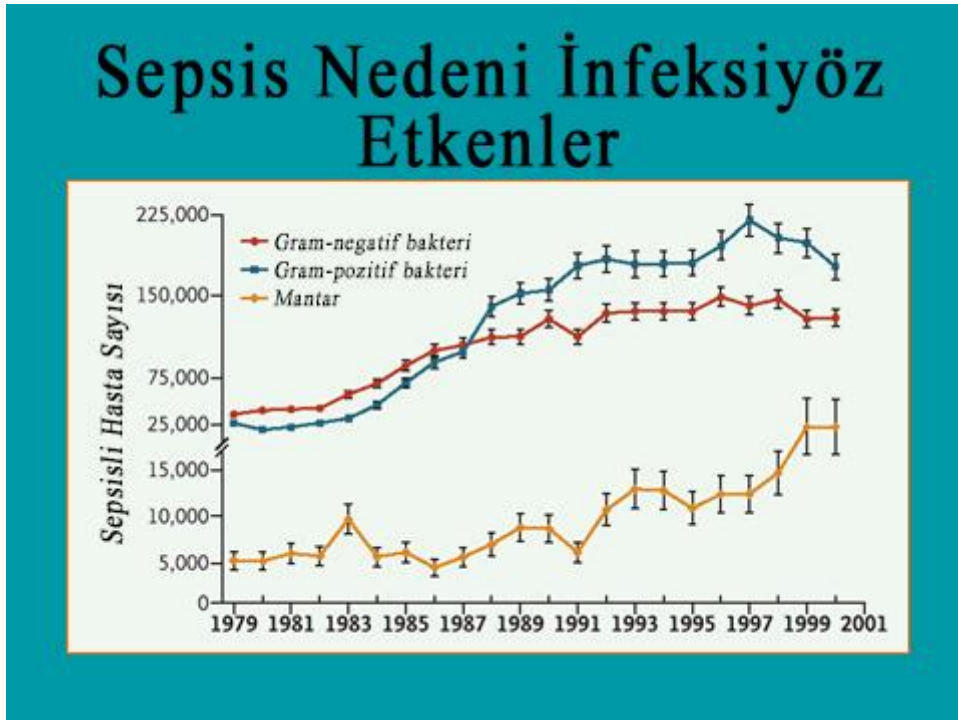
A.B.D.’de yapılan bir çalışmada 22 yıl boyunca 10.319.418 sepsis vakası rapor edilmiştir. (Tüm hospitalize edilen hastaların % 1.3’ü). 1979 yılında 82,7/100.000 olan olgu sayısı 2000 yılında 240,4/100.000 olarak saptanmıştır. Ve insidansta yılda % 8,7 artış olduğu gösterilmiştir¹.

“Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients” (SOAP) adlı çalışmada yoğun bakım hastalarında sepsis görülme sıklığının %35’in üzerinde olduğu ve mortalitenin de % 27 olduğu bildirilmiştir²⁷. ABD’ ne yıllık maliyeti yaklaşık 16,7 milyar dolardır¹. Ülkemizde bir

yoğun bakım ünitesinde 1997 yılında yapılan bir yıllık çalışmada nazokomiyal sepsis oranı %33,1, 1999–2002 yılları arasında yapılan çalışmalarda ise nazokomiyal bakteriyemi/sepsis oranı %12,4–21,5 arasında bulunmuştur²⁸.

2.3. Etiyoloji

1979 ile 1987 yılları arasında baskın şekilde gram negatif bakterilerin sepsisin sebebi olduğu bildirilirken, daha sonraki yıllarda yıllık ortalama %26.3'lık bir artışla gram pozitif bakterilerin öne çıktığı saptanmıştır. Mantar enfeksiyonlarında ise % 20'lik bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 2)¹.



Şekil 2: Sepsise neden olan enfeksiyöz nedenlerin yıllara göre dağılımı¹

En sık enfeksiyon odağı olarak akciğerler % 68, daha sonra % 22 ile batin, % 20 kan, % 14 ile üriner sistem tespit edilmiştir²⁷

2.4. Sepsis Fizyopatolojisi

Sepsis fizyopatolojisinin bilinmesi tanı, takip ve tedavi aşamalarına yol göstermesi açısından önemlidir. Sepsis fizyopatolojisinde, mikrobiyal patojenler ve inflamatuvar yanıt yer almaktadır. Sepsis triadı sistemik inflamasyon, koagülasyon ve bozulmuş fibrinolizdir. Araştırmacılar, konağın enfeksiyona karşı pasif kalmadığını, geniş spektrumlu, sonuçta hasar oluşturan endojen inflamatuvar mediatörler salındığını fark etmişlerdir. Dokularda oluşan enfeksiyon ve travmatik hasar sonucu vücutta hümoral sistemin aktive olduğu ve çeşitli sitokinlerin salındığı gösterilmiştir. Sonuç, sistemik inflamatuvar yanıt, hemostatik değişiklikler ve organ hasarının ortaya çıkmasıdır²⁹⁻³².

Septik şok patogenezinde rol oynayan bakteriyel yapılar üzerinde en çok araştırma yapılan toksin gram negatif bakteri endotoksinleridir. Lipopolisakkarid (LPS) yapısındaki endotoksinin lipid A bölümü toksisiteden sorumludur. Ayrıca gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısal komponentleri peptidoglikan ve teikoik asitler, kapsül antijenleri ve ekzotoksinler, mantarların hücre duvarı antijenleri, viral veya paraziter antijenler inflamasyona neden olabilir. LPS'nin septik süreci başlatabilmesi için konakçı hücrelerinde LPS-bağlayıcı protein (LBP) ve CD14 opsonik reseptörün varlığı gerekir³³. CD14 hücre membranında olduğu gibi (mCD14) dolaşımda da görülebilir (sCD14). Hücre yüzeyinde CD14 reseptörü olmayan dendritik hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri gibi hücreler sCD14 ile etkileşime girerek LPS ile uyarılır. sCD14 sağlıklı bireylerin serumlarında da vardır. Ancak sepsiste düzeyler belirgin olarak artar³⁴. Deneysel modellerde CD14'e karşı geliştirilen antikorların septik şok mortalitesini azalttığı gösterilmiştir³⁵. CD14'ün keşfi ile konakçının LPS'ye olan yanıtı daha iyi anlaşılmış olsa da mCD14'ün hücre içine bir uzanımı yoktur. Dolayısıyla LPS-LBP kompleksinin hangi yolla hücreleri aktive ettiğini açıklamak mümkün olmamıştır. Bu belirsizlik "Toll-like" reseptörler (TLR)'in keşfi ile ortadan

kalkmıştır^{36, 37}. Kısa zamanda bir çok TLR bulunmuştur. Bakteriyel ve fungal kaynaklı birçok proteine karşı reseptörler tanımlanmıştır. TLR-4, LPS reseptörüdür. TLR-2 esas olarak gram-pozitif hücre duvar yapılarını tanır. Tek bir TLR, tek bir mikrobiyolojik yapıya değil birden çok hatta farklı türdeki mikroorganizmalara karşı da reseptör görevini görür. TLR'lerdeki bu çeşitlilik aslında belli bir enfeksiyöz etkene karşı değişik olguların farklı yanıtlar vermesini de açıklayabilir.

Antijenik yapı ve toksinler dolaşımdaki mononükleer fagositik hücreleri TLR reseptörüne bağlanarak uyarırlar. Monositlerden tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve PAF salınır. IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive ederek γ -interferon, IL-2, IL-4, granulosit-monosit-koloni-stimulan faktörlerin (GM-CSF) salgılanmasını sağlarlar^{29, 30, 32}. Bu sitokinler lokal enfeksiyonun yenilmesinde çok yararlı olurken, büyük miktarlarda sentezlenerek dolaşıma karışmaları yaygın endotel hücre hasarı ile sonuçlanır (Şekil 3). Endotelin zedelenmesi hemodinamik değişiklikler ve organ yetersizliği ile sonuçlanır. TNF lökosit yüzeyindeki adhezyon moleküllerini aktive ederek nötrofillerin endotel hücrelerine yapışmasına neden olur. Aktive olmuş nötrofillerin degranülasyonu sonucu açığa çıkan proteazlar ve toksik oksijen radikalleri endotel hücresinin zedelenmesini kolaylaştırır. Ayrıca endotoksinin direkt etkisi veya sitokinlerin uyarımı ile tromboksan, prostoglandin ve lökotrienler gibi araşidonik asit metabolitlerinin salınması kapiller permeabilite artışına neden olur. Endotel hasarı, kapiller permeabilite artışı, kanın mikrosirkülasyonda göllenmesi, dolaşımdaki kan volümünün azalması şok ve organ yetersizliği ile sonuçlanır.

Sitokinler TNF-a, IL-1, IL-6, IL-18 IL-12, IL-15		Nötrofil, lenfosit, endotel aktivasyonu, koagülasyon/kompleman sistemi aktivasyonu, adezyon molekülleri, prostaglandin, nitrik oksid sentetaz, akut faz proteinleri, ateş.
Kemokinler IL-8 vb.		İnflamatuar hücrelerin mobilizasyonu ve aktivasyonu, makrofaj aktivasyonu
Lipid Mediyatörler Tromboksan A2, PAF, Prostaglandinler, Lökotrienler Doku Faktörü (TF)		Vasküler endotel ve ekstremiteler koagülasyon yolunun aktivasyonu, vazokonstriksiyon/vazodilatasyon
Oksijen Radikalleri Süperoksit ve hidroksil radikalleri NO		Antimikrobik etki, vazokonstriksiyon/vazodilatasyon

Şekil 3: Sepsis patogenezinde mediatörler³⁰

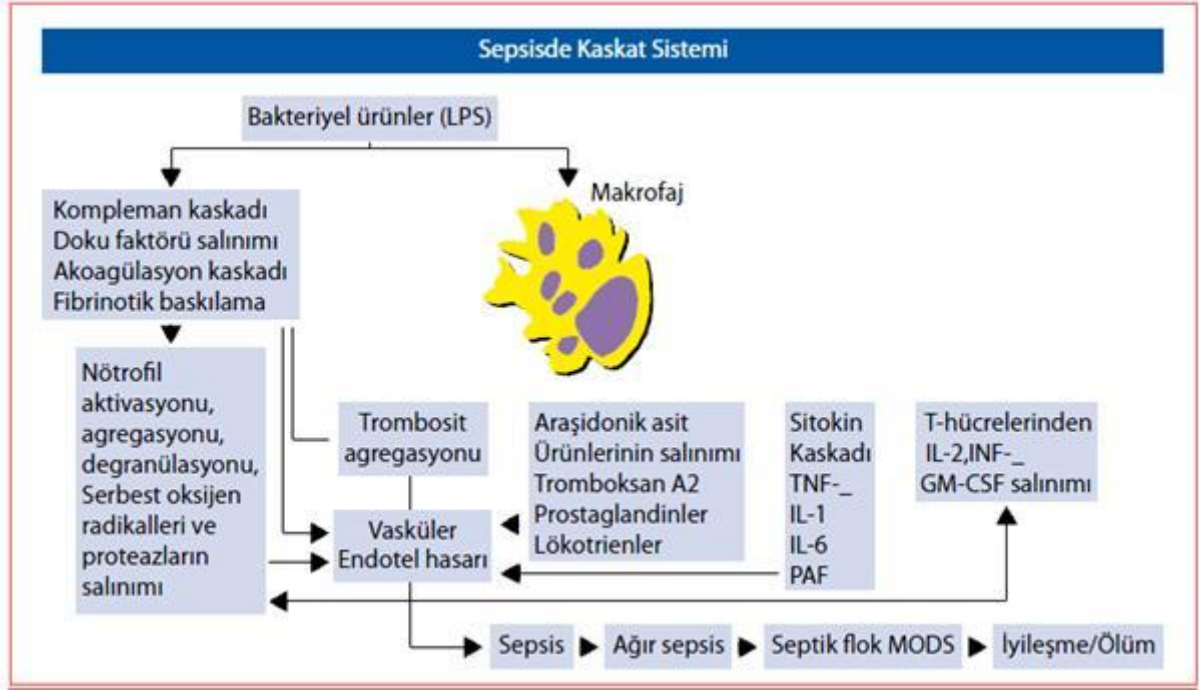
Endotoksin ayrıca kompleman sistemini de aktive eder. Açığa çıkan C3a ve C5a bazofil ve mast hücrelerini uyarak, histamin başta olmak üzere çoğu hipotansiyona neden olan vazoaktif bazı mediatörlerin salgılanmasına neden olur. C5a ayrıca nötrofillerin aktivasyonunu ve endotel hücrelere yapışmasını sağlar. Endotel hücresi tarafından salgılanan, daha önce endotel deprese edenfaktör olarak bilinen nitrik oksit (NO) sepsisteki yaygın vazodilatasyondan sorumludur. Endotoksin etkisi ile aktive olan sistemlerden biri dekoagülasyon sistemidir. Sepsiste hücrelerden salınan sitokinlerin çoğu trombin yapımını uyarmakta, başlangıçta ekstrinsik yol ve daha sonra faktör XII aktivasyonu ile intrinsik koagülasyon sistemi aktive olmaktadır. Mikrovasküler yatakta fibrin trombüsleri oluşarak, organ yetersizliğine katkıda bulunur. Pıhtılaşma proteinlerinin tüketimi kanamaya yol açmakta, hastalarda hem kanama, hem trombüs gelişimi birlikte görülmektedir. Diğer taraftan fibrin, plazmin tarafından parçalanarak fibrinolize neden olmaktadır. Dissemine

intravasküler koagulasyon (DİK) olarak tanımlanan bu tablo sepsisteki kötü prognozun en önemli nedenlerinden biridir^{29, 30, 32}.

Sepsisteki bir hasta büyük olasılıkla çoklu organ yetmezliği ile kaybedilir. Hastada tipik olarak önce tek organ yetmezliği gelişir. Daha sonra sepsis nedeni ortadan kaldırılmazsa çoklu

organ yetmezliği gelişir. Hastaların yoğun bakıma ilk geldiklerindeki organ disfonksiyonlarının şiddeti ve yoğun bakımdaki izleminde organ yetmezliği sayısı ile mortalite arasında yakın bir ilişki vardır. Eğer dört veya beş organ yetmezliği varsa, yapılan tedavinin türüne ve yoğunluğuna bakılmaksızın mortalite %90'ın üzerindedir³⁸. Organ yetmezliğinin patogenezinde birçok faktör etkilidir ve tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Yukarıda da belirtildiği gibi fibrin birikimine bağlı olarak mikrovasküler oklüzyon, doku eksüdasının birikimi ile oksijenizasyonun daha da bozulması ve PAF, histaminler ve prostanoidler gibi vazoaaktif ajanların mikrovasküler homeostazisi bozması temel etkenler olarak görülebilir (Şekil 8).

Özellikle nötrofillerden salınan lizozomal enzimler ve serbest oksijen radikalleri dokuyu doğrudan hasara uğratar. Değişik etkilerle tetiklenen indüklenabilir nitrik oksit sentaz enzimi nitrik oksit yapımını aşırı derecede artırır. Aşırı nitrik oksit salınımı hem vasküler instabiliteye hem de miyokard depresyonuna neden olur^{38, 39}.



Şekil 4: Sepsiste organ yetersizliği gelişimi²⁹

2.5. Sepsis ve Akut Böbrek Yetmezliği

Yoğun bakım hastalarının yaklaşık % 35'inde ABY görülmekte olup % 50'sinden fazlasında en önemli neden sepsis ve septik şoktur^{40, 41}. Dolayısıyla, yoğun bakım ünitesine yatan tüm hastaların % 15-20'sinde septik ABY ile karşılaşılır^{21, 42}. Septik akut böbrek hasarının mortalitesi hasarın şiddetine göre % 20.9 ile % 56.8 arasında değişmektedir^{40, 43}. Bu nedenle, yoğun bakım hastalarında bu kadar büyük bir sorun olan akut böbrek hasarının tanınması, patogenezinin iyi anlaşılması çok önemlidir.

2.5.1. Tanım

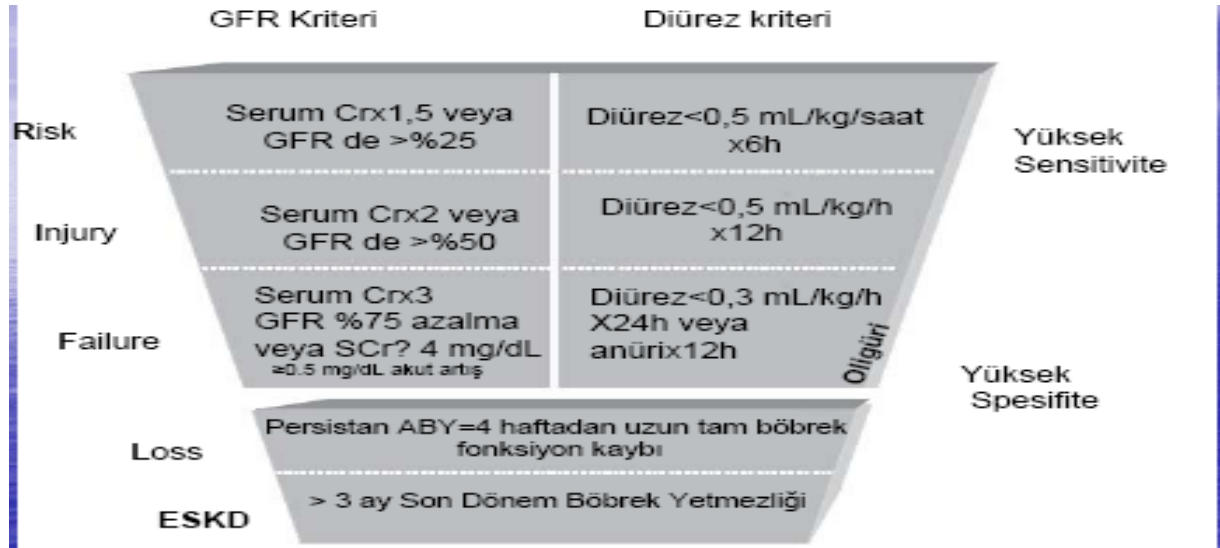
ABY için daha önceleri değişik tanımlar kullanılmakta idi. Bu durumun tanımı ve sınıflaması için ortak bir dil oluşturulması amacıyla RIFLE (Risk, injury, Failure, Loss of kidney function, End-stage kidney disease: risk, hasar, yetersizlik, böbrek fonksiyon kaybı, son dönem böbrek hastalığı) ve AKIN (Acute Kidney injury Network: Akut Böbrek Hasarı Ağı) sınıflamaları geliştirilmiştir^{44, 45}. AKIN sınıflamasına göre ABY, 48 saat içinde serum

kreatininde >0.3 mgr/dl veya $>50\%$ artış veya oligüri (6saatten uzun süre <0.5 ml/kg/saat idrar çıkışı) olarak tanımlanmıştır (Tablo 1).

	Kreatin değeri ölçütü	İdrar çıkışı ölçütü
Evre I	Kreatininde $>0,3$ mgr/dl ya da 1,5-2 kat artış	$<0,5$ ml/kg/saat >6 saat
Evre II	Kreatininde $>2-3$ kat artış	$<0,5$ ml/kg/saat >12 saat
Evre III	Kreatininde >3 kat ya da >4 mgr/dl üzerinde artış (en az $0,5$ mgr/dl $\uparrow$ akut)	$<0,3$ ml/kg/saat >24 saat Veya anüri 12 saat

Tablo 1: AKIN sınıflama/dereceleme sistemi⁴⁶⁻⁴⁹.

Renal replasman tedavisi alan hastalar, replasman tedavisi başladığında hangi evrede olursa olsun evre 3 kabul edilirler.



Şekil 5: RIFLE sınıflamasının şematik sunumu^{46, 50}.

RIFLE kriterlerinin

- ✓ Böbrek fonksiyonlarının düzelmesini,
- ✓ Replasman tedavisine gereksinimi,
- ✓ Hastanede kalış süresini,

- ✓ Hastane mortalitesini öngörebildiği ileri sürülmektedir⁵¹.

2.5.2. Sepsiste ABY Patogenezi

Septik akut böbrek hasarının anlaşılması, insanlarda tekrarlayan böbrek biyopsilerinin alınması etik olmadığından ve var olan histopatolojik bilginin yönlendirici olmaması nedeniyle, hayvan çalışmalarından elde edilen bilgilere ve dolaylı değerlendirmelerden yaptığımız çıkarımlara dayanır^{40, 46}. Ne yazık ki, hayvanlarda kullanılan iskemi-reperfüzyon ve ilaca bağlı hasar modelleri septik akut böbrek hasarını tümüyle yansıtmaz^{40, 46, 52}.

Sepsiste böbrek fonksiyon bozukluğu belirti ve bulguları oligüri, poliüri, proteinüri, azotemi, özgül olmayan üriner kastlar şeklindedir. Bu hastalarda sıklıkla akut tübüler nekroz; nadiren kompleks vakalarda kortikal nekroz, glomerülonefrit veya interstisyel nefrit tablosu kliniğe hakimdir. Sepsisve birlikte görülen ABY'nin anlaşılması için sepsiste kan akımı, renal hemodinamikler, sistemik ve lokal mediyatörler ve bunların kliniğe etkileri bilinmelidir⁵³.

Septik ABY patofizyolojisinde en tartışmalı noktalardan biri, renal kan akımının nasıl değiştiğidir. Sepsise çoğu zaman eşlik ettiğini gördüğümüz renal hipoperfüzyonun renal iskemik hasar yaratarak sepsis ve ABY birlikteliğine katkıda bulunduğu uzun süreden beri kabul gören kavramlardan biridir^{53, 54}. Sepsiste aynen travmada olduğu gibi sıklıkla sıvı açığı olduğu gösterilmiştir^{53, 55}. Bu açık yerine konduğunda kardiyak debi artar periferik vasküler direnç düşer^{53, 56}. Böylece kan volümü artar, ekstraselüler sıvı genişler. Bu duruma hiperdinamik tablo denir. Sepsisteki renal kan akımı değişiklikleri hem deneysel çalışmalarda hemde sepsis hastalarında yapılan çalışmalarda değerlendirilmiştir⁵⁷. Ancak bazı deneysel çalışmalar toplam böbrek kan akımı normal olmasına rağmen septik ABY oluşabildiğini göstermişlerdir^{46, 58}. Sepsis hastasında önemli bir sıvı kaybı sebebi sepsis poliürisidir⁵⁹. Sepsis poliürisinin açıklanmasında dört ayrı mekanizma öne sürülmüştür;

1-Tübüllerde onkotik basıncın azalmasına bağlı tübüllerden dışarıya tuz ve su akımı.

2-Laktik asidoz ve sepsise bağlı şu ana kadar tanımlanamamış yan ürünlerden

kaynaklanan artmış ozmotik aktivite ve ozmotik diürez.

3- Poliürik sepsis hastalarında ADH dönem dönem tedavi amacı ile kullanılmıştır. Bu da bir diyabet insipit modeli ile açıklanmaya çalışılmıştır.

4-Aldosteron reseptör blokajında poliüriyi etkilemesi belirleyicidir⁵³.

Hastaların aldığı ve çıkardığı sıvıların miktarı yakından izlenmelidir. Bu hastalarda poliüri ve solunum yetmezliği sıklıkla birlikte seyrettiğinden santral venöz basınç takibi mutlaka yapılmalıdır. Bu tür durumlarda sıvı desteği verebilmek için mekanik ventilatör desteği de sıklıkla gerekmektedir. Sepsis poliürisinden sonraki oligürik dönem çoğunlukla mortal seyreder. İdrar sodyum konsantrasyonu da sıvı replasmanının temel izlem kriterlerinden biridir⁵³.

Sepsiste, çok cesitli inflamatuvar sitokinler, araşidonik asit metabolitleri, vazoaktif maddeler, trombojenik ajanlar ve diğer biyolojik olarak aktif mediatörler salgılanmaktadır. Organ yetersizliklerinin gelişmesinde bu maddelerin aktif rol oynadıkları düşünülmektedir^{46, 60, 61}. Böbreklerin sitokinlere bağlı hasara çok duyarlı oldukları düşünülmektedir⁴⁰.

2.5.2.1. Sistemik mediatörler

Sistemik dolaşımdaki norepinefrin, anjiyotensin II ve vazopressin düzeyleri sepsiste yükselir. Anjiyotensin II postglomerüler vazokonstriksiyon, filtrasyon fraksiyonunda artış, mezangial hücre kontraksiyonu, sempatik sistem aktivasyonu ve intrarenal vazodilatör prostoglandinlerde artış gibi etkilerle patogeneze katkıda bulunur⁵³.

2.5.2.2. Lokal mediatörler

1-Sitokinler (TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-13)

Glomerül endotel ve mezangial hücrelerde PAF, endotelin1, adenozin gibi vazokonstriktör ve nitrik oksit (NO), PGE2 gibi vazodilatör maddelerin sentezlerini arttırırlar. Sepsiste hayvanmodellerinde önemli renal hasar yaptıkları ve TNFa'nın direk olarak endotel mezangial hücre hasarı yaptığı gösterilmiştir⁶². Sitokinler, glomerül kapillerlerinde nötrofil agregasyonu ve toksik madde salınımını arttırırlar. Mezangial ve endotel hücrelerinde doku faktörünü etkileyerek damar içi ve glomerüler fibrin birikimi ile mezangial hücrelerden reaktif oksijen metabolitleri açığa çıkmasına sebep olurlar. Ayrıca renal plazminogen aktivatör inhibitörü salgılatarak fibrinolizi engellerler. Bu etkilerin lokal TNF, IL-1 ya da sistemik TNF, IL-1'den hangisine bağlı olduğu netlik kazanmamıştır. Septik hayvan modellerinde immün-histokimyasal tekniklerle glomerüler endotel hücrelerde IL-1 ekspresyonu ve bu glomerüllerde nötrofil sayısında artış gösterilmiştir. Deneysel endotoksemide birçok renal yapıda granülosit artışı belirlenmiştir. Bu granülositlerden açığa çıkan proteazlar, oksijen serbest radikalleri ve vazoaktif maddeler bölgesel renal iskemi ve renal hasar gelişiminde önemli faktörlerdir⁶³. Son yıllarda yapılan çalışmalarda anti-TNF monoklonal antikor infüzyonları ile TNF-a, IL-6, IL-8 konsantrasyonlarının azaldığı, kompleman aktivasyonunda değişiklik olmadığı gösterilmiştir⁶⁴. Bu antikorların klinik etkilerinin daha çok araştırılması gerekliliği ortadadır.

2. Adezyon molekülleri

Adezyon moleküllerinin sepsiste sitokinler, kompleman sistemi ve PAF gibi maddelerin etkisi ile kalitatif ve kantitatif olarak yeniden düzenlendiği hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Ayrıca iskemi-reperfüzyon modelinde oluşan oksijen metabolitlerinin de

adezyon moleküllerini artırdığı saptanmıştır. Adezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorların deneysel modellerde ABY oluşumunu önlemede koruyucu olduğu gözlenmiştir⁶⁵.

3-Serbest oksijen radikalleri

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur. Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, lökotrien B₄, bakteriyel orijinli N-formil oligopeptitler gibi partiküler ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosit edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler.

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır. Bununla birlikte kendilerini oksidanlara karşı koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksidi suya indirgeyen katalaz (CAT), hidrojen peroksidi detoksifiye edici glutatyon peroksidaz-glutatyon reduktaz sistemi, antioksidan vitaminlerden E vitamini ve C vitamini gibi antioksidanlardır⁶⁶. Endojen renal vazodilatör prostoglandinlerin sentezinde ve nitrik oksitin ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynayarak renal vazokonstriksiyona neden olurlar. Renal iskemi ve reperfüzyon sonrası gelişen vazokonstriksiyonda deneysel modellerde süperoksit dismutazın etkili olduğu gösterilmiştir^{53, 67, 68}.

4- Araşidonik Asit Metabolitleri

Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine neden olur. Siklooksijenaz ile

araşidonik asidin metabolizması sonucunda prostaglandinler ve tromboksanlar oluşurken, lipooksijenaz ile lökotrienler oluşur. Hem prostaglandin E2 hem I2 (prostasiklin) renal vazodilatasyon ve natriürezise neden olurken, tromboksan A2 ve lökotrienler potent renal vazokonstriktördür⁶⁹. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelirler. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipid peroksidasyonu" denir.

Serbest radikallerle prostaglandin metabolizması birbiriyle yakından ilişkilidir. Reaktif oksijen metabolitleri, fosfolipaz aktivasyonu yoluyla prostaglandin E2, prostaglandin F2, 6-keto prostaglandin F1 α ve tromboksan B2 sentezini sağlarlar. Prostaglandin E2 ve I2(prostasiklin) de adenilat siklazı aktive ederek cAMP sentezini artırır⁶⁶.

Endotoksin, anjiyotensin II, vazopressin IL-1, PAF ve serbest oksijen radikalleri potent olarak TxA2'nin mezangial ve tübüler hücrelerde sentezini artırır⁶⁷. Hayvan çalışmalarında TxA2 infüzyonu renal kan akımını azalttığı, afferent arteriöl vazokonstriksiyonu yaptığı, filtrasyon fraksiyonunu azalttığı gösterilmiştir. Trombosit aktivasyonunu arttırmasından dolayı sepsiste görülen trombosit agregasyonu ve trombozlardan sorumludur. Sepsis ve ABY ilişkisinde renal parankimden açığa çıkan TxA2'nin sistemik dolaşımındaki göre daha etkili olduğu gösterilmiştir⁷⁰.

Nitrik oksit(NO)

Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) böbrek endotelial hücreleri tarafından üretilir ve damar gevşemesinde, lökosit adezyonu ve trombosit agregasyonunun önlenmesinde önemli rol oynar. İskemik böbreklerde eNOS tarafından oluşturulan NO salınımının bozulduğu bilinmektedir⁷¹. Bazı küçük çalışmalarda kısa süreli seçici olmayan NOS

inhibisyonunununseptik hastalarda kan basıncında artış, sistemikvasküler rezistansta artış ve kardiyak“out-put”ta azalmaya yol açtığı gösterilmiştir^{72, 73}

2.6. Sepsis Tedavisi

En son 2008 yılında yayınlanmış olan “Şiddetli Sepsis ve Septik Şoka Yaklaşım için Sepsiste Sağkalım Kampanyası Guideline”ına bir güncelleme sunmak amacıyla 30 uluslararası organizasyonu temsilen 68 kişilik uluslararası uzmanın yer aldığı bir konsensus komitesi oluşturulmuştur. Uzmanlar kanıt düzeyi kalitesini yüksekten (A) en düşüğe (D) doğru sıralarken ve önerilerin gücünü güçlü (1) veya zayıf (2) olarak belirlerken GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation) sisteminde belirtilen prensipleri izlemişler ve düşük kaliteli kanıtların olması durumunda güçlü önerilerde bulunmaktan kaçınmayı gerektirecek potansiyel çekinceler vurgulanmıştır. Bazı öneriler derecelendirilmemiştir (UG).

Öneriler 3 ana grup altında toplanmıştır;⁷⁴

1) Direkt olarak şiddetli sepsisi hedef alanlar

2) Şiddetli sepsis gelişmesi muhtemel kritik derecede hasta olan kişilerde genel yaklaşım

3) Pediatrik değerlendirmeler

❖ Kategori halinde listelenmiş olan anahtar öneriler şu şekildedir: Tanı konulduktan sonraki ilk 6 saat içinde septik hastaya erken kantitatif resusitasyon uygulanması (1C).

❖ Antibiyotik tedavisinden önce kan kültürü alınması (1C).

❖ Potansiyel enfeksiyon odağını belirlemek için yapılan görüntüleme yöntemleri (UG).

❖ Septik şok tanısı konulduktan sonraki ilk 1 saat içinde geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine başlanması (1B) ve septik şok olmaksızın şiddetli sepsis (1C).

❖ Tedavi amaçları olarak ise antimikrobiyal tedavinin günlük olarak değerlendirilmesi ve uygun olduğu zaman azaltılması (1B).

❖ Tanı koyulduktan sonraki ilk 12 saat içinde seçilen yöntemin yarar/zarar dengesi değerlendirmesi göz önüne alınarak enfeksiyon odağı kontrolü sağlanması (1C).

❖ Kristaloid ile başlangıç sıvı tedavisinin sağlanması (1B).

❖ Yeterli arteriyel basınç sağlanması için fazla miktarda kristaloid ihtiyacı olan hastalarda albumin tedavisine başlanmasının değerlendirilmesi (2C) ve hetastarch formülünden kaçınılması (1C).

❖ Sepsisin indüklediği doku hipoperfüzyonu olan hastalarda ve hipovolemiden şüphelenilen hastalarda en az 30 mL/kg kristaloid başlangıç sıvı uyarımı (challenge) yapılması (bazı hastalarda daha hızlı uygulamak gerekebilir) (1C).

❖ Statik veya dinamik verilere dayanarak hemodinamik verilerde gelişme kaydedilene kadar sıvı uyarımı tekniğine devam edilmesi (UG).

❖ Arteriyel basıncın 65 mmHg ve üzeri olacak şekilde tutulması için tercih edilecek ilk yöntemin vazopressör olarak norepinefrinin kullanılması (1B).

❖ Yeterli kan basıncının sağlanması adına ek bir ajana ihtiyaç olduğunda epinefrinin seçilmesi (2B).

❖ Ortalama arteriyel kan basıncının artırılması için veya norepinefrin dozunun azaltılması için vazopressin (0.03 U/dk) kullanılabilir fakat ilk seçilecek vazopressör ajan değildir (UG).

❖ Çok istisnai koşulların olmadığı durumlarda dopamin kullanımı önerilmemektedir (2C).

❖ Kardiyak dolum basıncının artmış olması ve düşük kardiyak output olduğu durumlarda düşünülen miyokardiyal disfonksiyon veya

❖ Yeterli intravasküler volüm olmasına ve yeterli ortalama arteriyel kan basıncı olmasına rağmen hipoperfüzyon bulguları mevcutsa dobutamin başlanabilir veya vazopressor tedavisine eklenebilir (1C).

❖ Yetişkin septik şok hastalarında hemodinamik stabilite sıvı tedavisi ve vazopressör tedavi ile sağlanabiliyorsa hidrokortizon tedavisinden kaçınılmalıdır (2C).

❖ İskemik koroner arter hastalığı, akut hemoraji veya doku hipoperfüzyonu olmadığı durumlarda hedef hemoglobin değeri 7-9 g/dL'dir (1B).

❖ Akut respiratuar distres sendromunda (ARDS) düşük tidal volüm (1A) ve inspiratuar plato basıncın sınırlandırılması (1B).

❖ ARDS'de en azından minimal de olsa bir pozitif ekspresyon sonu basınç (PEEP) uygulanması (1B).

❖ Sepsisin indüklediği orta veya şiddetli ARDS'de daha yüksek değerlerde PEEP uygulanması (2C).

❖ ARDS'ye bağlı şiddetli refrakter hipoksemi gelişen sepsis hastalarında takviye manevralarının yapılması (2C).

❖ PaO₂/FiO₂ oranı 100 mm/Hg'nin altında olan sepsisin indüklemiş olduğu ARDS hastalarında uygulama hakkında tecrübeli olan kurumlarda pron pozisyon verilmesi (2C).

❖ Kontrendike olmadığı durumlarda mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda yatak başının yükseltilmesi (1B).

❖ Doku hipoperfüzyonu bulgusu olmayan oturmuş ARDS hastalarında konservatif (geleneksel) sıvı tedavisi yaklaşımının uygulanması (1C).

❖ Mekanik ventilasyondan ayırma ve sedasyon protokolleri (1A).

❖ İntermittan bolus sedasyon veya spesifik titrasyon endpointlerini hedef alan sürekli infüzyonların kullanımını en aza indirme (1B).

❖ ARDS'li olmayan septik hastalarda nöromusküler blokerlerin kullanımından kaçınma (1C).

❖ PaO₂/FiO₂ oranı <150 mm Hg erken dönem ARDS hastalarında kısa süreli nöromusküler blokerlerin kullanılması (48 saatten kısa olmak üzere) (2C).

❖ Kan şekeri düzeyi yönetiminde protokole dayalı bir müdahalede bulunma, iki ardışık ölçümde kan şekeri 180 mg/dL'nin üzerindeyse insülin kullanımı, kan şekeri düzeyi için üst limitin 180 mg /dL olarak belirlenmesi (1A).

❖ Sürekli veno-venöz hemofiltrasyon veya aralıklı hemodiyaliz (2B).

❖ Derin ven trombozuna yönelik profilaksi (1B).

❖ Kanama riski olan hastalarda üst gastrointestinal sistem kanamasını önlemek için strese bağlı ülser profilaksisinin kullanılması (1B).

❖ Tam olarak aç bırakmak yerine oral veya enteral (gerekli durumlarda) beslenme, şiddetli sepsis veya septik şok durumlarında ise ilk 48 saat içinde sadece intravenöz glukoz ile besleme (2C).

❖ Mümkün olduğunca erken fakat en geç yoğun bakıma yatıştan sonra ilk 72 saat içinde tedavi planının yapılması ve ölüm sonrası planlamanın yapılması (uygun şekilde) (2C).

❖ Pediatrik hastalarda şiddetli sepsisteki öneriler ise şunları kapsamaktadır; Yüz maskesi, yüksek akım kapasiteli nazal kanüller, respiratuar distres veya hipoksemi durumlarında ise PEEP ile oksijen tedavisi (2C).

❖ Fizik muayenede yer alan kapiller dolum gibi terapötik endpointlerin kullanılması (2C).

❖ Hipovoleminin eşlik ettiği septik şoklarda 5-10 dk içerisinde 20 mL/kg kristaloid (veya eşdeğer miktarda albümin) vermek için albümin veya kristaloidlerin kullanılması (2C).

❖ Artmış sistemik vasküler direncin olduğu düşük kardiyak outputlu septik şokta inotropoların ve vazodilatörlerin daha sık kullanılması (2C).

❖ Sadece adrenal yetmezlik olduğundan şüphelenilen veya kanıtlanan hastalarda hidrokortizon tedavisinin kullanılması (2C).

Sonuç olarak uluslararası uzmanların oluşturduğu geniş toplulukta pekçok düzey 1 önerinin şiddetli sepsis hastalarında en iyi tedavi seçeneği olduğu hususunda güçlü bir görüş birliği mevcuttur. Tedavi konusunda izlenen yöntemlerin önemli bir kısmının göreceli olarak zayıf dayanağı olmakla beraber; sepsis ve septik şok durumlarında izlenmesi gereken akut yaklaşımlar bu kritik hasta grubunda daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi için gerekli olan kaynağı teşkil etmektedir⁷⁴.

Sepsiste Yeni Tedavi Yaklaşımları Aşağıda Özetlenmiştir^{75,76} ;

Bu yaklaşımların amacı bakteri toksinleri ve mediyatörlerin nötralize edilmesi yoluyla sendromun ilerleyişini durdurmak veya yavaşlatmak esasına dayanır. Bu amaçla yürütülen çalışmalarda bakteri toksinleri (endotoksin), TNF- α , IL-1 gibi inflamatuvar yanıtta rol oynayan sitokinler, nötrofil gibi inflamatuvar hücreler, NO, PAF, bradikinin gibi inflamatuvar yanıtın çeşitli elemanları hedef olarak alınmaktadır.

A. Antiendotoksin Tedavi:

1. Poliklonal antikorlar (J5)

2. Monoklonal antikorlar (E5, HA-1A)

B. Antisitokin Tedaviler:

1. Anti-TNF antikorlar

2. IL-1 reseptör antagonistleri (IL1ra)

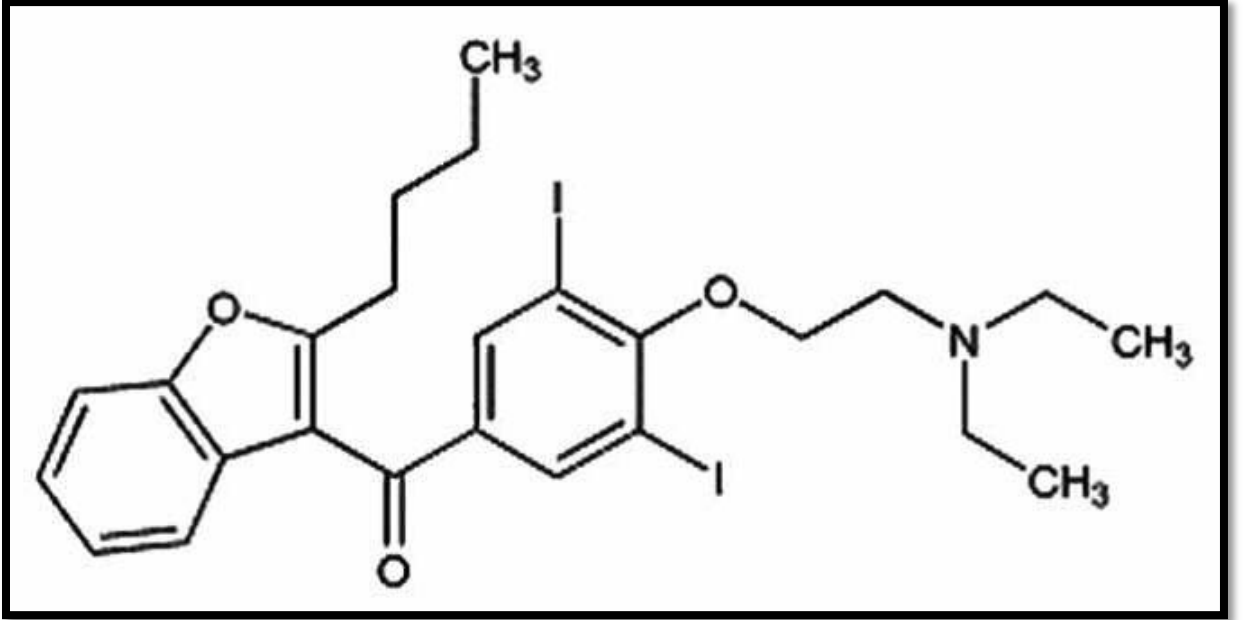
C. Nötrofillere Yönelik Tedavi Yaklaşımları:

1. Monoklonal lökosit adezyon kompleks (CD11/18) antikorları

2. G-CSF

D. NO sentez inhibitörleri

2.7. Amiodaron



Şekil 6: Amiodaron'un molekül yapısı⁷⁷

Amiodaron çok yönlü bir iyon (Ca^{++} , Na^+ , K^+) kanal blokerdir. Diğer yandan kalp hücrelerinde yarışmaz olarak alfa ve betablokerdir. Diğer yandan kalp hücrelerinde

yarışmasız olarak alfa- ve beta blokerdir. Ventriküler ve supraventriküler taşiaritmilerin pek çoğunun etkili bir şekilde tedavi edilmesinde kullanılan anti-aritmik ve anti-anjinal bir ajandır⁷⁸, özellikle hayati tehlike oluşturacak şekilde ventriküler taşiaritmisi olan yüksek riskli hastaların farmakolojik tedavisi için altın-standart olarak kabul edilmektedir⁷⁹. Amiodaron'un ilk keşfedilen özelliği onun anti-anjinal özelliği olmasına rağmen aksiyon potansiyeli süresini klinik açıdan önemli oranda artırdığı belirlenmiş⁸⁰ bunu takiben de ventriküler ve supraventriküler aritmileri iyileştirerek yaşam kalitesini yükselten sınıf III antiaritmik bir ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır⁸¹. AMI'nın hem MI hem de konjestif kalp yetmezliği sonrası meydana gelen aritmilerden kaynaklanan acı ve ağrılardan muzdarip olan hastalarda kullanım için güvenli olduğu tespit edilmiştir⁸².

Amiodaron hiçbirisi aritmi baskılayıcı özelliği ile açıkça ilişkilendirilemeyen çeşitli farmakolojik etkiler gösterir⁸³. Amiodaron tiroid hormonunun yapısal analogudur. Antiaritmik özelliklerinin bazıları ve toksisitesi nükleer tiroid hormon reseptörleri ile etkileşmesine bağlı olabilir. Amiodaron son derece lipofiliktir. Birçok dokuda konsantre olur ve eliminasyonu son derece yavaştır ve buna bağlı olarak yan etkileri de son derece yavaş düzelir. ABD'de tekrarlayan ventriküler taşikardili veya diğer ilaçlara dirençli fibrilasyonlu hastalarda oral tedavi için onaylanmıştır. Oral Amiodaron ayrıca atiral fibrilasyonlu hastalarda sinüs ritmini sürdürmede de etkilidir⁸⁴. İntravenöz formu ventriküler taşikardi veya fibrilasyonun akut sonlandırılmasında endikedir⁸⁵. Hastane dışı kardiyak arrestlerde ilk tercih olarak lidokainin yerini almıştır⁸⁶. Etki mekanizmasındaki belirsizliklere ve ciddi toksisite potansiyeline rağmen Amiodaron atrial fibrilasyon gibi sık görülen aritmilerin tedavisinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır^{77, 87}.

2.7.1. Farmakolojik Etkileri

Amiodaron'un suda çözünmemesi ve dimetilsülfoksit gibi çözücülerin kullanılmasını gerektirmesi akut etkileri ile ilgili in vitro sistemlerdeki çalışmaları güçleştirmektedir. Amiodaron'un etkileri, iyon kanallarının lipid çevresini bozmasıyla ilgili olabilir⁸⁸. Amiodaron inaktif durumdaki sodyum kanallarını bloke eder ve göreceli olarak yüksek bir bloktan kurtulma hızı vardır. Ayrıca kalsiyum akımını ve geçici dışa yönelik gecikmiş doğrultucu ve içe yönelik doğrultucu potasyum akımını azaltır ve kompetitif olmayan adrenerjik bloke edici etki gösterir. Amiodaron anormal otomasiteyi güçlü şekilde inhibe eder ve çoğu dokuda aksiyon potansiyeli süresini uzatır. Amiodaron, sodyum kanal bloğu ve hücreler arası bağlanma üzerine etkileriyle ve hasta dokuda iletimin hızını azaltır⁸⁹. PR , QRS ve QT intervallerini uzaması ve sinüs bradikardisi kronik tedavi sırasında sık görülür. Amiodaron tüm kalp dokusunda yanıtıslığı uzatır; sodyum kanal bloğu, potasyum kanal bloğuna bağlı gecikmiş repolarizasyon ve hücreler arası bağlanmanın inhibisyonu bu etkiye katkıda bulunabilir⁷⁷.

2.7.2. Klinik Farmakokinetik Özellikleri

Amiodaron'un oral biyoyararlanımı muhtemelen emilmesinin az olması nedeniyle yaklaşık %30'dur. Bu tam olmayan biyoyararlanım intravenöz tedaviden oral tedaviye geçişe eşdeğer doz rejimini hesaplamada önemlidir. İlaç yağda dağılır. Amiodaron tedavisinin başlanmasından sonra farmakolojik etkinin bir göstergesi olan yanıtıslıkta artış gelişmesi için birkaç hafta gerekmektedir. Amiodaron karaciğerde metabolize edilerek CYP3A4 ile ana ilaca benzer farmakolojik etkilere sahip bir metabolit olan desetil-amiodaron'a döner. Birkaç yıldır Amiodaron tedavisi alan bir hastada tedavi kesildiğinde plazma konsantrasyonları haftalar ile aylar arasında bir yarılanma ömrü ile azalır. Amiodaron ve desetil-amiodaronun elimine

edilmesinin mekanizması tam olarak saptanmamıştır. Amiodaron'un dokularda yavaş birikim nedeniyle idame tedavisi başlanmadan önce genellikle birkaç hafta süreyle yüksek doz oral yükleme tedavisi uygulanmaktadır. İdame dozu yan etkilere ve tedavi edilen aritmilere göre ayarlanır. Çok yavaş eliminasyonu nedeniyle Amiodaron günde bir kez uygulanır ve kronik tedavi sırasında bir veya iki dozun atlanması nadiren aritminin tekrarlanması ile sonuçlanır.

Karaciğer, böbrek ve kalp disfonksiyonunda doz ayarlanması gerekmez. Amiodaron muhtemelen birçok maddenin karaciğerde metabolize olmasını veya böbrekten atılımını engeller. Varfarinin, diğer antiaritmikler (örn. flekainid, prokainamid ve kinidin) veya digoksinin dozlarının genellikle Amiodaron tedavisi sırasında azaltılması gerekmektedir^{17, 77}.

2.7.3. Yan etkiler

Vazodilatasyona bağlı hipotansiyon ve deprese miyokard performansı Amiodaron'un intravenöz formu ile görülür ve kısmen çözücüye bağlı olabilir. Uzun dönem oral tedavi sırasında kontraktilite azalması nadirdir. Uzun dönem devam edildiğinde ciddi toksisiteye neden olabilecek yüksek dozların uygulanmasına rağmen tipik olarak birkaç hafta süren oral ilaç-yükleme tedavileri sırasında yan etkileri nadir görülür. Yükleme fazı sırasında bazı hastalarda günlük dozu azaltmaya yanıt veren bulantı görülebilir¹⁷.

Uzun dönem tedavi sırasındaki yan etkiler, dokuda birikiminin sorumlu olabileceğini düşündürürcesine hem günlük sürdürme dozunun hem de kümülatif dozun (dolayısıyla tedavi süresinin) boyutunu yansıtır. Kronik Amiodaron tedavisi sırasındaki en ciddi yan etki hızlı ilerleyen ve ölümcül olabilen pulmoner fibrozistir. Altta yatan akciğer hastalığı, 400 mg/gün ve üzerindeki dozlar pnömoni gibi yakın zamanda geçirilmiş pulmoner hastalıklar risk faktörü olarak görülmektedir⁹⁰. Seri halinde çekilmiş akciğer grafileri veya pulmoner fonksiyon testleri araştırmaları erken dönem Amiodaron toksisitesini tespit edebilir, fakat plazma konsantrasyonunu takip etmek henüz anlamlı değildir. Atrial fibrilasyonda kullanılan 200

mg/gün veya düşük dozlarla pulmoner toksisite nadirdir. Uzun dönem tedavi sırasındaki diğer yan etkiler, korneada mikrodpozitler (sıklıkla semptomsuzdur), karaciğer disfonksiyonu, nöromusküler belirtiler (en sıklıkla periferik nöropati veya proksimal kas güçsüzlüğü), fotosensitivite ve hipo-hipertiroidizm yer alır. Hayatı tehdit eden pulmoner toksisite için tedavi, ilacın bırakılması ve kortikosteroidleri içeren destekleyici tedbirlerden oluşur; ilaç yeterli görüldüyse ve yan etkiler hayatı tehdit edici değilse dozun azaltılması yeterli olur. Belirgin QT uzaması ve bradikardi kronik Amiodaron tedavisinde tipik olmasına rağmen torsades de pointes ve diğer ilaca bağlı taşiaritmiler nadirdir⁷⁷.

2.7.4. Amiodaron ve antioksidan aktivite

Amiodaron'un son yıllarda antienflamatuar ve antioksidatif özelliklerinin de olduğu belirtilmektedir^{19, 91-93}. Bu güne kadar yapılmış sepsis ve endotoksemili hayvan modeli çalışmalarda Amiodaron'un serbest oksijen radikal hasarını engelleyerek multiorgan yetmezliğine gidişi engellediği, ve mortaliteyi de azalttığı gösterilmiştir⁹. Yapılan bir çalışmada Amiodaron'un serbest oksijen radikallerinin yaptığı oksidatif hasara karşı kardiyak myositleri koruduğu gösterilmiştir⁹⁴. Başka bir çalışmada da Amiodaron'un mitokondriyal membranlardaki lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmektedir⁹⁵.

Amiodaronun'un tiroid fonksiyonları ve fosfolipid metabolizmasında da etkili olduğu bildirilmiştir¹⁷. Amiodaron'un araşidonik asit metabolizmasında inflamatuvar mediatörlerin üretilmesinde ilk basamağı oluşturan fosfolipaz enzimini inhibe ederek antioksidan aktiviteye katkı sağladığı rapor edilmiştir⁹⁶. Amiodaron'un serbest oksijen radikal hasarını azaltarak multiorgan yetmezliğine gidişi azalttığı, sepsis ve endotoksemili farklı hayvan deneylerinde mortaliteye azalttığı bildirilmiştir¹⁸.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Araştırma Laboratuvarı, Atatürk Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 100 adet ve ağırlıkları 220-240 gram arasında değişen Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince, sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu, Standart Sıçan Yemi) verildi. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22 C°) barındırıldı ve beslendi. Çalışmalarımızın tüm aşamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 31.05.2013 tarih ve 1 no lu oturumunun 16 no lu kararı ile izin alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar

Deneylerinde kullanılan bütün kimyasal malzemeler SigmaChemical Company (Almanya)'dan , Amiodarone (Cordarone 200 mg tablet) Sanofi Synthelabo Drugs (Türkiye) 'dan temin edilmiştir.

Tiyopental sodyum:(İE ULAGAY) Çalışmada i.p. olarak ötenazi için 50mg/kg olarak verildi.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	Modeli ve Firması
Eliza Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA
Mikroplate Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, USA

Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Doku Homojenizatörü	Ika-Werke
Hassas Terazı	Shimadzu ATX224, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, USA
Buzdolabı (-80 °C)	Nuaire NU-9483E, USA
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus

3.2. Metod

3.2.1. Deney Planı

Çalışmada, 4 deney grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Her bir grupta 20 adet olmak üzere toplam 100 adet sıçan kullanıldı. Deney planı, Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Deney öncesi tüm gruplar 24 saat aç bırakıldı.

Aç kalan hayvanlar aşağıdaki gruplarda belirtilen deney protokollerine alındı:

Gruplar	Hayvan Sayısı	Tedavi
I	20	Sham-opere edilmiş kontrol grup
II	20	50 mg/kg amiodaron verilmiş kontrol sağlıklı grup
III	20	Çekal ligasyon perforasyon oluşturulan grup
IV	20	25 mg/kg amiodaron verilmiş çekal ligasyon perforasyon oluşturulan grup
V	20	50 mg/kg amiodaron verilmiş çekal ligasyon perforasyon oluşturulan grup

Tablo 2: Deney Planı

Çalışmada uygulanan bütün amiodaron dozları, ilgili literatüre göre belirlenmiştir¹⁹.

3.2.2. Sepsis Modeli

Ratlara çekal ligasyon uygulanıp çekumun antimezenterik yüzü iki noktadan delinerek oluşturulan CLP polimikrobial sepsis modeli uygulandı. 25 mg/kg tiopental sodyum ile anestezi yapıldı. Anestezi sonrasında ratların karnı traşlandı ve insizyon yapılarak ve periton karın kasları geçirerek çekum dışarı alındı. 3.0 ipek sütür ile çekum ileoçekal valvin distalinden bağlandı. Çıkarılan çekuma distalinden antimezenterik yüzden 22 numara iğne yardımıyla 2 adet delik açıldı. Sonrasında çekum ve bağırsak bölümü yerine koyularak batın 4/0 vicryl ile kapatıldı. Yaraya analjezi için % 1 lik lidokain solüsyonu uygulandı. Sham opere gruba laparotomi uygulandı fakat çekum bağlanmadı ve delinmedi. Tüm ratlara ameliyat süresince ve 6 saat sonrasına kadar salin sıvı resüsitasyonu amacıyla verildi. Amiodaron 25 ve 50mg/kg dozunda oral gavaj yol ile verildi. Sham opere ve CLP'li grubada aynı dozda salin verildi. Ratlar ameliyat sonrası beslenmedi. Fakat su verildi. 16 saat sonra bu ratlar 50 mg/kg dozda tiopental sodyum ile ötanazi edilerek deney sonlandırıldı.

Tüm gruplardaki hayvanların böbrekleri ve kan örnekleri alındı. Alınan böbreklerin biyokimyasal analizlerinin yapılması için -80 °C dondurucuda muhafaza edildi. Toplanan kanlar 4000 g'de santrifüj edilerek serumları elde edildi ve serumlar -80 °C dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.3. Biyokimyasal Çalışmalar

3.2.3.1. Böbrek Dokusunda Yapılan Analizler

Makroskopik analizlerden sonra, rat dokuları -80 °C 'de saklandı. Her ratın böbreği teker teker sıvı azot eşliğinde havanda homojenize edildi. Daha sonra her bir böbrek dokusu ölçümü için yaklaşık 100 mg doku spesifik homojenat tamponunda ultra-turraks doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Daha sonra yöntemdeki direktiflere göre santrifüj edildi. Böbrekteki biyokimyasal çalışmalar için her süpernatanttan SOD enzim aktivitesi yüksek hassasiyetteki Cayman Chemical Superoxide Dismutase Assay Kit Item Number 706002 ELİSA kitiyle, MDA seviyeleri yüksek hassasiyetteki Cell Biolabs OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) STA-330 ELİSA kitiyle, GSH seviyesi ise Sedlak ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu yöntemin ELİSA'ya modifiye edilerek 96'lık well plate'te her bir rat böbreği ikişer tekrarlamalı olarak ölçüldü.⁹⁷ Ayrıca herbir parametre için homojenize edilmiş tüm böbrek süpernatantlarında protein seviyesi ölçüldü ve ort ± standart sapma olarak gösterildi.

Protein tayini: Protein konsantrasyonları ticari protein standartları kullanılarak Lowry metodu ile tespit edildi. (Sigma Aldrich, Total protein kit-TP0300-1KT-USA).

3.2.3.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini

Kullanılan Reaktifler: Assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH:0.8, 0.1 mM diethylene triamine penta acetic acid (DTPA)), Sample Buffer(50 mM Tris-HCl, pH:0.8), Radical Detector(Tetrazolium tuzu), Sod Standart(Bovine eritrosit SOD (Cu/Zn)), Xanthine Oxidase.

Deneyin prensibi: CAYMAN'ın Süperoksit Dismutaz Assay kiti kullanıldı. Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri Tetrazolium'u indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbanı verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise Tetrazolium indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağı olarak açık renk oluşmakta, buradan aktivite hesabı yapılabilir.

Deneyin yapıışı:

Doku homojenizasyonu;

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve kan pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkanp,
2. Sıvı azot altında dokularımızı homejenize edildi.
3. 70mM süktroz, 210mM mannitol ve 1mM EGTA içeren pH'ı 7.2 olan doku başına 1 ml soğuk HEPES buffer ile Ika-Werke homojenizatörde buz üstünde 1 dakika boyunca homojenize edildi.
4. Tüm numuneler işlem bitene kadar + 4 derecede muhafaza edildi.
5. +4 derecede 1,500x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.

Süpernatant kısmında ölçüm yapıldı

Çalışma 96 kuyucuklu plate'lerde gerçekleştirildi.

1. Örnek Kuyularına 20 µl örnek ve standart'lardan eklendi.
2. 200µl Seyreltilmiş Radikal Detektör ekle tüm kuyulara eklendi ve 10 dk. Çalkalayıcıya (karıştırıcıya) konuldu.
3. Reaksiyonu başlatmak için 20 µl seyreltilmiş Xantin Oksidaz eklendi.
4. Birkaç saniye plate'in üstü kapalı şekilde çalkalayıcıda bekletildi.

Oda sıcaklığında 20 dk boyunca inkübe edildikten sonra 460 nm'de Elisa reader da okutuldu.

Oluşan renk miktarları 460 nm’de 96’lık well plate kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan SOD stok çözeltisi ile oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin SOD enzim aktivite seviyeleri, U/mg protein olarak tarif edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak belirlendi.

3.2.3.1.2. Total Glutasyon (GSH) tayini

GSH miktarının ölçülmesi ve prensibi: Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi.⁹⁷ Ölçüm ortamındaki DTNB 5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) disülfid bir kromojendir ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Meydana gelen sarı renk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

GSH miktarının ölçülmesi: Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak ELİSA’ya uyarlanarak gerçekleştirildi. 0.1 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 12000 g 4oC’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanıldı. 96’lık elisa plate içerisine 150 µl ölçüm tamponu (0.2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH = 8.2), 25 µl süpernatant ve 10 µl DTNB pipetlenerek karıştırıldı. Karışım 37 oC’ta 30 dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra 412 nm’de ölçümleri alındı.

GSH miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 412 nm’de 96’lık well plate kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi ile oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg protein olarak tarif edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak belirlendi.

3.2.3.1.3. Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) miktarının tayini

Kullanılan reaktifler: MDA standart (malondialdehyde bis), Thiobarbituric acid (TBA), SDS lysis solution, TBA acid diluent, Sodyum hidroxide solüsyonu, BHT solüsyonu (İçerisinde %5 lik butylated hydroxytoluene)

Deneyin Prensipleri: Cellbiolabs'ın oxiselect MDA quantitation kitine göre çalışıldı. En çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir. Asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95 C° de reaksiyona giren malondialdehit (MDA) ve diğer TBARS, pembe renkli kromojen meydana getirir. 15 dakika kaynatıldıktan sonra hızla soğutulan numunelerin absorbanları 532 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

Deneyin Yapılışı:

Doku homojenizasyonu;

1. Dokular kırmızı kan hücresi ve kan pıhtılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkanıp,
2. Sıvı azot altında dokularımızı homejenize edildi.
3. Homojenize dokulardan 100 er mg tartılarak tüplere konuldu. Her tüpe hazırladığımız 1X BHT in PBS solüsyonundan 1 ml eklendi.
4. Tüpler buz içine konularak homojenizatörde 30 sn homojenize edildi.
5. Homojenize dokular 10.000 g de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatantları toplandı.

Çalışma 96 kuyucuklu platelerde yapıldı.

1. Santrifüj sonrasında elde ettiğimiz süpernatantları yeniden numaralandırdığımız başka tüplere 100 µl hacminde eklendi. Bunun yanında standartlarımız da ayrı tüplere 100 er µl olacak şekilde koyuldu.
2. Kristalize durumdaki SDS lysis solutionunu çözdürdükten sonra her bir numunemize (standartlar da dahil) 100 er µl eklendi.
3. Oda sıcaklığında 5 dk. İnkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra ölçüm yapacağımız her tüpe 250 µl TBA reagent eklendi.
4. Tüplerin ağzını kapatıp 95 °C de 45 ila 60 dk inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon sonrasında tüpler 5 dk buz üzerinde bekletildi.
6. Daha sonra tüm tüpler 3000 rpm de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantı alındı.
7. 96 well plate'e numuneler 200 µl yüklendi ve 532 nm Abs 'de okutuldu.

Hesaplama: 20 mM/L stok standart çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, numunelerle aynı şartlarda çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ile standart grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim sabiti numunelere uygulanarak TBARS miktarı nmol/mg protein olarak tarif edildi. Her bir doku faktörünün etkisi 2 kez tekrar yapılarak belirlendi.

3.2.3.2. Serumda Yapılan Analizler

3.2.3.2.1. Serum Üre Seviyesinin Ölçülmesi

Üre, protein ve amino asitlerin yıkımının son ürünüdür. Prerenal (kalp yetmezliği, su azalması, protein katabolizması artışı, yüksek proteinli diyet), renal sebepler (akut glomerulo nefrit, kronik nefrit, polikistik böbrek hastalıkları, nefro skleroz, tübüler nekrozis) ve postrenal nedenler (tümörler) üre artışına sebep olur. Üreaz amonyak ve karbondioksitten üre hidrolizini, glutamat dehidrogenaz varlığında NAD vermek üzere NADH ve sodyum ketoglutarat reaksiyonlarını katalizler. Absorbansın azalması örnekteki üre konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu doğrultuda üre ölçümü ratlardan elde edilen kan serum örneklerinde BK151 referans numaralı BEN (Biochemical Enterprise) kiti ile 340 nm'de ChemWell biyokimya analizörü ile ölçüldü.

3.2.3.2.2. Serum Kreatinin Seviyesinin Ölçülmesi

Kreatinin kasda ki kreatinin fosfatın yıkım ürünüdür ve genellikle kas ağırlığına bağlı olarak vücut tarafından sabit bir oranda üretilir. Kreatinin böbrekler tarafından kandan süzülür. Eğer böbreklerde yeterince süzülmez ise kandaki seviyesi artar. Alkalın ortamda kreatinin pikrik asit ile kırmızı-turuncu renkte kompleks verir. Renkli kompleksin kinetik artışı numunede ki kreatinin konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu doğrultuda kreatinin ölçümü ratlardan elde edilen kan serum örneklerinde CR280 referans numaralı BEN (Biochemical Enterprise) kiti ile 510 nm’de ChemWell biyokimya analizörü ile ölçüldü.

3.2.3.3. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi One-Way ANOVA testinde Post Hoc Çoklu karşılaştırmalı testlerden Duncan’a göre yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Her bir farklı harf diğer gruptan istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. Aynı harfler anlamsız olduğunu göstermektedir.

3.2.4. Real Time PCR

3.2.4.1. RNA İzolasyonu:

Doku örnekleri tek tek tartılarak RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak Qiaube RNA izolasyon cihazında (Qiagen) total RNA izolasyonu aşamaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde sürdürüldü. Total RNA izolasyonunu takiben mRNA kalitesi denatüre formaldehid agaroz jel elektroforezi ile incelenecek.

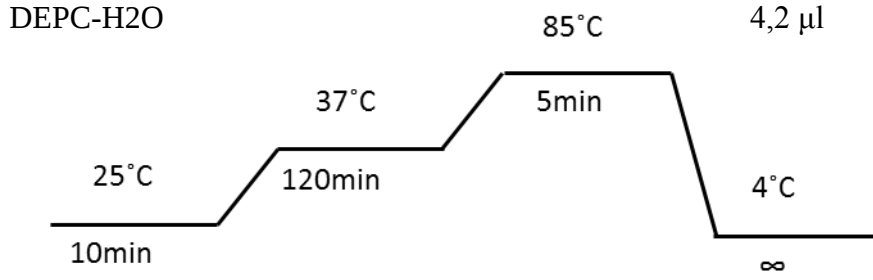
3.2.4.2. Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi:

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanımı ile total RNA’dan cDNA sentezi yapılacaktır. Her reaksiyon 10 μ l RNA ile gerçekleştirilerek cDNA

sentezi aşağıdaki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) ile sağlanacak. cDNA miktarı nano drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlenecek ve -20°C’de saklanacak.

cDNA sentez reaksiyonu:

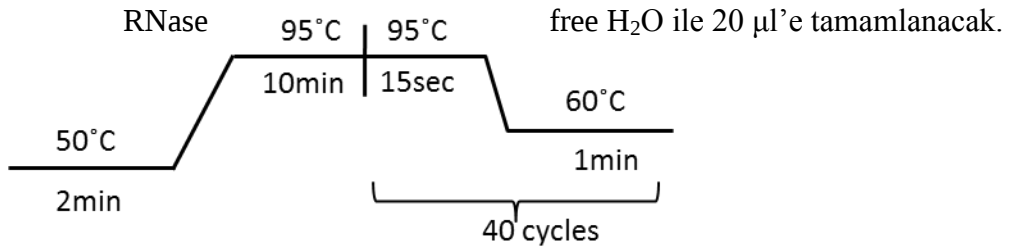
total RNA	10 µl
10 X RT Buffer	2 µl
25 X dNTPs mix	0,8 µl
10 X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl



3.2.4.3. Real Time PCR ile 5-HT₇ Reseptör mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Rölatif TNF- α ve IL-1- β mRNA ekspresyonları rat böbrek dokularında StepOne Plus Real Time PCR System technology (Applied Biosystem) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. TaqMan bazlı ilgili genlerin primer problemleri Primer Design Ltd. firmasında dizayn ettirilip temin edildi (Southampton,UK). TNF- α prob dizilimi forward: 5'- GCT CCC TCT CAT CAG TTC CA-3'; reverse: 5'- CTC CTC TGC TTG GTG GTT TG-3', IL-1- β prob dizilimi forward: 5'- AGT GCT GAC AAT CTG TAT GTA CC -3'; reverse: 5'- ACT AGG CTT TGC TCT TCT CTT AC-3' ve β -actin prob dizilimi ise forward: 5'- TGG TGG GTA TGG GTC AGA AG-3'; reverse: 5'- GAC AAT GCC GTG TTC AAT GG-3' olarak temin edildi. Sonuçlar kontrol grubuna göre rölatif-kat olarak değerlendirildi. Endojen kontrol gen olarak β -actin kullanıldı ve her bir cDNA örneği için üç tekrar uygulandı. Real Time PCR reaksiyonu 96 kuyucuklu plaklarda 9 μ l cDNA (100 ng), 1 μ l Primer Perfect Probe miks ve 10 μ l QuantiTect Probe PCR Master miks (Qiagen, Hilden, Germany) olacak şekilde toplam reaksiyon volümü her bir kuyucukta 20 μ l'ye tamamlandı. -qPCR Hazırlanan reaksiyon plağı 2 dk 50°C, 10 dk 95 °C'de bir siklüs ve 15 sn 94 °C, 60 sn 60 °C'de 40 siklüs olacak şekilde yürütüldü. Tüm veriler kontrol grubuyla karşılaştırmalı şekilde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduna göre hesaplandı⁹⁸

cDNA (100ng)	X μ l
TaqMan Master Mix	10 μ l
Assay	1 μ l



3.2.4.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için GraphPad Prism, Version 5.0 kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standard deviasyon (SD) olarak gösterilmiştir. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi One-Way ANOVA ve Tukey's Multiple Comparison Test ile değerlendirildi. $p < 0.0001$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.2.5. Histolojik Çalışmalar

3.2.5.1. Parafin Kesitlerde Konvansiyonel Işık Mikroskop

Tüm gruplardaki sıçanlardan alınan böbrekler içinde % 4'lük formaldehit içeren şişelere bırakıldı. Bu amaçla dokular aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

1. Akarsuda yıkama (gün boyu)
2. %70'lik Alkolde (Merck)[®] 1 gece bekleme,
3. %80'lik Alkolde 1 saat bekleme,
4. %96'lık Alkolde 1 saat bekleme,
5. %96'lık Alkolde 1 saat bekleme,
6. %100'lük Alkolde 1 saat bekleme,
7. %100'lük Alkolde 1 saat bekleme,
8. Ksilende (Merck)[®] 10 dakika bekleme,
9. Ksilende 10 dakika bekleme,
10. Ksilen + boncuk parafin (Merck)[®] karışımında 60°C'lik etüvde 1 saat bekleme,
11. Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 1 saat bekleme,
12. Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 2 saat bekleme.

Daha sonra dokular parafin bloklara gömülerek kesit alınması işlemlerine hazır hale getirildi. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT) ile kesilen 5 μ m'lik kesitler cam lamalar üzerine alındı ve boyama amacıyla aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

1. Ksilolde 20 dakika bekleme,
2. Ksilolde 10 dakika bekleme,
3. %80'lik Alkol 10 dakika bekleme,
4. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde 5 dakika bekleme,
5. Çeşme suyunda yıkama
6. Hematoksilen boyasında 10 dakika bekleme,
7. Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarma,
8. Eozin solüsyonunda 1 dakika bekleme,
9. Suda 1 dakika yıkama,
10. %80'lik Alkolde 10 dakika bekleme,
11. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde 10 dakika bekleme,
12. Ksilol serilerinde 20 dakika bekleme,
13. Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

İncelemeye hazır hale gelen kesitler, Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Çalışmanın geline bu aşamasında histopatolojik açıdan değerlendirme ışık mikroskobik düzeyde yapılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıdaki gibi sıralanmaktadır

4.1.1. Sham-Opere Edilmiş Kontrol Grup Işık Mikroskobik Bulguları;

Bu gruba ait kesitlere bakıldığında böbreğe ait tüm yapılar normal olarak değerlendirildi. Örneğin kortekste bulunan ve nefronun önemli bir kısmını temsil eden böbrek glomerulleri genel yapısını korumaktaydı. Glomerüller içerisinde kapillerler mezengial

hücreler sağlıklı bir görünüme sahipti yanı sıra bowman aralığı ve bowman membranı kalınlığı da normal olarak değerlendirildi. Diğer yandan gerek kortikal tübüller gerekse medullada tüm toplayıcı tübüllerin normal olduğu izlendi. Gruba ait glomerül ve kortikal tübüllere ait görüntüler **Şekil 7 A ve B'** de gösterilmiştir.

4.1.2. Sham + Amiodaron (50 mg/kg) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;

Gruba ait kesitler incelendiğinde böbreğe ait tüm yapılar sağlıklı gruptaki gibi normal olarak değerlendirildi. Yer yer distal tübüllerde epitel hücreleri arasında bağlantı kopuklukları olduğu belirlenmekle beraber bu durum fizyolojik sınırları geçecek kadar şiddetli değildi (**Şekil 8 A, B**).

4.1.3. CLP (Cecal Ligation and Puncture) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;

Sepsis uygulaması yapılan gruba ait doku örnekleri değerlendirildiğinde genel böbrek yapısında nekrotik odakların olduğu belirlendi. Yanı sıra yer yer kortekste lenfosit hücre infiltrasyonu olduğu izlendi (**Şekil 9 A**). Glomerullere bakıldığında; kapillerler ağda dejenerasyon, nekrotik figürlü diğer bir deyişle hiperkromatik boyalı mezengial hücrelerin varlığı ve kalınlaşmış bowman membranı dikkat çekiciydi (**Şekil 9 B**). İntersitisyel alanlarda eritrosit akümüasyonu belirlenen bulgulardan bir diğeri idi (**Şekil 9 C**). Kortikal damarlarda konjesyon varlığı izlenmekteydi (**Şekil 9 B**).

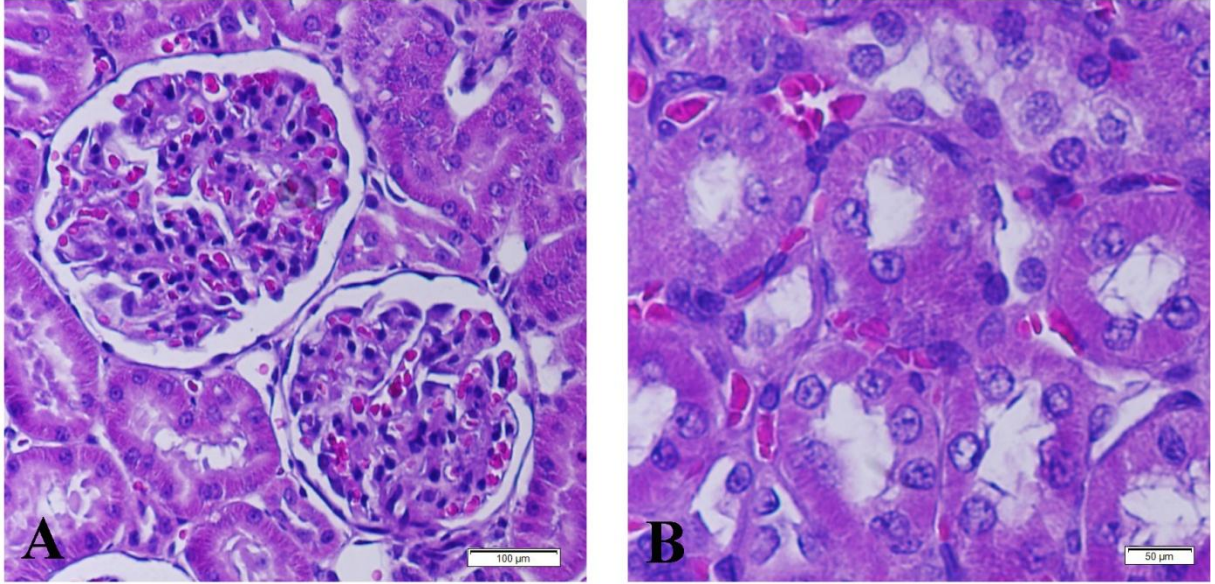
4.1.4. CLP + Amiodaron (25mg/kg) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;

Bu gruba ait kesitler değerlendirildiğinde CLP uygulanan gruba kıyasla genel böbrek yapısının daha düzgün olduğu belirlendi. Glomerüllerde mezengial hücreler normal olarak değerlendirilirken kapillerlerde hafif bir eritrosit birikimi olduğu izlenmekteydi (**Şekil 10 A**). İntersitisyel alanlar eritrosit birikimi sepsis grubuna kıyasla daha hafif seyretmekteydi.

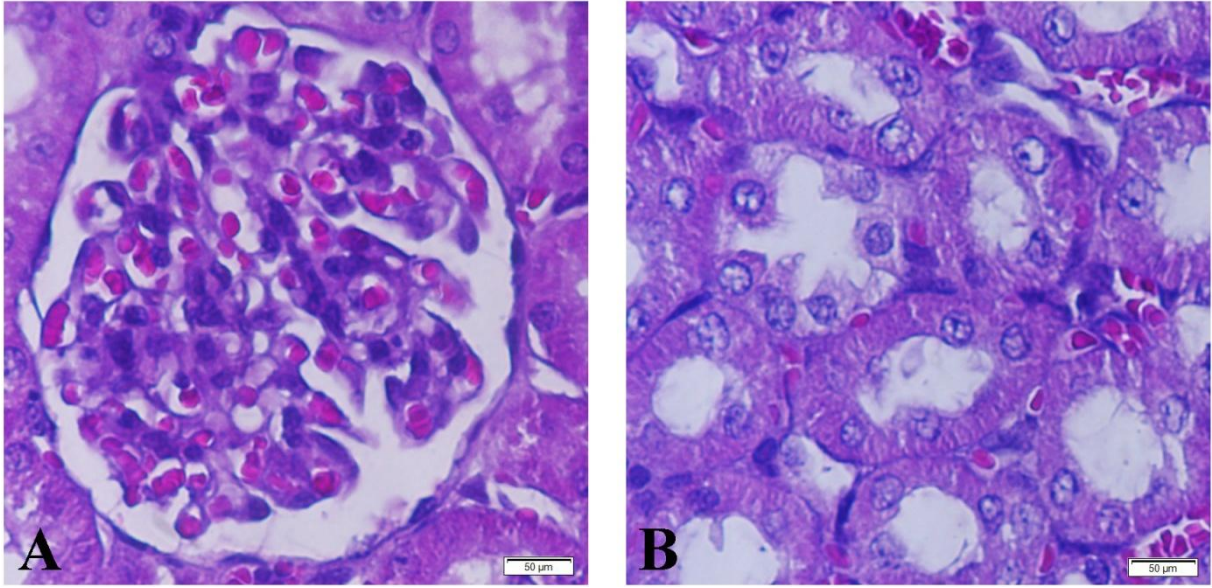
Tübüler yapılarda epiteli oluşturan hücre bağlantılarında yer yer kopukluk olmakla genellinde düzgün görünüme sahipti (**Şekil 10 B**).

4.1.5. CLP + Amiodaron (50 mg/kg) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları;

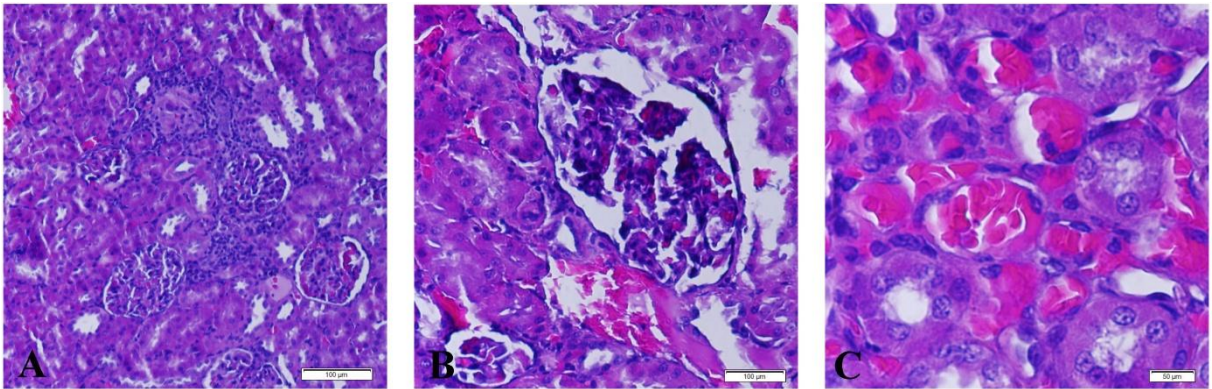
Yüksek doz Amiodaron uygulanan gruba ait bulgularda böbrek genel yapısının tıpkı düşük doz Amiodaron uygulanan grupta olduğu gibi korunduğu gözlemlendi. Buna ilaveten düşük doza göre bir kıyaslama yapılacak olursa yüksek doz uygulamasının yapıyı daha fazla koruduğu belirlenen bulgular arasındaydı. Gruba ait glomerül ve tübüllere ait görüntüler **Şekil 11 A ve B**’ de gösterilmiştir.



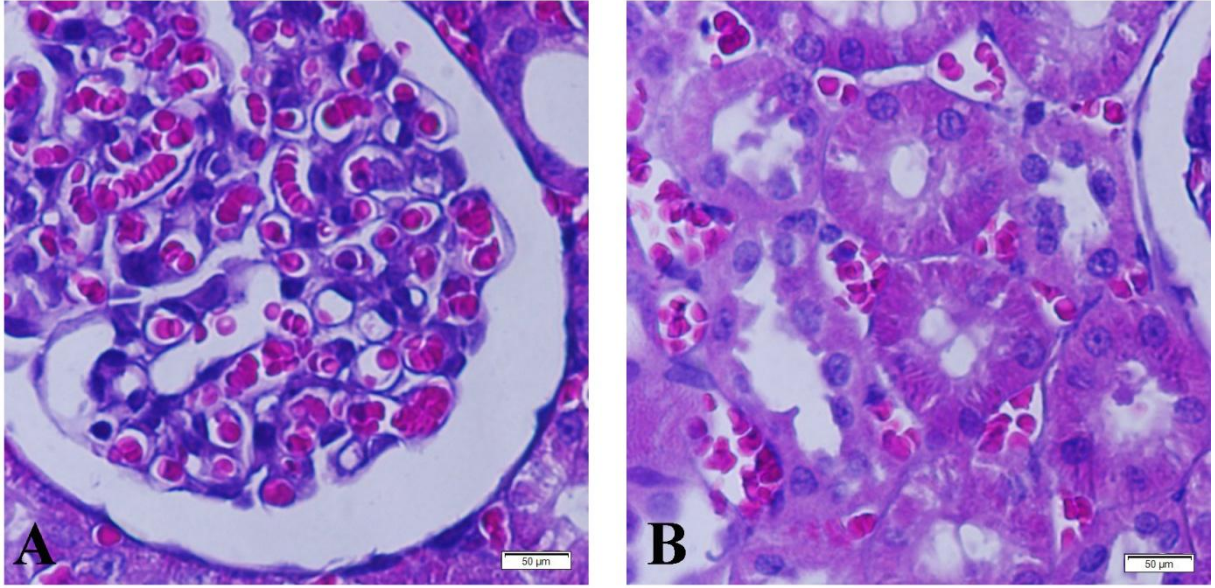
Şekil 7: Sham-opere edilmiş kontrol grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüler. Boya: Hematoksilen & Eozin. A; X20, B; X40’ lık büyütme.



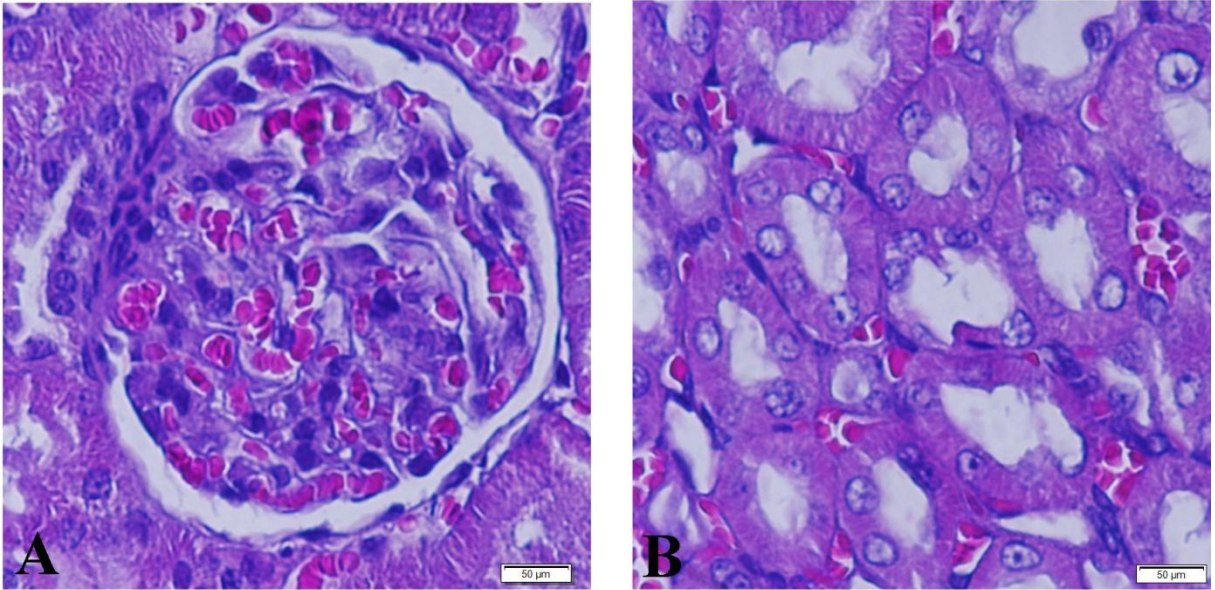
Şekil 8: Sham + Amiodaron (50 mg/kg) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüler. Boya: Hematoksilen & Eozin. A; X40, B; X40' lık büyütme



Şekil 9: CLP (Cecal Ligation and Puncture) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüler. Boya: Hematoksilen & Eozin. A; X10, B; X20, C; X40' lık büyütme.



Şekil 10: CLP + Amiodaron (25mg/kg) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüler. Boya: Hematoksilen & Eozin. A; X40, B; X40' lık büyütme



Şekil 11: CLP + Amiodaron (50 mg/kg) grubuna ait böbrek örneklerinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüler. Boya: Hematoksilen & Eozin. A; X40, B; X40' lık büyütme

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Serum sonuçları

	Kreatinin (U/L)	Üre (U/L)
Sham	0.38 ± 0.09 a	39.80 ± 15.22 a
Sham - AMD 50 mg/kg	0.32 ± 0.07 a	41.39 ± 11.13 a
CLP	0.90 ± 0.21 c	93.05 ± 19.57 c
CLP + AMD 25 mg/kg	0.68 ± 0.20 b	89.75 ± 29.47 c
CLP + AMD 50 mg/kg	0.49 ± 0.16 a	58.68 ± 14.03 b

Tablo 3: Deney gruplarında serum kreatinin ve üre değerleri ve istatistiksel karşılaştırması
Duncan testine göre aynı kolondaki aynı harfler istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farkın olmadığını gösterir(p=0.05). Sonuçlar ortalama ± Standart Deviasyon olarak gösterildi.
CLP: Çekal Ligasyon Perforasyon Sham: Sham-opere

Tablo 3’de görüldüğü gibi sham grubundaki sıçanların serumlarındaki kreatinin ve üre düzeylerinin ortalamaları sırasıyla 0.38 ± 0.09 U/L ve 39.80 ± 15.22 U/L iken 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham grubunda bu düzeyler sırasıyla 0.32 ± 0.07 U/L ve 41.39 ± 11.13 U/L olarak tespit edildi. CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grupta ise kreatinin ve üre düzeyleri sırasıyla 0.90 ± 0.21 U/L ve 93.05 ± 19.57 U/L olarak belirlendi. 25 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP’li grupta ise kreatinin ve üre düzeylerinin ortalamaları sırasıyla 0.68 ± 0.20 U/L ve 89.57 ± 29.47 U/L olarak ölçüldü. 50 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP’li grupta ise kreatinin ve üre düzeyleri sırasıyla 0.49 ± 0.16 U/L ve 58.68 ± 14.03 olarak ölçüldü.

Sham grubu ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham gruplar karşılaştırıldığında kreatinin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Sham grubuna göre CLP ile indüklenmiş sepsis grubunda kreatinin seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). CLP grubu ile CLP + 25 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 25 mg/kg Amiodaron verilen grupta kreatinin düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü. CLP grubu ile CLP+ 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 50 mg/kg Amiodaron verilen grupta kreatinin

düzeylerinin 25 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP'li gruba göre istatistiksel olarak daha anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ($p<0.05$). Ayrıca sham grubu ve 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham grup ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş gruplar karşılaştırıldığında kreatinin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Sham grubu ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham gruplar karşılaştırıldığında üre değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Sham grubuna göre CLP ile indüklenmiş sepsis grubunda üre seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP+ 25 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında üre düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0.05$). CLP grubu ile CLP + 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 50 mg/kg Amiodaron verilen grupta üre düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ($p<0.05$).

4.2.2. Böbrek antioksidan

	SOD (U/mg protein)		GSH (nmol/mg protein)		MDA (nmol /mg protein)	
Sham	51.22	± 15.36 c	2.58	± 0.72 b	1.63	± 0.63 a
Sham- AMD 50 mg/kg	52.37	± 13.78 c	2.37	± 0.96 b	1.90	± 0.89 a
CLP	20.06	± 3.52 a	1.40	± 0.59 a	6.47	± 1.90 c
CLP + AMD 25 mg/kg	38.31	± 12.05 b	1.96	± 0.68 a.b	3.93	± 1.14 b
CLP + AMD 50 mg/kg	43.70	± 9.82 b.c	2.23	± 0.66 b	2.60	± 1.05 a

Tablo 4: Deney gruplarında SOD, GSH ve MDA değerleri ve istatistiksel karşılaştırması
Duncan testine göre aynı kolondaki aynı harfler istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farkın olmadığını gösterir($p=0.05$). Sonuçlar ortalama ± Standart Deviasyon olarak gösterildi.
CLP: Çekal Ligasyon Perforasyon Sham: Sham-opere

Tablo 4'de görüldüğü gibi sham grubundaki sıçanların böbrek dokusunda SOD aktivitesi, GSH ve MDA seviyelerinin ortalamaları sırasıyla 51.22 ± 15.36 U/mg protein, 2.58 ± 0.72 nmol/mg protein ve 1.63 ± 0.63 nmol/mg protein iken, 50 mg/kg Amiodaron verilmiş

sham grubunda bu düzeyler sırasıyla 52.37 ± 13.78 U/mg protein, 2.37 ± 0.96 nmol/mg protein ve 1.90 ± 0.63 nmol/mg protein olarak tespit edildi. CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grupta bu değerler sırasıyla 20.06 ± 3.52 U/mg protein, 1.40 ± 0.59 nmol/mg protein ve 6.47 ± 1.90 nmol/mg protein olarak, 25 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP grupta sırasıyla 38.31 ± 12.05 U/mg protein, 1.96 ± 0.68 nmol/mg protein ve 3.93 ± 1.14 nmol/mg protein olarak ölçüldü. Son olarak 50 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP grupta ise sırasıyla 43.70 ± 9.82 U/mg protein, 2.23 ± 0.66 nmol/mg protein, 2.60 ± 1.05 nmol/mg protein olarak ölçüldü.

Sham grubu ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham gruplar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Sham grubu ve Sham+50 mg/kg Amiodaron verilmiş grup ile CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup sıçanlar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP + 25 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 25 mg/kg Amiodaron verilen grupta SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP + 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında da 50 mg/kg Amiodaron verilen grupta SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.05$). Ancak 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş CLP’li gruplar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Sham grubu ve 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham grup ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

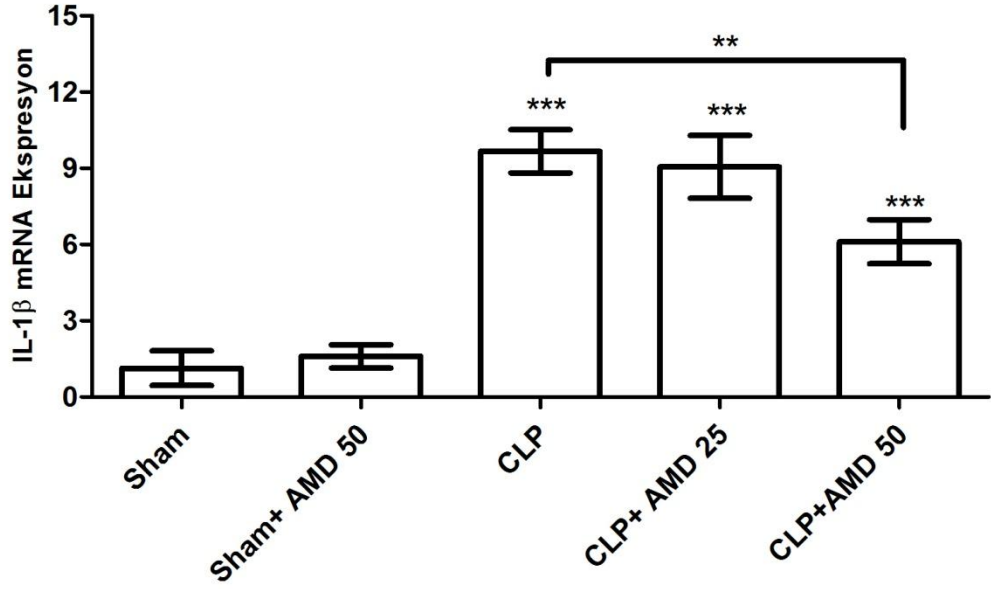
Sham grubu ile 50 mg/kg amiodaron verilmiş sham gruplar karşılaştırıldığında GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$) Sham grubu ve

Sham + 50 mg/kg Amiodaron verilmiş grup ile CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup sıçanlar karşılaştırıldığında GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP+ 25 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 25 mg/kg Amiodaron verilen grupta GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi($p>0.05$). CLP grubu ile CLP+ 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında da 50 mg/kg Amiodaron verilen grupta GSH seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.05$). Sham grubu ve 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham grup ile 25 ve 50 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş gruplar karşılaştırıldığında GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

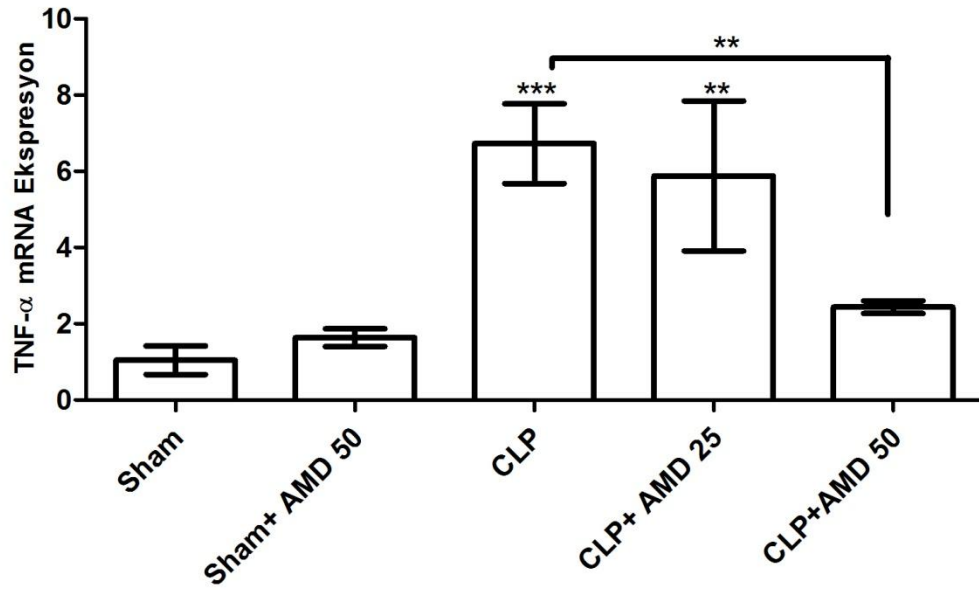
Sham grubu ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham gruplar karşılaştırıldığında MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi($p>0.05$) Sham grubu ve Sham+50 mg/kg Amiodaron verilmiş grup ile CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup sıçanlar karşılaştırıldığında MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP + 25 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 25 mg/kg Amiodaron verilen grupta MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış görüldü ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP+ 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında da 50 mg/kg Amiodaron verilen grupta 25 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP’li gruba göre MDA seviyelerini istatistiksel olarak daha anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Sham grubu ve 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham grup ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup karşılaştırıldığında MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

4.3. Moleküler Çalışmalar

A)



B)



Şekil 12: Sıçan böbreklerinde IL-1 β (A) ve TNF- α (B) mRNA ekspresyon seviyeleri. mRNA seviyeleri kantitatif Real Time PCR analizi ile belirlendi. Referans gen olarak β -actin

kullanılarak sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırmalı kat-değişiklik (fold-change) şeklinde ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak hesaplandı. Değerler ortalama $\pm$ S.D. olarak gösterildi (***p<0.0001).

4.3.1. IL-1 β and TNF- α mRNA Düzeyleri

CLP ile indüklenmiş sepsis gruplarında sham grubuyla karşılaştırıldığında 8.52 kat artmış IL-1 β gen ekspresyonu izlendi (Fig. 1A, p< 0.0001). 50 mg Amiodaron uygulanmış CLP grubunda IL-1 β mRNA seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü belirlendi. Amiodaron'un 25 mg/kg dozunun IL-1 β mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadı.

TNF- α mRNA ekspresyonu CLP ile indüklenmiş sıçan gruplarında sham grubuna göre 6,42 kat artış belirlendi. Amiodaronun hem 25mg/kg hemde 50mg/kg dozlarında CLP ile artmış olan TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ve sham grubuna yaklaştığı görüldü. Amiodaronun yüksek dozu verilmiş olan sham grubu sıçanlarda ne TNF- α ne de IL-1 β seviyelerinde bir değişiklik belirlenemedi.

5. TARTIŞMA

Sepsis; şok, organ yetmezliği ve ölüme kadar giden, acil tedavi edilmesi gereken sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. İnsidansı dünya genelinde artmakta olup Amerika Birleşik Devletleri'nde, 1979-2000 yılları arasında %8.7 lik bir artış bildirilmiş ve yılda yaklaşık olarak 5-10 milyar dolarlık mali yüke neden olduğu bildirilmiştir^{1, 2}. Septik şokta pek çok fizyopatolojik olaylar meydana gelmesine karşılık moleküler biyoloji alanındaki son yıllardaki hızlı gelişmeler, sepsiste oluşan patolojik olayların bir çoğunun anlaşılmasını mümkün kılmıştır. Temel olarak, serbest oksijen radikalleri DNA'da hasara, hücrel proteinlerde denaturasyona ve membran lipidlerinde peroksidasyona yol açarak doku hasarını

oluşturmaktadır^{3, 4}. Yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin etkilerini nötralize etmek için uygulanan antioksidan ajanların sağ kalımı anlamlı şekilde uzatabildiğini göstermiştir⁵.

Sepsiste organ yetmezliğinin insidansı organ yetmezliklerinin tanımlama kriterlerine göre değişmektedir. Solunum yetmezliği sepsiste erken dönemde görülen organ yetmezliklerinden biridir. Diğer organ sistemlerinden santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve üriner sistem ve böbrek yetmezliği sıklıkla görülebilen ve mortaliteyi artıran diğer sorunlardır.

Akut böbrek yetmezliği (ABY) sepsisin sık görülen ve prognozu kötüleştiren bir komplikasyondur. ABY'si olan septik hastalarda mortalite %74.5 iken, böbrek yetmezliği olmayan septik hastalarda %45.2 olarak bildirilmiştir¹⁵. Sistemik hipotansiyon sonucu oluşan renal iskemi ABY için çok önemli bir faktör olmakla birlikte etkili tek faktör de değildir. Vazodilatör ve vazokonstriktör etkisi olan maddelerin dengesizliği sonucunda ortaya çıkan intrarenal vazokonstriksiyon, böbreği infiltre eden inflamatuvar hücrelerin lokal hasarlarına, lökosit-endotel ilişkisi sonucunda medüller konjesyona bağlı bölgesel kan akımının daha da azalmasına, intraglomerüler trombozlar gibi faktörlerin hepsi sepsiste ABY oluşmasında rol oynar.

Sepsis sırasında oluşabilecek komplikasyonları azaltmak için sayısız çalışma yapmaktadırlar. Bu çalışmaların sonucunda sepsis sonrasında kullanılmak üzere birçok yeni ilaç geliştirilmiş olup hangi ilacın daha etkin olduğu hala tartışmalıdır. Bu bilgilerden yola çıkılarak mevcut çalışmamızda çekal ligasyon ve perforasyon (CLP) ile ratlarda sepsis modeli oluşturularak Amiodaron'un böbrekler üzerine olan etkileri araştırıldı. Amiodaron'un koruyucu ve antioksidan özellik gösteren iki farklı dozu kullanıldı¹⁹. CLP barsak ile oluşturulan perforasyon bakteriyel enfeksiyonun erken (hiperdinamik) ve geç (hipodinamik) evrelerinin klinik durumlarını gösteren başarılı bir yöntem olarak kullanıldı. Sepsis grubunda

16 saatte mortalite %40 civarındayken 25 ve 50 mg Amiodaron verilmiş ratlarda mortalite %30 idi. Ayrıca sham opere grupta ve sadece Amiodaron kullanılan grupta mortalite yoktu.

Amiodaron etkili bir antiaritmiktir. Ventriküler ve supraventriküler taşiaritmilerin pek çoğunun etkili bir şekilde tedavi edilmesinde kullanılan anti-aritmik ve anti-anjinal bir ajandır⁷⁸. Özellikle hayati tehlike oluşturacak şekilde ventriküler taşiaritmisi olan yüksek riskli hastaların farmakolojik tedavisi için altın-standart tedavi olarak kabul edilmektedir⁷⁹. Diğer taraftan kimyasal komponenti olan iyot yüzünden toksiktir. Amiodaronun CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş ratlarda akciğer dokusunda antisitokin ve antioksidan⁹¹ kardiyak hücrelerde antioksidan⁹⁴, akciğeri silikanın fibrotik etkilerinden koruyan^{99, 100} ve carrageenan enflamasyonda antienflamatuar etkileri de olduğu gösterilmiştir¹⁹. Amiodaron akut olarak (Haftalar içinde hipersensitivite reaksiyonuna) ve kronik olarak (fibrozis) ile pulmoner toksisite ile ilişkilidir. Fakat literatürde amiodaronun toksik dozu ve süresi hakkında ilginç çalışmalar mevcuttur. Bu özellikleriyle amiodaron farklı ve ilgi çekici bir moleküldür. Amiodaron ile indüklenen akciğer hastalığında 1 haftalık Amiodaron tedavisiyle iyileşmenin patolojik kanıtları mevcuttur¹⁰¹. Başka bir çalışmada hasarlı akciğere 175mg/kg'lık tek doz suda çözölmüş Amiodaronun 3 hafta sonra ile uygulanması ile benzer sonuçlar alınmıştır¹⁰². Ayrıca Amiodaron'un kısa ve uzun vadeli uygulanmasının hepatobilier fonksiyonlardaki etkileri erkek ratlar üzerinde araştırılmış ve (5,50,150 ve 500mg/kg/gün 10gün) Amiodaron alan ratlarda dozdan bağımsız olarak fenolftalein glukronidin safra ekskresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir¹⁰³. Silika ile indüklenmiş subkronik pulmoner inflamasyon ve fibrozisin Amiodaron ile azaldığı rapor edilmiştir^{99, 100}. Bu çalışmalarda amiodaronun silika fibrozisinde akciğer koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında mevcut çalışmamızda toksisiteden korunmak için yüksek doz ve uzun süreli Amiodaron uygulaması yapılmadı. Antienflamatuar etkileri bilimsel çalışmalar ile ispatlanmış 25 ve 50 mg/kg tek doz Amiodaron dozları

kullanıldı¹⁹. Farmakokinetik çalışmalarda ratlarda 10 mg/kg oral tek doz Amiodaron için yarılanma ömrünün 20.3 saat olduğuna dikkat çekmişlerdir¹⁰⁴.

Sistemik inflamatuvar kaskadın kontrolsüz aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinler olan , TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 gibi bazı sitokinlerin kontrolsüz salınması istenmeyen sonuçlara yol açar. Sitokinler, antijen ve mikroorganizmalara karşı konakçı organizmanın immün sisteminin regülasyonu gibi lokal ve sistemik inflamatuvar cevapta önemli rol oynayan küçük hücre sinyal proteinleridir. Sitokinlerin ölçümü ve belirlenmesindeki moleküler araçlardaki gelişmeler, patofizyolojisine sitokinlerinde karıştığı sepsiste hızlı veri birikimlerine yol açmıştır. Özellikle TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 gibi sitokinler sepsis kaskatında proinflamatuvar ajanlar olarak en güçlü ilişkilendirilenlerdir⁹. TNF- α ve IL-1 β sepsisin karakteristik çoğu fizyolojik bozukluklarına aracılık eden erken veya proksimal sitokinler olarak adlandırılırlar¹⁰⁵. Bu proksimal sitokinler, IL-6 gibi geç veya distal sitokinleri uyarırlar. Distal sitokinler inflamatuvar cevabın şiddetlenmesi ve sürdürülmesine neden olup lenfosit fonksiyonu modülasyonu, koagülasyonun aktivasyonu ve hepatik akut faz protein sentezi indüksiyonundan sorumludurlar¹⁰⁵. Proksimal ve distal sitokinler multiorgan hasarında çok önemli rol oynarlar¹⁰⁶. Kronik uyanık enstrümente koyunda yapılan çalışmalarda TNF- α infüzyonu pulmoner hipertansiyon,hipoksemi, düşük akciğer kapasitesi ve artmış pulmoner vasküler permeabiliteye neden olmuştur^{107, 108}. Septik şoklu hastalarda TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-2 konsantrasyonlarının sepsis ve septik şok dışı şoklu hastalarla karşılaştırıldığında daha yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür¹⁰⁹. Enflamatuvar cevapta, TNF- α , sitokin kaskadını aktive eden ve enflamatuvar cevabı koordine eden ana kontrol görevine sahiptir¹¹⁰. TNF- α gibi IL-1 β da, IL-6, IL-8 ve TNF- α 'yı kapsayan diğer sitokinlerin üretimini aktive eder. Klinik olarak IL-6 seviyesi ile sepsisin şiddeti ile enflamatuvar sonucu arasında sıkı bir bağlantı vardır¹⁰⁵. Bizimde çalışmamızda CLP ile indüklenmiş sepsis gruplarında sham grubuyla karşılaştırıldığında 8.52 kat artmış IL-1 β gen ekspresyonu izlendi ($p < 0.0001$).

TNF- α mRNA ekspresyonunda da CLP ile indüklenmiş sıçan gruplarında sham grubuna göre 6,42 kat artış belirlendi. Bu sonuçlar daha önce yapılmış deneysel çalışmalarla da uyumludur^{91, 111, 112}. Amiodaron'un hem 25mg/kg hemde 50mg/kg dozlarında CLP ile artmış olan TNF- α seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ve sham grubuna yaklaştığı ayrıca 50 mg Amiodaron uygulanmış CLP grubunda IL-1 β mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü belirlendi.

TNF- α glomerülokapiller lümende fibrin ve lökosit toplanmasına da neden olmaktadır¹¹³. Çalışmamızda da CLP uygulanan 25 mg/kg Amiodaron verilen ratların CLP uygulanan gruba kıyasla genel böbrek yapısının daha düzgün olduğu, glomerüllerde mezengial hücrelerin normal olduğu, kapillerlerde hafif bir eritrosit birikimi olduğu izlenmekteydi (**Şekil 4 A**). İntersitisyel alanlar eritrosit birikimi sepsis grubuna kıyasla daha hafif seyretmekteydi. Tübüler yapılarda epiteli oluşturan hücre bağlantılarında yer yer kopukluk olmakla genellinde düzgün görünüme sahipti. CLP'li ratlarda 50mg/kg Amiodaron uygulanmasının 25 mg/kg uygulananlara göre böbreği daha fazla koruduğu belirlenen bulgular arasındaydı. CLP ile sepsis oluşturulan ratlarda Amiodaron uygulamasının böbrekte anlamlı histopatolojik düzelmeye sebep olduğu görüldü.

Tavşanlarda tümör nekroz faktörü (TNF)- α infüzyonu GFR'yi azaltmaktadır¹¹³. Bizim çalışmamızda. Sham grubuna göre CLP ile indüklenmiş sepsis grubunda üre ve kreatinin seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP+25 mg/kg Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 25 mg/kg Amiodaron verilen grupta kreatinin düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü. CLP grubu ile CLP+50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 50 mg/kg Amiodaron verilen grupta üre ve kreatinin düzeylerinin anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ($p<0.05$). Hatta sham grubu ve 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham grup ile 50 mg/kg

Amiodaron verilmiş CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş gruplar karşılaştırıldığında kreatinin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Mevcut bulgular CLP uygulanmış sepsisli ratlarda Amiodaron verilmesi ile inflamatuvar sitokinlerin azaldığı ve sitokinler ile oluşan organ hasarının azaltılabileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle CLP ile sepsis oluşturulmuş grupta Amiodaron'un antienflamatuvar etkisinin lökosit ve makrofajlar tarafından üretilen proenflamatuvar sitokinleri baskılaması ile olduğunu düşündürmektedir. Yapılmış deneysel çalışmalar da Amiodaron'un antienflamatuvar ve antioksidan etkileri olduğunu ortaya koymuştur^{19, 91, 114}.

Sepsisteki inflamasyonda sodyum, klor, kalsiyum ve potasyum gibi iyon kanalları sitokinler, kemokinler, prostaglandinler, lökotrienler, histamin ATP, ROS tarafından etkilenir¹¹⁵. Ek olarak sepsis durumunda sitokin fırtınası ve nötrofillerin fagositik aktivasyonu, reaktif oksijen radikallerinin üretimi de artar^{116, 117}. ROS diğer hastalıkların etyopatogenezisinden olduğu kadar sepsisten de sorumludur^{118, 119}. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma mekanizması vücudumuzda bir denge halindedir. Bu denge reaktif oksijen türleri tarafından bozulduğunda zararlı oksidatif stres meydana gelir. Hasar, lipid radikallerinin oluşumu ile başlar. Bu radikal ilk olarak lipid hidroperoksida ve sonra aldehitler, alkenler ve 8-ISO gibi toksik radikallere dönüşürler^{66, 120}.

Enflamasyon mekanizmasında reaktif oksijen türleri, hidroksil radikali (OH) ve süperoksit anyon (O₂⁻) önemli üyeler haline gelirler. Enflamatuvar strese karşı intrasellüler antioksidan mekanizma dokularda SOD ve GSH gibi antioksidan enzimleri içerir. Son zamanlarda hücresel antioksidan sistemlerdeki defektlerin organizmada bir dizi enflamatuvar ve kanser hastalıklarının gelişmesine sebep olduğu gösterildi¹²¹. Bununla birlikte, son çalışmalar enflamatuvar süreçte oksidatif stresin aşırı oluşumundan dokuları korumaya yardımcı olan enzimatik antioksidanların çeşitli rolleri ile ilgili gerçeği aydınlattı ve

oksidasyon meydana gelmesini durduran antioksidan özellikli diğer ilaçların moleküler yapısının rolüne odaklanan çalışmaların yapılmasını da tetikledi ^{111, 122-124}.

Bu sepsis modelinde Amiodaron'un başlıca koruyucu etkisi antioksidan olarak mevcut etkisidir. CLP ile indüklenen sepsis modelinin tedavisinde oksidatif stresin inhibisyonu, organ hasarını önlemenin önemli mekanizmalarından biridir. GSH hücreleri ROS hasarından koruyan temel antioksidanlardan maddelerden biridir. GSH ve melatonin, E vitamini gibi diğer antioksidanlar hücrelerin içindeki ROS'ları modüle ederek doku hasarını önlerler ¹²⁵.

Çalışmamızda sham grubu ve sham + 50 mg/kg Amiodaron verilmiş grup ile CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup sıçanlar karşılaştırıldığında GSH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. GSH seviyesi düşerse, doku kendisini ROS hasarına karşı koruyamaz ve oksidatif hasar meydana gelir. Çalışmamızda sham grubu ve sham+50 mg/kg Amiodaron verilmiş grup ile CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup sıçanlar karşılaştırıldığında GSH aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. Önceki deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlarda bizim çalışmamızla uyumlu olarak CLP grubunda GSH seviyesinin ve SOD aktivitesinin düşük olduğunu göstermektedir ^{91, 111, 123, 125}. Çalışmamızda CLP grubu ile CLP+ 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında da 50 mg/kg Amiodaron verilen grupta GSH seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Ancak 25 mg/kg dozda Amiodaron uygulanmasının GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmadığı görüldü.

Bir antioksidan enzim olan SOD organ hasar kontrolünde koruyucu bir faktör olarak tanımlanmıştır¹²⁶. SOD bu etkisini toksik süperoksit radikalleri, nontoksik hidroksil peroksit ve moleküler oksijene dönüştürerek gösterir ¹²⁷. Bizim bulgularımızda sham grubu ve sham+50 mg/kg Amiodaron verilmiş grup ile CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş

grup sıçanlar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinin GSH düzeyleri gibi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü . CLP grubu ile CLP + 25 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında 25 mg/kg Amiodaron verilen grupta SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0.05$). CLP grubu ile CLP + 25 ve 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş grup karşılaştırıldığında da 25-50 mg/kg Amiodaron verilen grupta SOD aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Ancak 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozda Amiodaron verilmiş CLP'li gruplar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi . Sham grubu ve 50 mg/kg Amiodaron verilmiş sham grup ile 50 mg/kg Amiodaron verilmiş CLP ile indüklenmiş sepsis oluşturulmuş grup karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı da gözlemlendi.

Diğer yandan, çalışmamızda oksidatif hasarda oluşan lipid radikallerini belirlemek için en çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemi olan malondialdehit (MDA) düzeylerinin CLP indüksiyonu ile anlamlı derecede arttığı ve 25-50 mg/kg dozunda Amiodaron tedavisi verilen CLP'li sıçanlarda bu düzeylerin anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü. Sunulan çalışmada, CLP sonrası lipid radikalleri seviyesinin artışı diğer deneysel çalışmalarla korelasyon halindedir^{128, 129}. Daha önce yapılan bir çalışmada, Amiodoran'un direk olarak OH radikallerini temizleme yeteneği olduğu ve kardiyak dokuda antioksidan etkisi olduğu rapor edilmişti⁹⁴. Çalışmamızda elde edilen bulgular ratlarda Amiodaron'un antioksidan ve antienflamatuar etkisi olduğunu bildiren önceki çalışmalar ile uyumlu dur^{19, 91}.

6. SONUÇ

Bu çalışma, Amiodaron'un antioksidan ve antisitokin potansiyele sahip olduğunu gösterdi.

Diğer bir deyişle, Amiodaron sepsis koşullarında TNF- α ve IL-1 gibi enflamatuar sitokinleri azaltırken SOD, GSH ve MDA'nın negatif değişimini düzeltti.

Bu sonuçlara göre; Amiodaron'un terapötik uygulamasının böbrek dokusunu oksidatif stres ve sitokin fırtınasına karşı koruyacağı ve mortaliteyi de azaltacağı ifade edilebilir.

Bu açıdan Amiodaron'un antiaritmik etkilerinin değil, farklı pleyiotropik etkilerinin incelenmesi gereklidir.

Bu ratlarda yapılmış bir deneysel çalışma olup, klinik olarak doz ve zamanla bağımlı çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1546-54.
2. Bone RC. The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. *Clin Chest Med*, 1996, 17: 175-81.
3. Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo 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: 77-9.
4. Bone RC. Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. *Chest*, 1991, 100: 802-8.
5. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF, Jr., Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg*, 1991, 57: 86-8.
6. Balk RA, Bone RC. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Crit Care Clin*, 1989, 5: 1-8.
7. Breuille D, Voisin L, Contrepois M, Arnal M, Rose F, Obled C. A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis. *Infect Immun*, 1999, 67: 1079-85.
8. Cine I, Oral U. Son gelişmelerle: SIRS, PARS ve NF-KB. *Türk Anest Rean Cem Mecmuası* 2000; 28:236-41.
9. Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med*, 1997, 25: 405-12.
10. Heller S, Weber K, Heller A, Urbaschek R, Koch T. Pentoxifylline improves bacterial clearance during hemorrhage and endotoxemia. *Crit Care Med*, 1999, 27: 756-63.
11. Kruttgen A, Rose-John S. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *J Interferon Cytokine Res*, 2012, 32: 60-5.
12. Buttkie TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 1994, 15: 7-10.
13. Compton CN, Franko AP, Murray MT, Diebel LN, Dulchavsky SA. Signaling of apoptotic lung injury by lipid hydroperoxides. *J Trauma*, 1998, 44: 783-8.
14. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2001, 345: 1368-77.
15. Neveu H, Kleinknecht D, Brivet F, Loirat P, Landais P. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. The French Study Group on Acute Renal Failure. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, 11: 293-9.
16. Santangeli P, Di Biase L, Burkhardt JD, Bai R, Mohanty P, Pump A, Natale A. Examining the safety of amiodarone. *Expert Opin Drug Saf*, 2012, 11: 191-214.
17. Kodama I, Kamiya K, Toyama J. Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent. *Am J Cardiol*, 1999, 84: 20R-28R.
18. Fink MP. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002, 5: 167-74.
19. Halici Z, Dengiz GO, Odabasoglu F, Suleyman H, Cadirci E, Halici M. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. *Eur J Pharmacol*, 2007, 566: 215-21.
20. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin*, 2009, 25: 83-101, viii.
21. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.

The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1992, 101: 1644-55.

22. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001, 29: 1303-10.
23. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le Gall R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*, 2002, 28: 108-21.
24. Centers for Disease Control (CDC). Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia—United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1990 Jan 19;39(2):31-4.
25. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, International Sepsis Definitions C. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, 2003, 29: 530-8.
26. Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173: 256-63.
27. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D, Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients I. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 2006, 34: 344-53.
28. Aygen B, Kayabaş Ü, Güven M, Doğanay M, Sümerkan B, Yıldız O. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yoğun Bakım Üniteleri nazokomiyal infeksiyonları surveyansı: Epidemiyoloji, risk faktörleri ve prognozu etkileyen faktörler. *Yoğun Bakım Dergisi* 2001; 1:122-30.
29. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med*, 1991, 115: 457-69.
30. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002, 420: 885-91.
31. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 2003, 348: 138-50.
32. Karaali R, Tabak F. Sepsis Patogenezi *Klinik Gelişim* 2009 22:71-76.
33. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, 249: 1431-3.
34. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, Calandra T. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis*, 1995, 171: 639-44.
35. Leturcq DJ, Moriarty AM, Talbott G, Winn RK, Martin TR, Ulevitch RJ. Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. *J Clin Invest*, 1996, 98: 1533-8.
36. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, 406: 782-7.
37. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun*, 2002, 70: 1033-41.
38. Yorgancı K. Sepsis patofizyolojisi. *Yoğun Bakım Dergisi* 2005; 2:80-1.
39. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*, 2001, 345: 588-95.
40. Wan L, Bagshaw SM, Langenberg C, Sautome T, May C, Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit Care Med*, 2008, 36: S198-203.
41. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C, Beginning, Ending Supportive Therapy for the Kidney I. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*, 2005, 294: 813-8.
42. Terblanche M, Almog Y, Rosenson RS, Smith TS, Hackam DG. Statins: panacea for sepsis? *Lancet Infect Dis*, 2006, 6: 242-8.
43. Ostermann M, Chang RW. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE. *Crit Care Med*, 2007, 35: 1837-43; quiz 1852.
44. Gibney RT, Bagshaw SM, Kutsogiannis DJ, Johnston C. When should renal replacement therapy for acute kidney injury be initiated and discontinued? *Blood Purif*, 2008, 26: 473-84.

45. Gibney N, Hoste E, Burdmann EA, Bunchman T, Kher V, Viswanathan R, Mehta RL, Ronco C. Timing of initiation and discontinuation of renal replacement therapy in AKI: unanswered key questions. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008, 3: 876-80.
46. Akıncı SB. Sepsis ve akut böbrek yetersizliği. *Journal of the Turkish Society of Intensive Care* 2010;1:7-17.
47. Ersöz T, Atorvastatinin rat intraabdominal sepsis modelinde sekonder böbrek hasarı üzerine olan etkilerinin araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD Uzmanlık Tezi 2011.
48. Akkuş M, Levosimendan'ın deneysel abdominal sepsis modelinde Akut böbrek hasarı üzerine olan etkileri. Dokuz Eylül Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD Uzmanlık Tezi 2012.
49. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A, Acute Kidney Injury N. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*, 2007, 11: R31.
50. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, Acute Dialysis Quality Initiative w. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*, 2004, 8: R204-12.
51. Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, Kellum JA. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care*, 2006, 10: R73.
52. Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P, Bonventre JV. Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8: 526-34.
53. Cankurtaran M, Kıyıkım A. Sepsiste Renal Hemodinami ve Mediyatörler. *Erciyes Tıp Dergisi*.2002; 24(4): 202-208.
54. Hoffman J, Hartl W. Hemofiltration in human sepsis: Evidence for elimination of immunomodulatory substances. *Kidney Int* 48:1563-1570, 1995.
55. Heering P, Morgera S, Schmitz FJ, Schmitz G, Willers R, Schultheiss HP, Strauer BE, Grabensee B. Cytokine removal and cardiovascular hemodynamics in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med*, 1997, 23: 288-96.
56. Rogiers P. Hemofiltration treatment for sepsis: is it time for controlled trials? *Kidney Int Suppl*, 1999: S99-103.
57. De Vriese AS, Colardyn FA, Philippe JJ, Vanholder RC, De Sutter JH, Lameire NH. Cytokine removal during continuous hemofiltration in septic patients. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10: 846-53.
58. Brenner M, Schaer GL, Mallory DL, Suffredini AF, Parrillo JE. Detection of renal blood flow abnormalities in septic and critically ill patients using a newly designed indwelling thermodilution renal vein catheter. *Chest*, 1990, 98: 170-9.
59. Heemskerk AE, Huisman E, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Hennekes M, Thijs LG, Tangelder GJ. Renal function and oxygen consumption during bacteraemia and endotoxaemia in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 1997, 12: 1586-94.
60. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, Fisher CJ, Jr., Faist E, Reinhart K. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med*, 2003, 31: 1560-7.
61. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*, 2007, 35: 2408-16.
62. Shmueli H, Pitlik S, Drucker M, Samra Z, Konisberger H, Leibovici L. Prediction of mortality in patients with bacteremia: the importance of pre-existing renal insufficiency. *Ren Fail*, 2000, 22: 99-108.
63. Klahr S. Role of arachidonic acid metabolites in acute renal failure and sepsis. *Nephrol Dial Transplant*, 1994, 9 Suppl 4: 52-6.

64. Shieh P, Zhou M, Ornan DA, Chaudry IH, Wang P. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide occurs later than the onset of the hyperdynamic response during sepsis. *Shock*, 2000, 13: 325-9.
65. Filep JG. Role for endogenous endothelin in the regulation of plasma volume and albumin escape during endotoxin shock in conscious rats. *Br J Pharmacol*, 2000, 129: 975-83.
66. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*. Konya. 1995.
67. Thijs A, Thijs LG. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney Int Suppl*, 1998, 66: S34-7.
68. Raza A. Anti-TNF therapies in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, sepsis, and myelodysplastic syndromes. *Microsc Res Tech*, 2000, 50: 229-35.
69. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB. 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.
70. Bengtson A, Redl H, Schlag G, Hogasen K, et al. AntiTNF treatment of baboons with sepsis reduces TNF-alpha, IL-6, IL-8, but not the degree of complement activation. *Scand J Immunology* 1998; 48: 509-514.
71. Conger J, Robinette J, Villar A, Raij L, Shultz P. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in postischemic acute renal failure in rats. *J Clin Invest*, 1995, 96: 631-8.
72. Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. *Crit Care Med*, 1999, 27: 913-22.
73. Avontuur JA, Tutein Nolthenius RP, van Bodegom JW, Bruining HA. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Crit Care Med*, 1998, 26: 660-7.
74. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R, Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric S. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*, 2013, 39: 165-228.
75. Akpınar S, Tekeli E. Septik Şok: Klinik Yaklaşım-Patogenez-Terapötik Yaklaşım. In: Şahinoğlu AH (ed.). *Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri Kitabı*. Ankara: Türkiye Klinikleri Tıp Kitabevi, 1992; 567-574.
76. Kütük S, Yoğun bakım ünitesinde takip edilen sepsisli hastalarda immunglobulin G-M-A kombinasyonunun böbrekler fonksiyonları üzerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD Uzmanlık Tezi 2011.
77. Süzer Ö. Renal ve kardiovasküler fonksiyonlara etkili ilaçlar. İçinde: Tedavinin farmakolojik temeli. Süzer Ö (Çeviri editörü). *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 920-921.
78. McKee MR. Amiodarone-an "old" drug with new recommendations. *Curr Opin Pediatr*, 2003, 15: 193-9.
79. Gonzalez ER, Kannewurf BS, Ornato JP. Intravenous amiodarone for ventricular arrhythmias: overview and clinical use. *Resuscitation*, 1998, 39: 33-42.
80. Nattel S, Talajic M. Recent advances in understanding the pharmacology of amiodarone. *Drugs*, 1988, 36: 121-31.
81. Naccarelli GV, Wolbrette DL, Dell'Orfano JT, Patel HM, Luck JC. Amiodarone: what have we learned from clinical trials? *Clin Cardiol*, 2000, 23: 73-82.
82. Naccarelli GV, Wolbrette DL, Patel HM, Luck JC. Amiodarone: clinical trials. *Curr Opin Cardiol*, 2000, 15: 64-72.
83. Mason JW. Amiodarone. *N Engl J Med*, 1987, 316: 455-66.

84. Connolly SJ. Evidence-based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation*, 1999, 100: 2025-34.
85. Kowey PR, Levine JH, Herre JM, Pacifico A, Lindsay BD, Plumb VJ, Janosik DL, Kopelman HA, Scheinman MM. Randomized, double-blind comparison of intravenous amiodarone and bretylium in the treatment of patients with recurrent, hemodynamically destabilizing ventricular tachycardia or fibrillation. The Intravenous Amiodarone Multicenter Investigators Group. *Circulation*, 1995, 92: 3255-63.
86. Dorian P, Cass D, Schwartz B, Cooper R, Gelaznikas R, Barr A. Amiodarone as compared with lidocaine for shock-resistant ventricular fibrillation. *N Engl J Med*, 2002, 346: 884-90.
87. Roy D, Talajic M, Dorian P, Connolly S, Eisenberg MJ, Green M, Kus T, Lambert J, Dubuc M, Gagne P, Nattel S, Thibault B. Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. Canadian Trial of Atrial Fibrillation Investigators. *N Engl J Med*, 2000, 342: 913-20.
88. Herbette LG, Trumbore M, Chester DW, Katz AM. Possible molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of three membrane-active drugs: propranolol, nimodipine and amiodarone. *J Mol Cell Cardiol*, 1988, 20: 373-8.
89. Levine JH, Moore EN, Kadish AH, Weisman HF, Balke CW, Hanich RF, Spear JF. Mechanisms of depressed conduction from long-term amiodarone therapy in canine myocardium. *Circulation*, 1988, 78: 684-91.
90. Dusman RE, Stanton MS, Miles WM, Klein LS, Zipes DP, Fineberg NS, Heger JJ. Clinical features of amiodarone-induced pulmonary toxicity. *Circulation*, 1990, 82: 51-9.
91. Polat B, Cadirci E, Halici Z, Bayir Y, Unal D, Bilgin BC, Yuksel TN, Vancelik S. The protective effect of amiodarone in lung tissue of cecal ligation and puncture-induced septic rats: a perspective from inflammatory cytokine release and oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2013, 386: 635-43.
92. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*, 2002, 86: 41-59.
93. Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillement J. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 49: 151-74.
94. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Takeshita A. Amiodarone protects cardiac myocytes against oxidative injury by its free radical scavenging action. *Circulation*, 1999, 100: 690-2.
95. Ribeiro SM, Campello AP, Nascimento AJ, Kluppel ML. Effect of amiodarone (AMD) on the antioxidant enzymes, lipid peroxidation and mitochondrial metabolism. *Cell Biochem Funct*, 1997, 15: 145-52.
96. Wilson BD, Clarkson CE, Lippmann ML. Amiodarone causes decreased cell-mediated immune responses and inhibits the phospholipase C signaling pathway. *Lung*, 1993, 171: 137-48.
97. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 1968, 25: 192-205.
98. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402-8.
99. Antonini JM, McCloud CM, Reasor MJ. Acute silica toxicity: attenuation by amiodarone-induced pulmonary phospholipidosis. *Environ Health Perspect*, 1994, 102: 372-8.
100. Blake TL, DiMatteo M, Antonini JM, McCloud CM, Reasor MJ. Subchronic pulmonary inflammation and fibrosis induced by silica in rats are attenuated by amiodarone. *Exp Lung Res*, 1996, 22: 113-31.
101. Karpel JP, Mitsudo S, Norin AJ. Natural killer cell activity in a rat model of amiodarone-induced interstitial lung disease. *Chest*, 1991, 99: 230-4.
102. Padmavathy B, Niranjali S, Devaraj H. Lung injury by amiodarone, an antiarrhythmic drug, in male rats. *Indian J Exp Biol*, 1992, 30: 653-4.
103. Young RA, Mehendale HM. Effects of short-term and long-term administration of amiodarone on hepatobiliary function in male rats. *J Appl Toxicol*, 1989, 9: 407-12.

104. Shayeganpour A, Hamdy DA, Brocks DR. Pharmacokinetics of desethylamiodarone in the rat after its administration as the preformed metabolite, and after administration of amiodarone. *Biopharm Drug Dispos*, 2008, 29: 159-66.
105. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*, 1996, 77: 110-7.
106. Bhatia M, Moomchala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*, 2004, 202: 145-56.
107. Johnson J, Meyrick B, Jesmok G, Brigham KL. Human recombinant tumor necrosis factor alpha infusion mimics endotoxemia in awake sheep. *J Appl Physiol (1985)*, 1989, 66: 1448-54.
108. Wheeler AP, Jesmok G, Brigham KL. Tumor necrosis factor's effects on lung mechanics, gas exchange, and airway reactivity in sheep. *J Appl Physiol (1985)*, 1990, 68: 2542-9.
109. Endo S, Inada K, Inoue Y, Kuwata Y, Suzuki M, Yamashita H, Hoshi S, Yoshida M. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock*, 1992, 38: 264-74.
110. Kuwano K, Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22: 147-9.
111. Cadirci E, Altunkaynak BZ, Halici Z, Odabasoglu F, Uyanik MH, Gundogdu C, Suleyman H, Halici M, Albayrak M, Unal B. Alpha-lipoic acid as a potential target for the treatment of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats. *Shock*, 2010, 33: 479-84.
112. Li QF, Zhu YS, Jiang H, Xu H, Sun Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of isoflurane preconditioning in LPS-stimulated macrophages. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 228-34.
113. Bertani T, Abbate M, Zoja C, Corna D, Perico N, Ghezzi P, Remuzzi G. Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit. *Am J Pathol*, 1989, 134: 419-30.
114. Ozbakis-Dengiz G, Halici Z, Akpinar E, Cadirci E, Bilici D, Gursan N. Role of polymorphonuclear leukocyte infiltration in the mechanism of anti-inflammatory effect of amiodarone. *Pharmacol Rep*, 2007, 59: 538-44.
115. Eisenhut M, Wallace H. Ion channels in inflammation. *Pflugers Arch*, 2011, 461: 401-21.
116. Uyanik A, Unal D, Uyanik MH, Halici Z, Odabasoglu F, Altunkaynak ZB, Cadirci E, Keles M, Gundogdu C, Suleyman H, Bayir Y, Albayrak M, Unal B. The effects of polymicrobial sepsis with diabetes mellitus on kidney tissues in ovariectomized rats. *Ren Fail*, 2010, 32: 592-602.
117. Albayrak A, Uyanik MH, Odabasoglu F, Halici Z, Uyanik A, Bayir Y, Albayrak F, Albayrak Y, Polat B, Suleyman H. The effects of diabetes and/or polymicrobial sepsis on the status of antioxidant enzymes and pro-inflammatory cytokines on heart, liver, and lung of ovariectomized rats. *J Surg Res*, 2011, 169: 67-75.
118. Kim YH, Park SM, Kim M, Kim SH, Lim SY, Ahn JC, Song WH, Shim WJ. Cardioprotective effects of rosuvastatin and carvedilol on delayed cardiotoxicity of doxorubicin in rats. *Toxicol Mech Methods*, 2012, 22: 488-98.
119. Momin FN, Kalai BR, Shikalgar TS, Naikwade NS. Cardioprotective effect of methanolic extract of *Ixora coccinea* Linn. leaves on doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Indian J Pharmacol*, 2012, 44: 178-83.
120. Naito Y, Yoshikawa T, Yoshida N, Kondo M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci*, 1998, 43: 30S-34S.
121. Huang GJ, Huang SS, Lin SS, Shao YY, Chen CC, Hou WC, Kuo YH. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of ergostatrien-3beta-ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 7445-52.
122. Tohda C, Nakayama N, Hatanaka F, Komatsu K. Comparison of Anti-inflammatory Activities of Six Curcuma Rhizomes: A Possible Curcuminoid-independent Pathway Mediated by Curcuma phaeocaulis Extract. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2006, 3: 255-60.
123. Cadirci E, Halici Z, Odabasoglu F, Albayrak A, Karakus E, Unal D, Atalay F, Ferah I, Unal B. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. *Clin Exp Immunol*, 2011, 166: 374-84.
124. Coskun AK, Yigiter M, Oral A, Odabasoglu F, Halici Z, Menten O, Cadirci E, Atalay F, Suleyman H. The effects of montelukast on antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines on the heart,

liver, lungs, and kidneys in a rat model of cecal ligation and puncture-induced sepsis.

ScientificWorldJournal, 2011, 11: 1341-56.

125. Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96: 171-6.

126. El-Missiry MA, El-Sayed IH, Othman AI. Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38: 694-700.

127. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 1994, 344: 721-4.

128. Basu S, Hellberg A, Ulus AT, Westman J, Karacagil S. Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia. *FEBS Lett*, 2001, 508: 36-8.

129. Sakamoto M, Takaki E, Yamashita K, Watanabe K, Tabuchi S, Watanabe T, Satoh K. Nonenzymatic derived lipid peroxide, 8-iso-PGF₂ alpha, participates in the pathogenesis of delayed cerebral vasospasm in a canine SAH model. *Neurol Res*, 2002, 24: 301-6.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK İNTRAABDOMİNAL SEPSİS OLUŞTURULAN
RATLARDA AMİDARON'UN BÖBREKLER ÜZERİNE KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Onur YALÇIN

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi : 13.11.2008

Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi : 05.05.2014

Uzmanlık Sınavı Tarihi : 05.05.2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Akgün ORAL

Jüri üyesi : Prof. Dr. A. Bedii SALMAN

Jüri üyesi : Prof. Dr. Nazım DOĞAN

Jüri üyesi : Doç. Dr. Murat YİĞİTER

Jüri üyesi : Doç. Dr. Akgün ORAL

Jüri üyesi : Doç. Dr. İbrahim CANER

Prof. Dr. A. Bedii SALMAN
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Mayıs-2014
ERZURUM