

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**N-ASETİLSİSTEİNİN RAT İNTRAABDOMİNAL
SEPSİS MODELİNDE BÖBREK APOPTOZİSİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR.HATİCE FİDAN

**UZMANLIK TEZİ
İZMİR-2011**

-

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**N-ASETİLSİSTEİNİN RAT İNTRAABDOMİNAL
SEPSİS MODELİNDE BÖBREK APOPTOZİSİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR.HATİCE FİDAN

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	ii
GRAFİK LİSTESİ.....	iii
RESİM LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET).....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1.Sepsis	5
4.2.Sepsiste Klinik	7
4.3.Sepsiste Patogenez	8
4.4.Sepsis Gelişiminde Apoptozis	10
4.4.1.Apoptozisin Tanımı	10
4.4.2. Apoptozis Yolakları	10
4.4.3.Apoptozis ve Organ Disfonksiyonu	14
4.4.4. Apoptozisi Saptama Yöntemleri	14
4.5. Sepsiste Terapötik Seçenekler	16
4.6. N-asetil sistein	18
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
5.1. Çekal Ligasyon Perforasyon Modeli	21
5.2. Deney Protokolü	22
5.3. Biyokimyasal İnceleme	23
5.4. Histomorfolojik İnceleme	24
5.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme	25
5.6.İstatistiksel Değerlendirme	25

6. BULGULAR.....	26
6.1. Işık Mikroskopik Bulgular	29
6.2. Kaspaz-3 İmmunhistokimyasal Boyanma Skorlaması	35
6.3. MDA Düzeyleri	35
7. TARTIŞMA.....	34
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
9. KAYNAKLAR.....	38

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 : PIRO konseptinin tanımı 7

Tablo 2 : Mevcut ve yeni tedavi örnekleri 17

SEKIL LİSTESİ

Şekil 1 : Sepsisin patogenezi	9
Şekil 2 : Apoptozis yolları	11
Şekil 3 : Apoptozisdeki morfolojik değişiklikler.....	13
Şekil 4 : N-asetil sisteinin kimyasal yapısı	18
Şekil 5 : GSH ın antioksidan etkisi.....	18
Şekil 6 : NAS ın endotelial apoptozis ve ateroskleroza etkisi	20
Şekil 7 : Deney protokolünün şematik gösterimi	23

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Grupların proksimal tubuluslardaki yapısal değişiklikleri.....	29
Grafik 2: Grupların mononükleer hücre infiltrasyonu.....	29
Grafik 3: Grupların eritrosit ekstravazasyonu.....	30
Grafik 4: Grupların intertisyel alandaki yapısal değişiklikleri.....	30
Grafik 5: Grupların kaspaz 3 immünreaktivitesi.....	32
Grafik 6: Grupların malondialdehid düzeyleri.....	33

RESİM LİSTESİ

Resim 1: ÇLP cerrahisi	22
Resim 2: Böbrek dokusu sham grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri.	26
Resim 3: Böbrek dokusu sepsis grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri.	27
Resim 4: Böbrek dokusu NAS grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüler...	28
Resim 5: Böbrek dokusu sham grubuna ait kaspaz-3 immunhistokimyasal boyamaya ait kesit görüntüleri	31
Resim 6: Böbrek dokusu sepsis grubuna ait kaspaz-3 immunhistokimyasal boyamaya ait kesit görüntüleri.....	31
Resim 7: Böbrek dokusu NAS grubuna ait kaspaz-3 immunhistokimyasal boyamaya ait kesit görüntüleri.....	32

KISALTMALAR

- AİF** : Apoptoz indükleyici faktör
- ALİ** : Akut akciğer hasarı
- ARDS** : Akut respiratuvar distres sendromu
- Apaf-1** : Apoptotik proteaz aktive eden faktör
- BH** : Homoloji bölgesi
- CASPASES**: Caspases cysteinyl aspartate-specific proteinases
- CVP** : Santral venöz basınç
- ÇLP** : Çekal ligasyon perforasyon
- GSH** : İndirgenmiş Glutasyon
- HPLC** : Yüksek verimli sıvı kromatografisi
- ISEL** : İn situ end-labeling
- İAP** : İnhibitör apoptoz proteinleri
- LPS** : Lipopolisakkarit
- MDA** : Malondialdehit
- MODS** : Multipl organ disfonksiyonu sendromu
- NACA** : N-acetylcysteine amide
- NAS** : N-Asetil sisteinin
- NO** : Nitrik oksit
- OAB** : Ortalama arter basıncı
- APC** : Aktive protein C
- PAF** : Platelet aktive edici faktör
- PARS** : Poly ADP-riboz sentaz
- SOR** : Serbest oksijen radikalleri
- SIRS** : Sistemik inflamasyon yanıtı sendromu
- SKB** : Sistolik kan basıncı
- SvO₂** : Mixed venöz oksijen saturasyonu
- TBA** : Tiyobarbiturik asid
- TNF** : Tümör nekroz faktör
- TRAIL** : *TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand*
- TÜNEL** : The terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde emeği geçen değerli hocalarıma, asistan arkadaşlarıma, anestezi yoğun bakım hemşirelerine ve anestezi teknikerlerine,

Tez danışmanım Doç.Dr.Uğur Koca'ya katkılarından ve sabrından dolayı teşekkür ederim.

Dr .Hatice Fidan

ÖZET

N-Asetilsisteinin Rat İntraabdominal Sepsis Modelinde Böbrek Apoptozisi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması

Dr. Hatice Fidan; DEUTF Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İZMİR

Amaç: Bu çalışmada, rat intraabdominal sepsis modelinde N-Asetilsisteinin (NAS)'in renal apoptozis üzerindeki etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Deney Hayvanları Etik Kurulundan izin alındıktan sonra ağırlıkları 200-250 gr olan 21 adet Wistar tipi erişkin erkek rat randomize olarak üç gruba ayrıldı: *sham*, sepsis ve NAS grubu. *Sham* grubuna sadece laparotomi, sepsis ve NAS grubuna çekal ligasyon perforasyon (ÇLP) cerrahisi uygulandı. *Sham* ve sepsis grubuna 1 mL salin, NAS grubuna ise 150 mg/kg/gün NAS günde bir defa 3 gün intraperitoneal(IP) olarak uygulandı. Son dozdan 6 saat sonra deneklere anestezi altında orta hattan laparotomi uygulandı, her iki böbrek biyokimyasal ve histopatolojik örnekleme için çıkartıldı. Dokular malondialdehid (MDA) düzeyi, renal korpüskül ve proksimal tubulusdaki yapısal değişiklikler, mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu ve sistein aspartat-spesifik proteinaz immünreaktivitesi (kaspaz-3) bakımından karşılaştırıldı. Verilerin analizinde *Kruskal-Wallis* varyans analizi ve *Mann-Witney U* testleri kullanıldı.

Bulgular: Gruplar proksimal tubuluslardaki yapısal değişiklikler, kaspaz 3 immünreaktivitesi, mononükleer hücre infiltrasyonları ve eritrosit ekstravazasyonu bakımından karşılaştırıldığında, *sham* grubuna göre sepsis grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Mononükleer hücre infiltrasyonları ve eritrosit ekstravazasyonu sepsise göre NAS grubunda anlamlı olarak azaldı ($p<0,05$). İntertisyel alandaki yapısal değişiklikler *sham* grubuna göre sepsis ve NAS gruplarında benzer olarak arttı ($p<0,05$).

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular, sepsisin erken döneminde NAS uygulamasının böbrekte antienflamatuvar etki oluşturduğunu göstermektedir. Serbest oksijen radikali süpürücüsü olan NAS'in apoptozise etkisinin spesifik çalışmalar ile değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, apoptozis, kaspaz 3, NAS, böbrek

SUMMARY

The study on the effect of N-acetylcysteine on kidney apoptosis in a rat intraabdominal sepsis model.

Dr. Hatice Fidan; DEU School of Medicine, Department of Anaesthesiology and Reanimation, İZMİR

Objective: The objective of this study was to examine the effect of NAC (N-acetylcysteine) on kidney apoptosis using a rat intraabdominal sepsis model

Methods: Following the necessary approvals were obtained from the Laboratory Animals Ethics Committee, 21 adult male Wistar rats weighing between 200 and 250 grs were randomised into three study groups: sham, sepsis, and NAC groups. In sham group, only laparotomy was performed, whereas in both sepsis and NAC groups cecal ligation and perforation were done. Sham and sepsis groups were given once daily 1 mL saline for three times. In NAC group 150 mg/kg/day NAC was given intraperitoneally for three days. Six hours after the last dose, midline laparotomy was performed to all rats, and both kidneys were removed for biochemical and histopathological sampling. Findings from these tissues were compared based on MDA levels, structural changes in renal corpus and proximal tubules, mononuclear cell infiltration, erythrocyte extravasation and cysteinyl aspartate-specific proteinases (caspases)-3 immunoreactivity. Data were analysed using Kruskal-Wallis variance analysis, and Mann-Witney U tests.

Results: Structural changes in proximal tubules, caspase-3 immunoreactivity and mononuclear cell infiltration and erythrocyte extravasation were significantly increased in sepsis group when compared with sham ($p<0,05$). Mononuclear cell infiltration and erythrocyte extravasation were significantly decreased in NAC group when compared with sepsis ($p<0,05$). Structural changes in interstitial space were increased in both sepsis and NAC groups when compared with sham ($p<0,05$).

Conclusion: Although the findings of this study demonstrated an anti-inflammatory effect of NAC on kidneys when used during early sepsis. It was concluded that NAC as a free radical scavenger should be further studied for its potential effects on cell healing and prevention of apoptosis.

Key words: Sepsis, apoptosis, caspase -3, NAC, kidney

GİRİŞ VE AMAC

Sepsis ve septik şok, ileri yoğun bakım desteği ve uygulanan modern tedavilere rağmen % 30-90 oranındaki mortalitesi nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (1,2). Patogenezi enfeksiyona karşı sistemik inflamatuvar yanıtı içermektedir. Hastanın inflamatuvar yanıtı aşırı olunca ciddi kardiyovasküler instabilite, çoklu organ yetersizliği, koagülopati ve ölüm gelişebilmektedir (3).

Sepsis, iskemik reperfüzyon hasarı, toksik nefropati, hipovolemi ve üriner sistem obstrüksiyonları akut böbrek yetmezliğine neden olabilmektedir (4).

Akut böbrek yetmezliği insidansı sepsiste %19, ağır sepsiste %27 ve septik şokta %51'dir. Sepsisteki akut böbrek yetmezliği patogenezinde başlıca sistemik ve lokal mediyatörler, nötrofil-endotel etkileşimleri, mikrovasküler trombozlar, renal hipoperfüzyon ve reperfüzyon hasarı suçlanmıştır. Norepinefrin, anjiyotensin II, vazopressin sepsisteki önemli sistemik mediyatörlerdir. Lokal mediyatörler arasında ise başta tümör nekrozis faktör (TNF) olmak üzere interlökin (IL)1, adezyon molekülleri, serbest oksijen radikalleri, tromboksan A₂, prostaglandin E₂, lökotrienler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, endotelin, nitrik oksit ve adenozin sayılabilir (5). Akut böbrek yetmezliğindeki renal hücre ölümü, nekrozun yanı sıra apoptozise de bağlıdır (4).

Apoptozis, organizmada genetik olarak programlanmış bir hücre ölümü şeklindedir.

Epiteliyal hücrelerdeki apoptoziste en az üç ana yolak rol oynamaktadır :

1. Reseptör aracılı (ekstresek) yolak, hücreye Fas (CD 95) gibi transmembran hücre ölüm reseptörlerinin ve TNF reseptörlerinin bağlanması ile tetiklenebilir.

2. İntresek yolak sitokrom-c gibi proapoptotik faktörlerin mitokondriden sitozole salınmasını içerir ve Bcl-2 protein ailesi tarafından regüle edilir.

3. Sitotoksik T hücreler ve natürel öldürücü hücrelerin rol aldığı yolak(7).

Apoptozis antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge tarafından düzenlenir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri apoptozisin düzenlenmesinde belirleyici bir role sahiptir. Bcl-2, hücre proliferasyonuna neden olmadan hücrenin canlılığını sağlayan apoptozis inhibitörüdür (8). Bax protein (bcl-2-associated x protein) proapoptotik aktivite göstermektedir (8). Bax protein apoptotik sinyal alındıktan sonra mitokondri zarına bağlanır ve buradan apoptoziste görevli sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımına neden olarak programlı hücre ölümünü indükler (9).

Apoptoz ve hücre sağkalımının hücrel mekanizmalarının ortaya konması, kalp hastalıkları, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, AIDS ve birçok hastalığın tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin ortaya atılmasına olanak sağlamıştır (6).

Süperoksid radikal (SOR) oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. SOR'ler hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Serbest radikaller son derece reaktif ve kısa ömürlüdürler. Bu yüzden direkt olarak ölçülmeleri zordur. Serbest radikal üretimi artışı-nın belirlenmesi için malondialdehid (MDA) gibi lipid peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçümü en çok kullanılan yöntemdir.

Yaygın kullanılan antioksidanlar (örneğin C vitamini, K vitamini ve lipoik asit) glutatyon sentezi yapmaksızın direkt SOR'larını nötralize ederler. NAS'ın, glutatyon sentezi için gereken sisteini temin etmesi ve glutatyon peroksidaz aktivitesini artırması nedeniyle, oksidatif stresle ilişkili hasarda daha etkili ve güvenli olduğu gösterilmiştir (11).

Özdülger ve ark.nın (13) yaptığı bir çalışmada, ratlarda geliştirilen sepsis modelinde 7 gün süreyle uygulanan NAS tedavisinin akciğerlerde apoptozisi durdurduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, rat intraabdominal sepsis modelinde NAS'ın renal apoptozis üzerindeki etkisini, doku MDA düzeyini, kaspaz-3 immünreaktivitesini, proksimal tubuluslardaki yapısal değişiklikleri, tübüler atrofiyi, tübüler fırçamsı kenar kaybını, tübüler dilatasyonu, kast formasyonunu, vakuolizasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonunu, eritrosit ekstrasvazyonunu, renal korpüskül morfolojisindeki değişiklikleri tespit ederek araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Sepsis ve septik şok, mortalitesi yüksek, sıklığı giderek artan, sekellerinin rehabilitasyonu zor, son derece karmaşık patofizyolojik olayların olduğu bir klinik durumdur. Sepsis ve septik şok yüksek morbidite, mortalitesi nedeniyle acil ve agresif tedavi gerektirir (14).

Sepsis: 1992'de ACCP ve SCCM'nin düzenlediği bir konsensus konferansından sonra Bone ve ark. (15) sepsisi, infeksiyonun tetiklediği sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) olarak tanımlamıştır.

SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu aşağıdakilerden iki veya daha fazlasının varlığı olarak tanımlanmıştır:

1. Vücut sıcaklığı $> 38^{\circ}\text{C}$ veya $< 36^{\circ}\text{C}$.
2. Kalp Tepe Atımı $> 90/\text{dk}$.
3. Solunum Sayısı $> 20/\text{dk}$.
4. Lökosit sayısı $> 12000/\text{mm}^3$ veya $< 4000/\text{mm}^3$ ya da immatür hücre oranı $> \%10$.

SIRS belirteçleri nonspesifik olduğu için 2001 uzlaşma toplantısında "infeksiyona sistemik inflamasyon yanıt" belirteçleri eklenmiştir. Bazı durumlarda sepsisin ilk belirtileri hemodinamik instabilite veya organ yetmezliği olabilir. Bu nedenle bu tabloya organ fonksiyon bozukluklarına ait parametreler de eklenmiştir. SIRS, sepsis ve ilişkili tabloların tanımları yeniden yayınlanmıştır. Gözden geçirilmiş konsensus konferansı tanımları (16):

Sepsis; aşağıda sıralanan değişkenlerden birkaçını sergileyen, şüphelenilen veya belgelenmiş enfeksiyon varlığı yada şüphesidir.

1. Genel değişkenler

- Ateş ($1\text{S}1 > 38,3^{\circ}\text{C}$)
- Hipotermi ($1\text{S}1 < 36^{\circ}\text{C}$)
- Kalp atım sayısı $> 90/\text{dk}$. veya yaşa göre normal değerlerinden standart sapma > 2 olması
- Takipne $> 30/\text{dk}$
- Değişmiş mental durum
- Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte $> 20\text{ml}/\text{kg}$)
- Diyabet yokluğunda hiperglisemi (plazma glukoz $> 7,7 \text{ mmol}/\text{L}$ ya da $> 110\text{mg}/\text{dL}$)

2.İnflamatuvar değişkenler

- Lökositoz ($>12000 \text{ mm}^3$)
- Lökopeni ($<4000 \text{ mm}^3$)
- Beyaz küre sayısı normal olsada immatür formlarının %10'dan fazla olması
- Plazma C-reaktive protein düzeyi, normal değerlerden standart sapma >2 olması
- Plazma prokalsitonin düzeyi, normal değerlerden standart sapma >2 olması

3.Hemodinamik değişkenler

- Arteriyel hipotansiyon (Sistolik kan basıncı (SKB) $<90 \text{ mmHg}$, ortalama arter basıncı (OAB) $<60 \text{ mmHg}$ ya da SKB'nın, diğer hipotansiyon nedenleri yok iken, hastanın normal değerlerine göre $>40 \text{ mmHg}$ düşmesi
- Mix venöz oksijen satürasyonu (SvO_2) $>70\%$
- Kardiyak indeks $>3,5 \text{ L/dk/m}^2$

4.Organ disfonksiyon değişkenleri

- Arteriyel hipoksemi ($\text{PaO}_2 / \text{FİO}_2 <300$)
- Akut oligüri (saatlik idrar çıkışı $<0.5 \text{ ml/kg}$)
- Kreatin artışı ($>0.5 \text{ mg/dl}$)
- Koagülasyon anormallikleri ($\text{INR} >1,5$ veya $\text{APTT} >60$ saniye)
- İleus
- Trombositopeni (platelet sayısı $<100.000 \text{ uL}$)
- Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin $>4 \text{ mg/dL}$)

5.Doku perfüzyon değişkenleri

- Hiperlaktatemi ($>3 \text{ mmol/L}$)
- Azalan kapiller dolum

Ağır Sepsis: Sepsis ile birlikte organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon bulguları veya hipotansiyon varlığıdır.

Septik Sok: Yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen sepsis kaynaklı hipotansiyon ve hipoperfüzyon bulguları seklinde tanımlanmıştır.

Multiorgan Disfonksiyonu: Akut kritik hastada iki veya daha fazla organın etkilendiği ve homeostazın müdahale olmadan (mekanik ventilasyon, hemodiyaliz gibi) sağlanamadığı durum olarak tanımlanmıştır.

Sepsis tanı kriterleri, nonspesifik yapısı nedeniyle, tüm bu etyolojik yapıyı, sepsisin oluşum ve ilerleme mekanizmasını tanımlamakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle sepsisin gelişimini daha kesin şekilde tanımlayacak yeni bir sistem ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bu amaçla PIRO olarak adlandırılan daha geniş, detaylı ve sistematik bir tanımlama modeli önerilmiştir (16).

PIRO konseptinin tanımı **P**-predisposition, **I**- Insult, infection, **R**-response, **O**-organ dysfunction olarak yapılmıştır (Tablo 1).

Tanım	Bugün	Gelecek
Predisposition (Predispozisyon)	Kısa dönem sürvide azalmaya neden olan premorbid hastalık	İnflamatuar yanıtın komponentlerinde genetik polimorfizm (ör:TLR, TNF, IL1,CD14)
Infection-Insult (Enfeksiyon Hasar)	Kültür ve patojenlere duyarlılık	Mikrobiyal ürün ölçümleri (LPS, bakteriyel DNA)
Response (Yanıt)	SIRS, sepsis ve şokun diğer bulguları,CRP	Aktive inflamasyonun non-spesifik markerleri (ör:PCT veya IL-6) veya tedavi hedefinin spesifik araştırılması (ör:protein C,TNF)
Organ Dysfunction (Organ Disfonksiyonu)	Yetersizliğe giren organ sayısı veya MODS – SOFA gibi bir skorlama	Hasara-apoptoz, sitopatik hipoksi, hücrel stress'e hücrel yanıtın dinamik ölçümleri

Tablo 1. PIRO konseptinin tanımı

Sepsiste Klinik

Sepsisteki hastalarda tipik olarak ateş, taşikardi, takipne ve lökosit sayısında artış gibi sistemik inflamasyon bulguları vardır.

Ciddi sepsiste kardiyovasküler, respiratuvar, renal, metabolik ve hematolojik işlev bozuklukları tabloya eşlik eder. Kardiyovasküler bulgular miyokard depresyonu, taşikardi ve hipotansiyondur. Hipotansiyon doku hipoperfüzyonunun göstergesidir. Hipotansiyon olmaması muhtemel bir subklinik hipoperfüzyon olasılığını ekarte ettirmez.

Respiratuvar sistem disfonksiyonu ALİ(akut akciğer hasarı)ve/veya ARDS (akut respiratuvar distres sendromu) sonucu akut solunum yetmezliği şeklinde ortaya çıkabilir.

Sepsise bağlı renal disfonksiyon tipik olarak oligürük renal yetmezdir. Tablo tam bir akut böbrek yetmezliği durumuna dönüşebilir.

Santral sinir sistemi disfonksiyonları mental durumu hafiften komaya kadar değiştiren ensefalopati şeklinde ortaya çıkar.

Sepsiste karaciğer disfonksiyonları kolestazis ile ortaya çıkabilir ve inflamatuvar mediyatörlerin neden olduğu safra kanaliküllerinin işlev bozukluğu sonucu hafif hiperbillirubinemi vardır. Transaminazlarda hafif bir yükselme görülebilir; massif yükselme şok karaciğeri (iskemik hepatit) bulgusudur.

Hem hiperglisemi hem de hipoglisemi görülebilir. Endojen katekolaminler insülin salınımını inhibe eder ve hem de glukoneogenez artar; bu da daha önce diabet olmaksızın glisemik kontrolde yetersizlikle sonuçlanır.

Hematolojik bulgular, immünolojik trombosit hasarı ve tüketim koagülopatisidir. Koagülopati tüm ciddi sepsisli hastalarda mevcuttur. Sepsisin tedavisinin ilk 24 saatinde hematolojik işlev bozukluğunun artması çoklu organ yetmezliği ve ölüm riski için belirleyicidir. Dissemine intravasküler koagülasyon gelişmesi yüksek mortaliteye işaret eder.

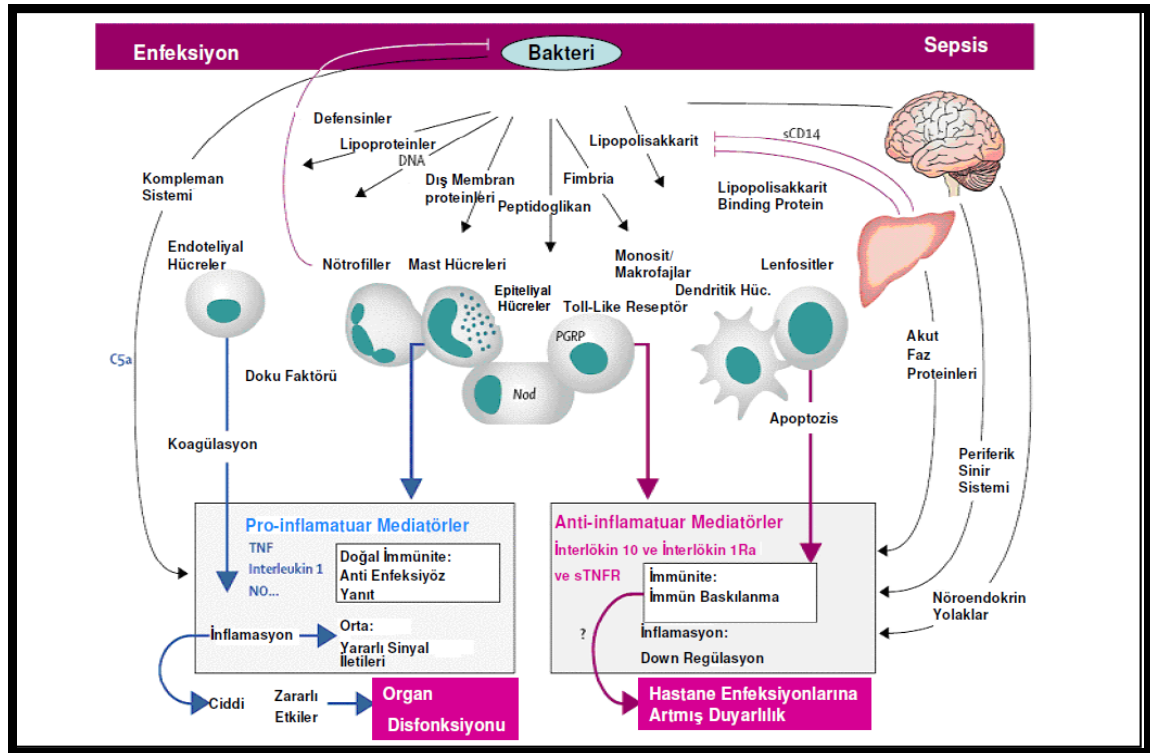
Sepsiste Patogenez

Sepsiste hücrenel ve humoral immün sistem mikroorganizmanın vücuda girmesi ile uyarılır ve pro ve antiinflamatuvar sitokinler salınır. Sitokinlerin yanı sıra, koagülasyon faktörleri, adezyon molekülleri, myokardı baskılayan maddeler ve ısı şok proteinleri de salınır. Bakterilerin toksinlerine karşı gelişen hücrenel immün yanıt, normal koşullarda konağı enfeksiyondan korumasına karşın , hücrenel yanıtın aşırı tepkisi konağın kendisine zarar verebilir. Normalde hücrenel immün yanıtta oluşan sitokinlerin etkilerini baskılayan mediyatörler sepsis sırasında dengeyi sağlayamaz. Ortaya çıkan klinik bulgular bağışıklık sisteminin verdiği inflamatuvar yanıtı bağlı olarak oluşmaktadır. Etken gram negatif bakteri olduğunda, hücre duvarlarındaki lipopolisakkarit (LPS) yapısında olan endotoksin inflamatuvar yanıtı uyarmakta ve tümör nekroz faktör (TNF), interlökin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, platelet aktive edici faktör (PAF) ve interferon gamma gibi sitokinlerin salınımına neden olmaktadır.

Sepsise neden olan mikroorganizma gram pozitif bakteriler, virusler, parazitler veya helmintler olduğunda patogenezi biraz daha farklı olmaktadır. LPS içermeyen bu mikroorganizmalar sitokin üretiminin alternatif yolunu uyarmaktadırlar. Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan ve teikoik asit gibi hücre yapıları kompleman zincirini alternatif yoldan aktive etmektedirler. Kompleman zinciri aktive olduğunda lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonu ile birlikte makrofaj aktivasyonu ve sitokin salınımı gerçekleşmektedir. Bu sitokinler ve nitrik oksit, intrasellüler adezyon molekülleri, prostaglandinler ve lökotrienler septik şok patogenezi ortaya koyarlar (17).

Sepsis ve şiddetli sepsis; immünyüpresyon zemininde gelişmekte ve konağın verdiği abartılı yanıtla erken dönemde septik şok tablosu ile ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, sepsis patogenezi, patojen mikroorganizmalar ve doğal immün sistemin komponentleri arasındaki etkileşimler önemlidir.

Homeostazisin sağlanmasında çok önemli rolü olan inflamatuvar-anti-inflamatuvar, koagulan-antikoagulan, oksidan-antioksidan, apoptotik-antiapoptotik gibi dengelerin bozulması da sepsiste geri dönüşsüz hasarı ve organ yetmezliklerini tetiklemektedir (18).



Şekil 1 : Sepsisin patogenezi

Sepsis Gelişiminde Apoptozis

Apoptozis Tanımı

Apoptoz embriyogenez aşamasında istenmeyen dokuların ortadan kaldırılmasında ve dokunun yeniden şekillendirilmesinde; daha sonraki yıllarda da, yaşam süreci boyunca hasar görmüş, transformasyona uğramış, infektif dokunun ve yaşam süresini doldurmuş sağlıklı dokunun elimine edilmesinde fonksiyon gören programlanmış hücre ölümüdür (19).

Sepsiste, iskemi-reperfüzyon fenomenlerinde, şok gibi global perfüzyon bozukluklarında ve tromboemboli gibi rejyonel perfüzyon bozukluklarında ortaya çıkan inflamatuvar/oksidatif mekanizmalar vital organlarda apoptozise neden olurlar (4).

Apoptozisi tetikleyen inflamatuvar ve oksidatif mekanizmalar içinde sırasıyla;

- a) Bakteri ürünü olan lipopolisakkaritin (LPS) sistemik sirkülasyona salıverilmeleri
- b) TNF- α , IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi
- c) H₂O₂, O₂, OH, NO gibi reaktif oksijen türlerinin üretimlerinin artışı
- d) Isı şok proteinlerinin ekspresyon ve salıverilmelerinin artışı sayılabilir.

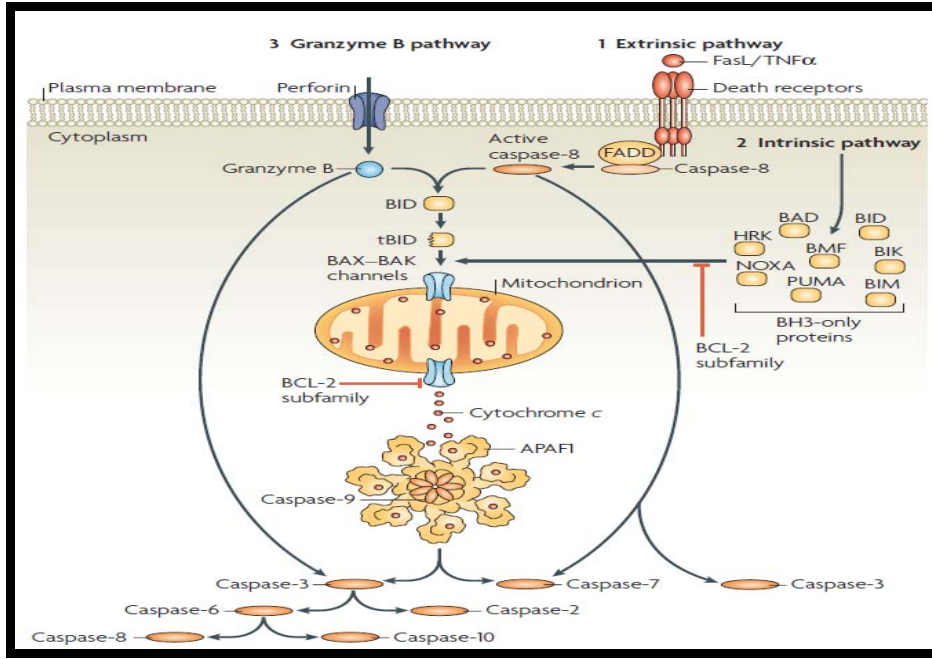
Apoptozis Yolakları

Epiteliyal hücrelerdeki apoptoziste en az üç ana yolak rol oynamaktadır :

1. Ekstresek yolak; hücreye Fas (CD 95) gibi transmembran hücrel ölüm reseptörlerinin ve TNF reseptörlerinin rol aldığı yolak.

2. İntrensek yolak; DNA hasarı, oksidanlar, radyasyon ve intraselüler kalsiyum yükü gibi hasarlayıcı olaylar ile tetiklenebilir. Sitokrom-c gibi proapoptotik faktörlerin mitokondriden sitozole salınmasını içerir ve bcl-2 protein ailesi tarafından regüle edilir.

3. Son yolakta ise sitotoksik T hücreler ve natürel öldürücü hücreler, virüsle enfekte hücrelerin temizlenmesinde önemli role sahip gibi görünen bir apoptotik yolağı uyarmaktadır (7).



Şekil 2: Apoptozis yolları

1. Ekstresek Yolak

Apoptoz, ölüm reseptörleri adı verilen birbiriyle yapısal olarak benzer olan birkaç reseptör tarafından uyarılır. En iyi bilinen örnekleri TNF α ve Fas reseptörleridir. Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8 in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan reseptörlerdir. Kaspazlar, bugüne dek bir düzine farklı türü tanımlanan, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makro moleküllerini parçalayarak tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar. Aktif kaspaz 8, bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin ve kalsiyumun serbestleşmesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu mitokondriyal yolu da aktiflemiş olur (20).

2.İntrensek Yolak

Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondri iç ve dış zarla çevrili yapıdadır. Dış zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), DNAz enzimi, sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotikproteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar (21). Apoptozom, kaspaz 9 u aktifleştirmek üzere keser, kaspaz 9, diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktifleştirerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (22,33).

3.Sitotoksik T hücreler ve natürel öldürücü hücrelerin rol aldığı yolak

Sitotoksik T hücreler ve natürel öldürücü hücreler, virüsle enfekte hücrelerin temizlenmesinde önemli role sahip gibi görünen bir apoptotik yolağı uyarmaktadır. Bu sitotoksik lökositler perforin adı verilen proteinlerle infekte hedef hücre membranında porlar oluştururlar. Bu porlardan hedef hücre içine granzimler olarak bilinen sitozolik granülerproteazlar geçerek apoptotik yolakları aktive ederler (23).

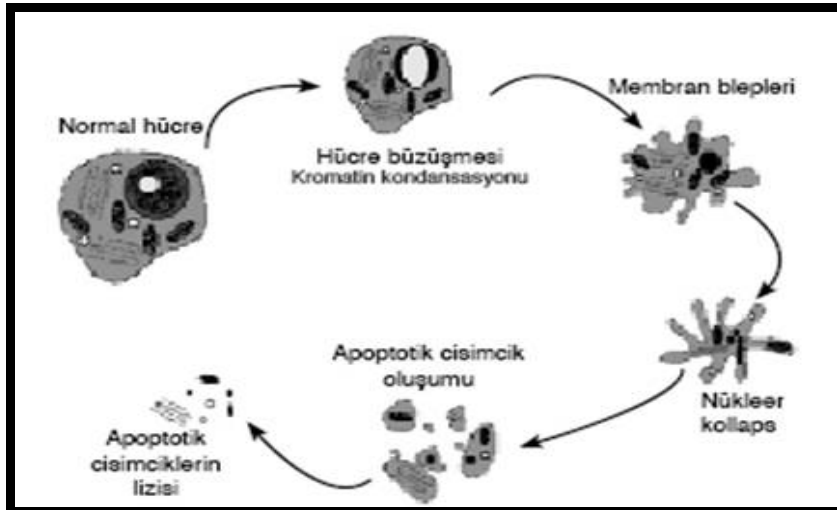
Son çalışmalar da hücrede bir çok paralel apoptotik yolakların varlığı gösterilmiştir.

Endoplazmik retikulum (ER) da, apoptotik süreci başlatabilen organellerden diğeridir. Protein katlanmasında temel bir işlev yapan ER de bu katlama işlevi bozulduğunda, katlanmamış proteinlerin yol açtığı bir stres ortaya çıkar. Bu stresin aşırı olması ya da uzaması, proteaz ve kinazların doğrudan aktivasyonu ve hücre içi kalsiyumun artışıyla mitokondriyal yolu aktive eden bir etki oluşturur.

ER ile mitokondri arasında yer değiştirerek hücre içinde çok düşük bir derişimde tutulan kalsiyum da önemli bir apoptotik düzenleyicidir. Hücre içinde ER depolarında kalsiyum düzeyi düşükse seramid, oksidatif stres gibi apoptotik uyarılar ölüme yol açmaktadır. Çalışmalar ER den salınan kalsiyumun mitokondride düzeyinin arttığını ve bununla mitokondriyal apoptotik yolu uyardığını düşündürmektedir.

P53, sitoplazmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA'da belli genlerin aktivasyonuna (Bax, Apaf-1, Fas), belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-x) yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu hücrede p53 miktarının artmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar.

Yukarıda belirtilen yollarla aktiflenen kaspazlar hücre iskeletinin bileşenleri olan aktin, miyozin, spektrin gibi proteinleri keserek apoptozun ilk döneminde gözlenen morfolojik bulgular olan hücrenin küçülmesi ve yapıştığı ortamdan ayrılması sonucunu verir. Aktin ve miyozinin etkileşimi, hücrenin zarla sarılı tomurcuklar halinde kopuşuna yol açar. Kaspazlar çekirdek laminasını parçalar, endojen DNAz lar ise DNA'yı 200 ya da 200'ün katları baz çiftlik parçalar halinde keser. Bu nedenle apoptotik hücrelerin DNA'sı jel elektroforezinde 200 ve katı olan baz parçaları halinde sıralanır, buna merdiven kalıbı (*ladder pattern*) adı verilir. Transkripsiyon faktörleri gibi proteinler, ribozomlar, RNA, golgi ve endoplazmik retikulum gibi tüm organeller parçalanır. Mitokondri zar potansiyelinin bozulmasının hemen ardından normal hücrede çift tabakalı hücre zarının dış katında bulunmayan bir fosfolipid olan fosfatidilserin dış yaprağa geçer ve oksitlenir. Bu değişim apoptotik hücrelerin makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi için bir sinyal oluşturur. Zarla sarılı apoptotik cisimlerin fagositozuyla apoptotik süreç tamamlanmış olur (24).



Şekil 3: Apoptozisdeki morfolojik değişiklikler

Apoptozis ve Organ Disfonksiyonu

Sepsiste parankimal doku düzeyinde apoptozisin önlenmesi yaşamsaldır. Akciğer, karaciğer, böbrek ve intestinal yapılarda apoptozis artışı ve bu artışın serum TNF- α düzeyleri ile doğru orantısı saptanmıştır (26).

Apoptozisin tetiklendiği dokular içerisinde iki tanesi önceliklidir. Bunlar vasküler endotel ile intestinal kanaldır. SIRS, sepsis, multipl organ disfonksiyonu sendromu (MODS) kaskadında ilk hedef vasküler endotel olmakla birlikte ardından bakteriyel translokasyonla olayı kısır döngüye sokan intestinal yapılar gelmektedir. Cinel ve ark.nın(27) ratlarda LPS ile indüklenen deneysel sepsis modelinde intestinal kanalda histopatolojinin bozulmasıyla bakteriyel translokasyonunun gerçekleştiği, apoptozisin arttığı saptanmış ve nükleer bir enzim olan poly ADP-riboz sentaz (PARS)'ın inhibisyonu bunların önüne geçildiği gösterilmiştir . Buna ek olarak ileumda apoptozisin önlenmesinde PARS inhibisyonunun mekanizma olarak bcl-2 ekspresyonunu artırarak işlev gördüğü de ortaya konmuştur. Antiapoptotik özelliğinin yanı sıra antioksidan özellik de içeren bcl-2'nin ekspresyonunun ileumda artırılması sepsiste ileal apoptozisi önlemiştir (28).

Doku homeostazı, hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü arasındaki uyumlu ilişkiye bağlıdır. Apoptozun önemi, çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilmesini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patolojilerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır. Bu süreçte, kaspaz ailesi üyeleri ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonları önemli yer tutmaktadır.(9)

Apoptozisi Saptama Yöntemleri

Yapılan araştırmalarda; dokularda ve vücut sıvılarında apoptozun saptanması fizyolojik ve patolojik süreçlerin tanı ve takibinde büyük önem taşımaktadır.

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri: Hücredeki çeşitli apoptotik değişiklikleri saptamak amacıyla apoptozisin farklı aşamalarında ışık, fluoresan, lazerli konfokal mikroskop, elektron ve faz kontrast mikroskobu kullanılabilir.

2. Histokimyasal yöntemler

Anneksin V yöntemi: Normal hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfatidil serin, hücre apoptoza giderse hücre zarının dış yüzüne transloke olur ve çeşitli boyalarla işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir.

Bcl-2, bax ve kaspaz immün boyama: Bax ve bcl-2 kaspaz immün reaktivitesinin gösterilmesi amacıyla spesifik bax, bcl-2 ve anti-kaspaz antikorları kullanılarak bu proteinlerin miktarı semi kantitatif olarak değerlendirilir.

TUNEL yöntemi (the terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling): Terminal deoksiribonükleotid transferaz (TdT)'ın DNA kırıklarının 3' ucuna bağlanması ve böylece DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlayan yöntemdir.

ISEL (in situ end-labeling) yöntemi: TUNEL yönteminin modifikasyonu ile oluşturulmuştur. DNA kırıklarının 3 ucu bu kez DNA polimeraz 1 ile işaretlenir

M30 yöntemi: M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokertin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması ilkesine göre belirlenir.

3. Biokimyasal yöntemler

ELISA: ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonu ve M30 düzeyini tespit etmek mümkündür.

Agaroz jel elektroforezi: DNA kırıklarının agaroz jelde yürütülerek oluşturduğu "ladder" merdiven görüntüsü saptanabilir

Fluorometrik yöntem: Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılır.

Real-time PCR: Spesifik mRNA düzeylerinin saptanması için kullanılmaktadır

Western Blotlama: Bu yöntem yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür,

Akış sitometri (flow cytometry): Akış sitometri yardımıyla, işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür.

Henüz çok yeni olan teknolojiler ise DNA "microarray", manyetik rezonans spektroskopisi ve pozitron emisyon tomografi taramasıdır (29) .

Sepsiste Terapötik Seçenekler

Sepsiste temel tedavi

- 1-Uygun antibiyoterapi ve enfeksiyon odağının kontrolü,
- 2- Santral venöz basınç (CVP) 8-12 mmHg olacak şekilde sıvı tedavisi,
- 3-Yeterli sıvı resüstasyonuna rağmen kan basıncı arttırılamayıp organ perfüzyonu sağlanmadığında vazopresörler, introplar ve steroidler
- 4-Ağır sepsis (APACHE II skoru>25) olgularında, kanama riski nedeniyle kontrendikasyon yoksa Aktive protein C (APC)
- 5-Doku perfüzyonunu korumak amacıyla hb < 7 mg/dL olduğunda kan ürünü tedavisi,
- 6-Sepsis kaynaklı ALİ veARDS'de mekanik ventilasyon,
- 7- Renal replasman,
- 8-Derin ven trombozu ve stres ülseri profilaksisidir.

Sepsiste endotelial hücre apoptozisindeki artışın, antioksidanlarla önlenmesi tedavide antioksidanların yerine dikkat çekmektedir. Apoptotik yollarda çeşitli antioksidanlar LPS ile indüklenen sepsis modellerinde denenmişler ve hidroksil radikal süpürücülerinden dimetil-sülfoksitin LPS öncesi inkübasyonunda endotel hücrelerinde apoptozisi önlediği saptanmıştır. Buna paralel olarak, antioksidan özellik içeren L-arginin gibi NO (nitrik oksit) donörlerinin endotel hücre apoptozisini baskıladığı hücre membranı “anneksin V” ile immunhistokimyasal olarak boyanarak da gösterilmiştir (28).

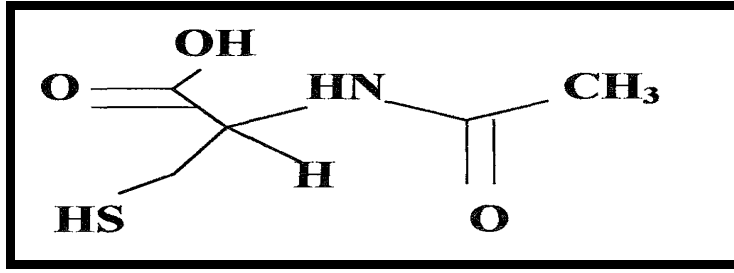
Septik hastalarda antiapoptotik sağaltım şu an mevcut olmasa da bu konudaki klinik yaklaşımlar dikkate alınmalıdır. Hem lenfoproliferatif hastalıklarda hem de akut inflamasyonda T ve B hücre ölümüyle ilişkili pro ve antiapoptotik yollar hızla açıklığa kavuşturulmaktadır. Lenfosit apoptozisinin indüklenmesinde kritik terapötik hedefler özellikle kaspas-8 kaspas-3 ve PARP tır. Alternatif olarak bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin stimülasyonu ya da Bid ve Bax gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonunun inhibisyonu terapötik hedefler olabilir (30).

Apoptoza müdahale edilerek geliştirilen tedavi örnekleri aşağıda verilmiştir.

Mevcut tedaviler	
Aspirin, NSAİİ	Kolorektal adenoma ve kansere karşı koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. Bu etki, sikloksijenaz-2 enziminin inhibisyonu doğrultusunda apoptozun indüklenebilmesinden dolayı olabilir.
Kanser ilaçları, radyoterapi	Bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi apoptozu indükler. p53 e bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tanımlanmıştır.
Yeni tedaviler	
Bcl-2 <i>antisense</i>	İlk klinik çalışmalar, <i>non-Hodgkin's lenfoma</i> gibi bazı hastalıkların olumlu sonuç verdiğini göstermiştir.
Rekombinant TRAIL	Akciğer, kolon ve böbrek kanserlerinin TRAIL' e karşı duyarlı olduğu ve apoptozu uyardığı prelinik çalışmalarla kanıtlanmıştır.
Kaspaz inhibitörleri	Travmatik beyin yaralanması, amiyotrofik lateral skleroz ve parkinson hastalığında pozitif prelinik hayvan modellerinde gösterilmiştir.
Antioksidanlar	E vitamini floroaçil artışıyla kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu indükler.
IL-1 reseptör antagonistleri	Sıçan modellerinde iskemik beyin hasarında azalma tespit edilmiştir.

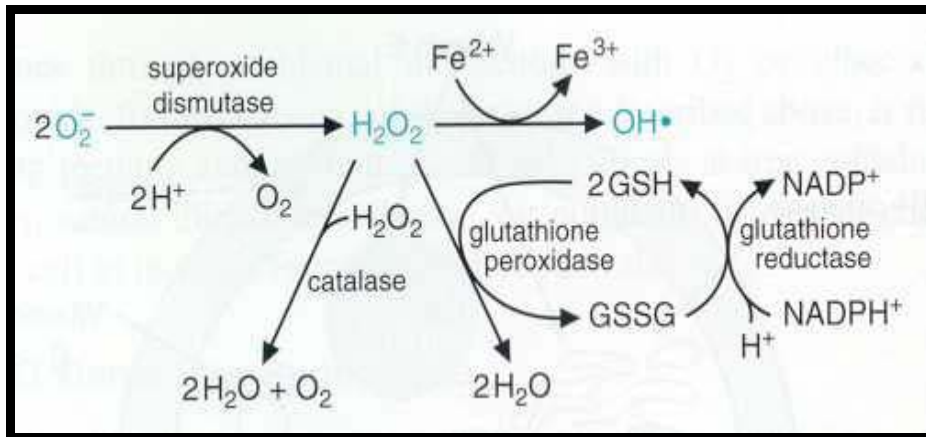
Tablo 2: Mevcut ve yeni tedavi örnekleri (30)

N-Asetil Sistein



Şekil 4: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı

N-asetil sistein, L-sistein aminoasidinin N asetil türevidir. İlk olarak 1960'larda mukolitik bir ajan olarak tanımlanmıştır. NAS'ın biyolojik aktivitesi sülfidril grubundan kaynaklanmaktadır. Amino grubuna bağlı asetil, oksidasyona karşı bu molekülün daha stabil olmasını sağlar. NAS glutatyon sentezini, glutatyon-S-transferaz aktivitesini ve detoksifikasyonunu artırır (33). Glutatyon, organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır. NAS sadece bir glutatyon prekürsörü değildir, SOR'ları direk temizleme kabiliyetine de sahiptir. İndirgenmiş glutatyon depolarını tekrar doldurarak hücrelerin antioksidan potansiyelini de yeniler. İndirgenmiş glutatyon (GSH) okside hale dönüşürken hidrojen peroksiti suya çevirerek anti oksidan etki gösterir. Ancak SOR miktarının artması durumunda GSH yetersiz kalır. Oluşan fazla miktardaki okside glutatyon (GSSH) da hücre hasarından sorumludur.



Şekil 5: GSH'nin antioksidan etkisi

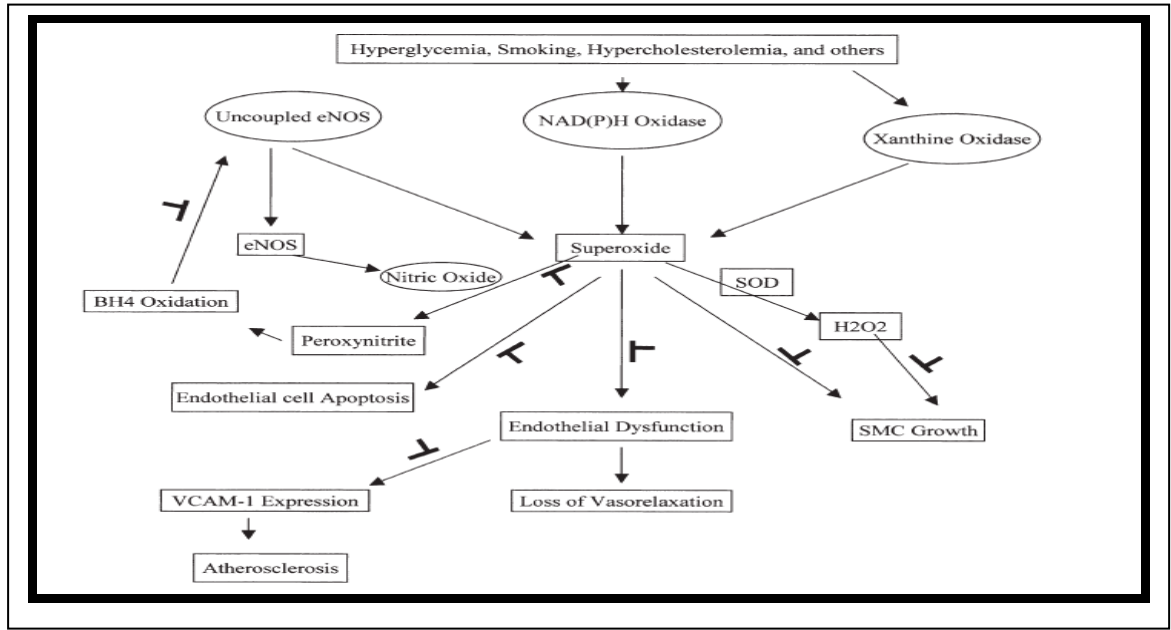
NAS sahip olduğu sülfidril grubu ile mukus glukoproteini içerisindeki disülfid bağlarını koparma yeteneği sayesinde mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki gösterir. N-asetil sisteinin kullanıldığı değişik hastalıklar arasında kanser, kardiovasküler hastalıklar, metal toksisitesi ve karaciğerin parasetamol toksisitesi sayılabilir.

Uygulama sonrası 30- 60 dakika içinde doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır ve % 50 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Plazma yarı ömrü 6 saat kadardır. Karaciğerde deasetillenir, sülfat ve taurin olarak idrar ve karaciğer yolu ile vücuttan atılır. NAS'ın mukolitik, antioksidan, antiinflamatuvar, hücre koruyucu etkilerinin yanı sıra vasküler kan akımını artırdığı, lipoprotein a düzeyini azalttığı gösterilmiştir (12).

NAS apoptozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitesini düzenleyerek hücre surveyini uzatmaktadır(33).

NAS asetaminofen ve alkol toksisitesinde ilk sekiz saat içinde verildiği takdirde karaciğeri hasardan korumakta ve mortaliteyi azaltmaktadır. Antitoksitesindeki muhtemel mekanizmalar karaciğer kan akımını artırması, glutasyon artışı ve serbest radikalleri temizlemesi sayılabilir. NAS sıçanlarda toksik kadmiyum ile birlikte verildiğinde de lipid peroksidasyonunu önleyerek karaciğer toksisitesini azaltmaktadır . Kokaine ile gelişen karaciğer hasarı ve karaciğer transplantasyonunda reperfüzyon ile gelişen oksidan hasar da NAS ile anlamlı derecede azaltılabilmektedir. Mevcut bilinen etkinlikleriyle NAS, karaciğerde oksidatif strese karşı tedavi edici etki ile transplantasyon hasarı, alkolizm, metal toksisitesi ve fibrozda tedavi rolü oynayabilir (34).

Ortolani ve ark.nın (10) yaptığı çalışmada 30 erken septik şok hastasında NAS lipidperoksidatif hasara etkisi araştırılmıştır. Tedavinin 3.ve 5. günlerinde lipidperoksidatif hasarın göstergesi olarak malondialdehit (MDA), eritrosit deformasyonu ve kompleman aktivasyonu düzeylerine bakılmıştır. SOR süpürücüsü olan NAS'ın yüksek doz IV infüzyonunun lipid peroksidatif hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.



Şekil 6: NAS'm endotelial apoptozisi ve aterosikloz gelişimini önlediği basamaklar

GEREC VE YÖNTEMLER

Çalışma DEÜTF Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulundan izin alındıktan sonra Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarının olanakları kullanılarak yapıldı.

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gr olan 21 adet Wistar Albino tipi erişkin erkek rat kullanıldı. Hayvanlar DEÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi ve çalışma süresince burada bakıldı. Hayvanlar oda ısısında 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda tel kafeslerde yaşatıldı. Tüm hayvanlar standart rat yemi ve su ile beslendi ve cerrahiden 12 saat önce sadece su verildi.

Denekler İP (intraperitoneal) olarak 50 mg/kg ketamin (Ketalar® Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg xylazine (Alfazyne®, %2, Alfasan International, 3440AB, Woerden, Holland) İP olarak uygulanarak anestezize edildi. Çalışma süresince, gerektiğinde deneklerin hareketsizliğini sağlamak için aynı anestezi doz tekrarlandı .

Ratlar randomize olarak üç gruba ayrıldı.

Grup 1: *Sham* grubu (n=7) sadece laparotomi yapıldı

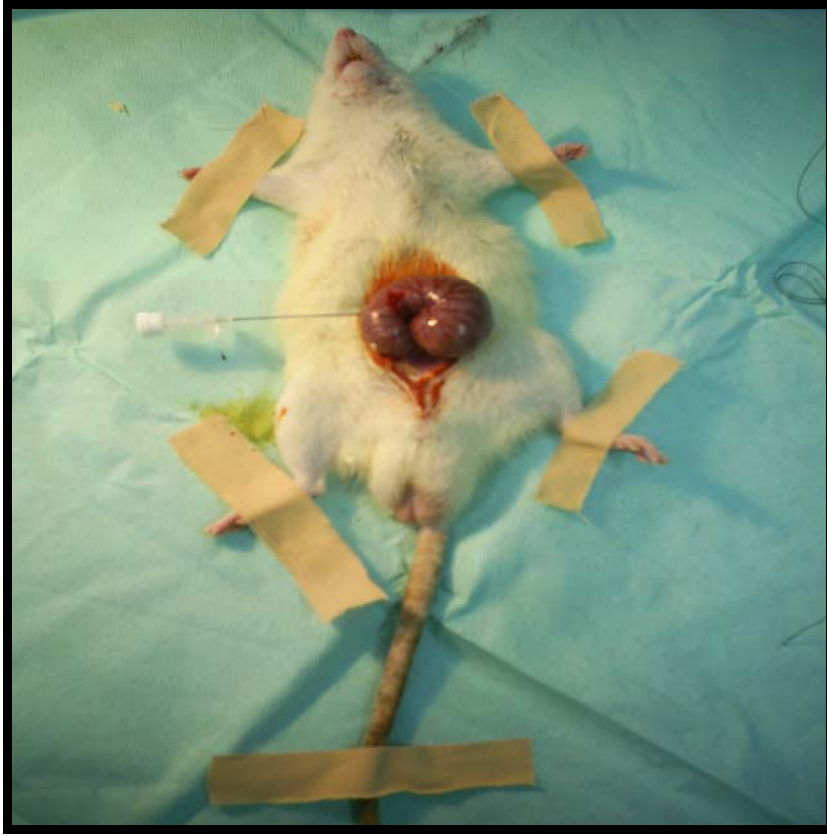
Grup 2: Sepsis grubu (n=7) ÇLP cerrahisi uygulandı

Grup 3: NAS grubu (n=7) ÇLP cerrahisi uygulandı ve 150 mg/kg/gün IP NAS (Asist ®, Hüsnu Arsan İlaçları A.Ş., Türkiye) verildi. Asist ®;100 mg/ml Asetil sistein içermektedir.

Çekal Ligasyon Perforasyon (ÇLP) Modeli

İntarabdominal enfeksiyon çalışmalarında kullanılan tüm hayvan türleri için ÇLP basit, kliniğe uyarlanabilir ve en sık kullanılan modeldir.

Deneklere cerrahi alanın sterilizasyonu yapıldıktan sonra genel anestezi altında orta hattan laparotomi yapıldı. Çekum izole edildikten sonra terminal ileumun hemen distalinden 3/0 ipek ile bağlandı. Çekum 18 gauge venöz kanül (Bıçakçılar, İstanbul, Türkiye) ile tek noktadan perfore edildikten sonra hafifçe sıvazlanarak intraperitoneal gayta kontaminasyonu sağlandı. Resüsitasyon amacı ile karın içine 3 ml serum fizyolojik verilerek karın duvarı iki tabaka halinde kapatıldı (13).



Resim 1: ÇLP cerrahisi

Deney Protokolü

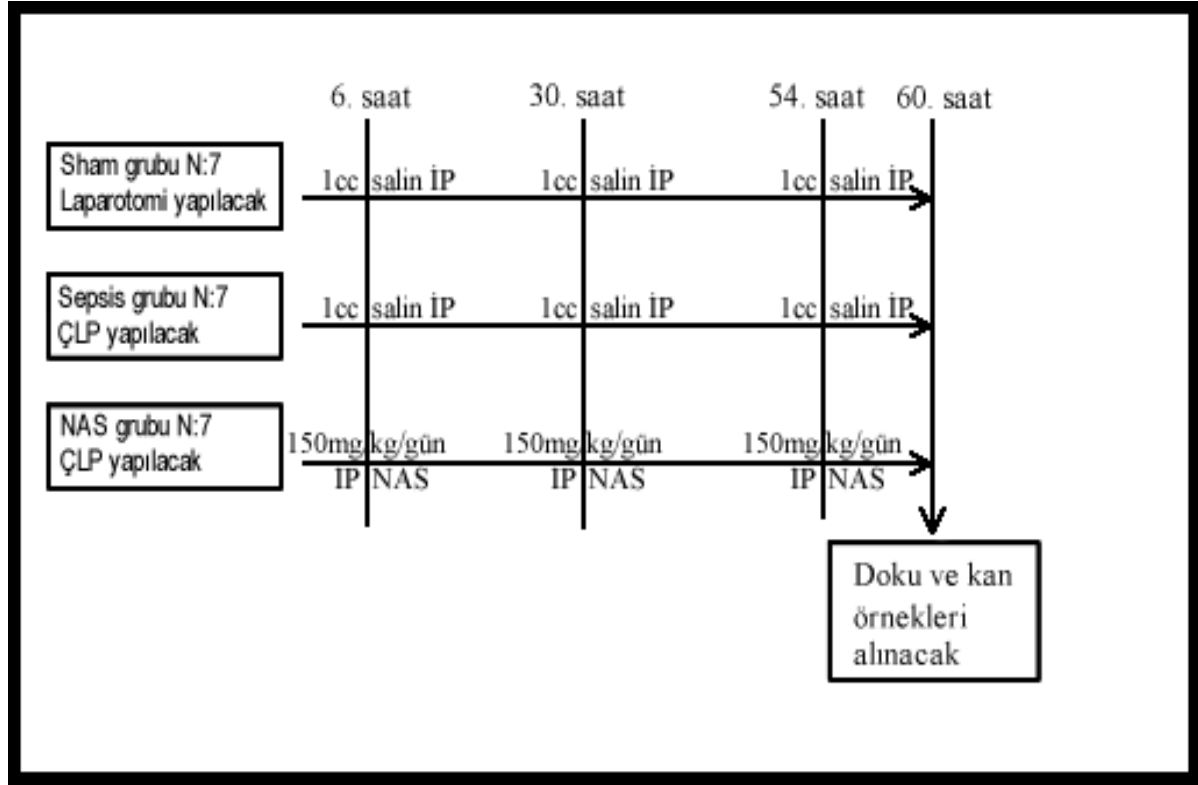
Grup 1'e (*sham* grubu) laparotomiden 6 saat sonra başlayıp 24 saatte tek doz olacak şekilde 3 defa 1 mL/rat salin IP verildi .

Grup 2'ye (sepsis grubu) ÇLP dan 6 saat sonra başlayıp 24 saatte tek doz olacak şekilde 3 defa 1 mL/rat salin IP verildi .

Grup 3'e (NAS grubu) ÇLP dan 6 saat sonra başlayıp 24 saatte tek doz olacak şekilde 3 defa 150 mg/kg/gün NAS 1 mL saline tamamlanarak (0,2-0,25mL NAS+ 0,8-0,75m L salin) IP olarak verildi.

Çalışma boyunca ratların normotermik (37°C) olması için, çalışma ortamının sıcaklığı ısıtıcı bir lamba ile sağlandı.

Denekler cerrahi işlemden sonraki 60. saatte anestezi altında orta hattan laparotomi uygulandı. Sağ böbrek MDA düzeyi ölçümü için sıvı nitrojende dondurularak -80° C de saklandı, sol böbrek ise histopatolojik değerlendirme için %10'luk tamponlu formaldehid içinde fiske edildi. Deney sonunda tüm ratlar yüksek doz anestezik madde uygulanarak kurban edildi.



Şekil 7: Deney protokolünün şematik gösterimi

Biyokimyasal İnceleme

MDA ölçümü

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından doku hasarına yol açan moleküler süreçlerden biridir ve diğer oksidatif süreçlerle birlikte pek çok patolojik olaylardan sorumlu tutulmaktadır. Lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi, kimyasal ürünler olarak, konjuge dienler, etan, pentan, hidroperoksid ve malondialdehid gibi ürünlerin ölçülmesi ile, yöntem olarak ise spektrofotometri, spektrofotometri, gaz kromatografisi ve yüksek verimli sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilebilir (35). MDA düzeyi, alınan dokunun tiyobarbiturik asid (TBA) ile reaksiyona girmesi sağlandıktan sonra HPLC cihazında ex 532/em 553 nm’de spektrofotometrik olarak $\mu\text{mol}/\text{gr}$ birimiyle değerlendirildi.

Histomorfolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler deney grupları açısından kör bir histolog tarafından yapıldı.

Histomorfolojik İncelemeler

Histomorfolojik inceleme için ratlardan elde edilen böbrek dokusu %10'luk tamponlu formaldehid solüsyonunda 48 saat fikse edildikten sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon için sırasıyla %70, %80 ve %96'luk etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 3 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutulduktan sonra 1'er saatlik 2 kez parafin ile immersiyonu sağlandı. Daha sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 3µm'lik (Feather S35) parafin kesitler alındı.

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk. 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk. (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi, kesitler distle su ile çalkalandıktan sonra 10 dk. Hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dk akarsuda yıkanan kesitler, 2 dk. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Boyama işleminden sonra elde edilen kesitler ışık mikroskopik olarak incelendi (Olympus BX-50 Tokyo, Japonya) ve kesitlerden elde edilen görüntüler yüksek çözünürlüklü bir kamera (Olympus DP-70, Japonya) içeren bilgisayara aktararak digital olarak fotoğrafları çekildi. Çekilen digital fotoğraflar digital görüntü analiz programı (UTSCSA; Image tool version 3,0) ile değerlendirildi. Böbrek dokusu örnekleri ışık mikroskopunda proksimal tubuluslardaki yapısal değişiklikler, tübüler atrofi, tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu, vakuolizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrevasyonu, renal korpüskül morfolojisindeki değişiklikler ve intertisyel alandaki değişiklikler incelenerek değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler semikantitatif olarak 0, +, ++, +++, +++++ şeklinde hasarlanma oranına göre skorlandı.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Böbrek dokusu %10'luk tamponlu formaldehitte fiske edildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinin ardından parafine gömülen böbrek dokusundan mikrotom yardımıyla 3 µm kalınlığında kesitler poly-l-lizinle kaplı lamlara alındı. Örnekler 12 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra, kaspaz-3 immünreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik anti-kaspaz-3 monoklonal antikoru (RB-10287-R7, Labvision) kullanılmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesi, hidrojen peroksidazın alkol içindeki %3'lük çözeltisi kullanılarak engellendi. Lizinli kesitler anti-kaspaz-3 antikoru ile bir gece + 4° C'de bekletildikten sonra biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika enkübe edildi. Sekonder antikor Vector Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi 0.02 %'lik 3,3' diaminobenzidine (DAB) solüsyonu kullanılarak görünür hale getirildi. Mayer's hematoksilen ile zemin boyaması yapıldıktan sonra kesitlerde görüntü analizleri yapıldıdır.

Uygun doku kesitleri primer ve sekonder antikor için ayrıca pozitif ve negatif kontrol olarak aynı işlemde geçirildi. İmmünohistokimyasal skorlama için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen on alan rastgele yöntemle seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 1'den 4'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi

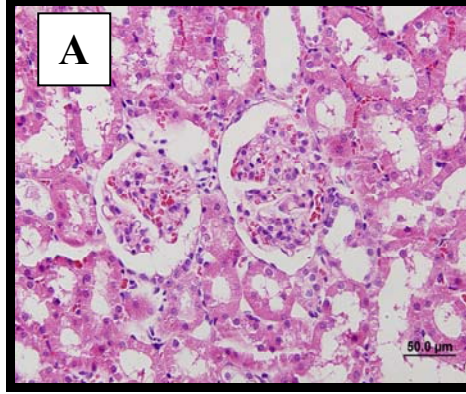
İstatistiksel Değerlendirme

Statistical Package of Social Sciences 15 (SPSS 15.0, Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Verilerin analizinde *Kruskal-Wallis* varyans analizi, ikili grup karşılaştırılmasında ise *Mann-Witney U* testleri kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

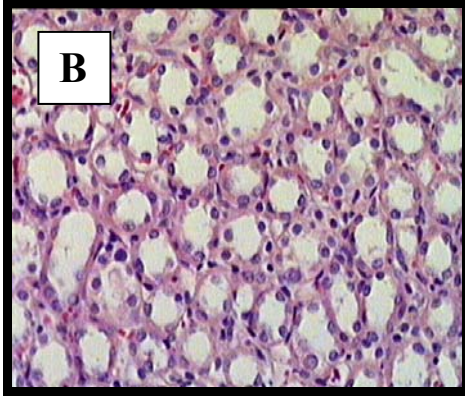
BULGULAR

Her grupta 7 rat çalışmaya alındı. Ratlardan elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi. Sonuçlar medyan (minimum, maksimum) olarak verildi.

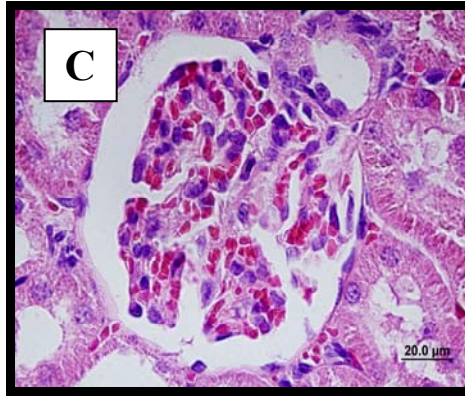
SHAM GRUBU (H-E Boyama)



X 40 lük büyütme



X 100 lük büyütme

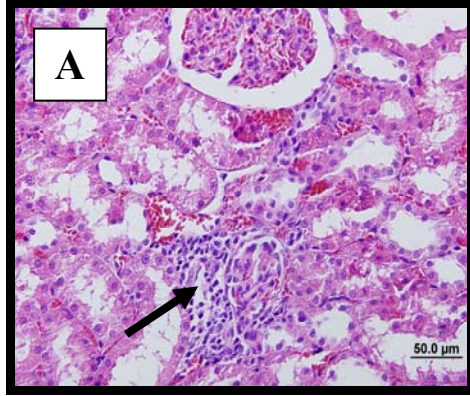


X 100 lük büyütme

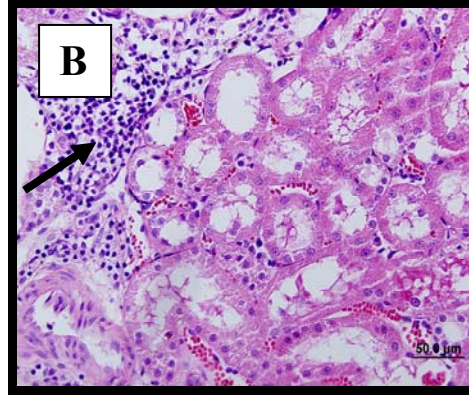
Resim 2 : Böbrek dokusu *sham* grubuna ait H&E ile boyanmış korteks ve medullaya ait kesit görüntüleri

Böbrek dokusunun boyanmış kesitlerinin incelenmesi ile gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir. *Sham* grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde, böbrek dokusuna ait korteks ve medulla ayrımının rahatlıkla yapılabildiği, korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak yer aldığı gözlemlendi. Korteksteki renal korpusküllerin normal yapıda olduğu, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Proksimal tübül ve distal tübül, henle kulbu, kolektör tübüllerde yapıların normal olduğu gözlemlendi. Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı. *Sham* grubunda normal morfolojik özellikler gözlemlendi. *Sham* grubuna ait kesitlerde herhangi bir hücre infiltrasyonu ve fırçamsı kenar kaybı gözlenmemiştir (Resim2).

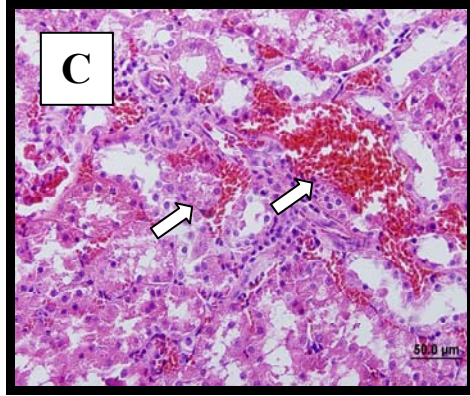
SEPSİS GRUBU (H-E Boyama)



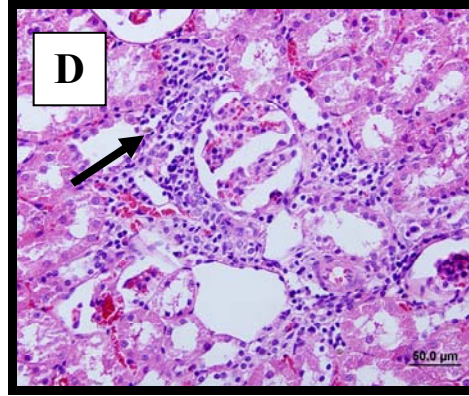
X 40 lık büyütme



X 40 lık büyütme



X 40 lık büyütme

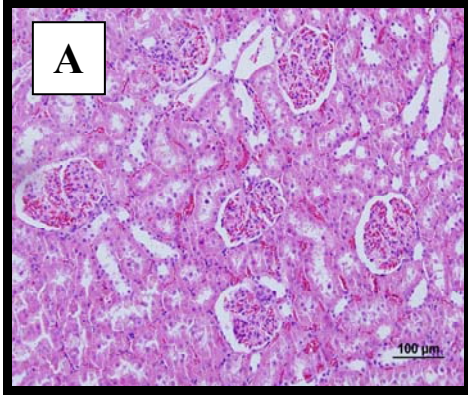


X 40 lık büyütme

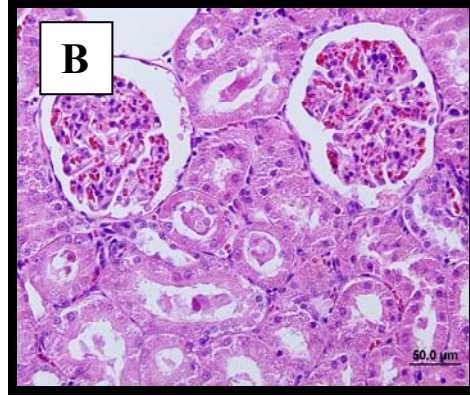
Resim 3: Böbrek dokusu sepsis grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri. (→) Mononükleer hücre infiltrasyonu ve (⇨) eritrosit ekstravazasyonunu göstermektedir.

Sepsis grubunda ise kortikal bölgede özellikle yoğun olmak üzere peritü-büler alanda mononükleer hücre infiltrasyonu, proksimal tübül hücrelerinde fırçası kenar kaybı, kortekste damarlarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstravazasyonu dikkati çektir. Bazı alanlarda proksimal tubulusta nadir tübül atrofisi, tübül dilatasyonu, vakuolizasyon gözlemlendi (Resim 3).

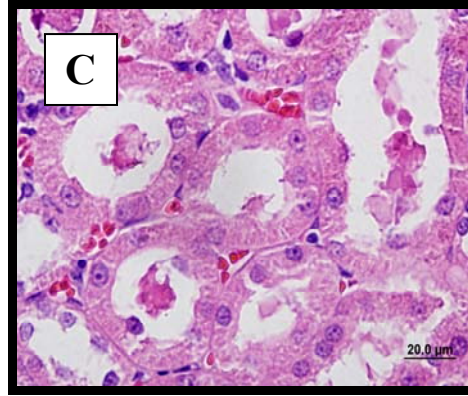
NAS GRUBU (H-E Boyama)



X 20 lik büyütme



X 40 lik büyütme

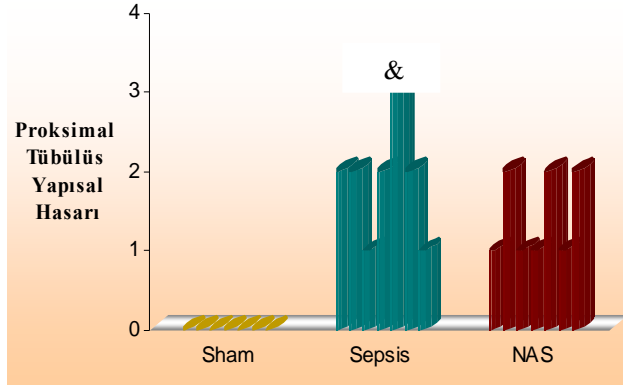


X 100 lük büyütme

Resim 4: Böbrek dokusu NAS grubuna ait H&E ile boyanmış kesit görüntüleri

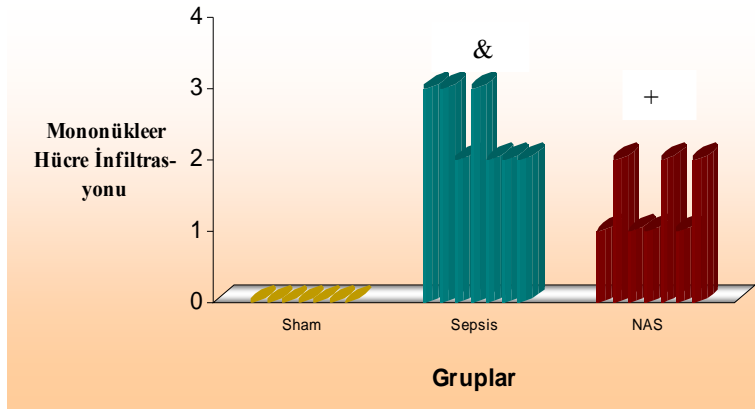
NAS grubunda ise sepsis grubuna göre kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda mononükleer hücre infiltrasyonunda azalma, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybında daha az oranda azalma, kortekste az oranda eritrosit ekstravazasyonu dikkati çekti. Kontrol grubunda bazı alanlarda proksimal tubuluslarda gözlenen tübüler atrofi, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon ise gözlenmedi (Resim 4).

Sham 00 (00-00), sepsis 2,00 (1,00 – 3,00) ve NAS grubunun 1,00 (1,00 – 2,00) proksimal tubuluslardaki yapısal değişiklik skorları karşılaştırıldığında, sepsis grubunda *sham* grubuna göre anlamlı bir artış saptanırken ($p=0,001$) NAS grubundaki azalma sepsis grubuna göre anlamlı değildir ($p=0,225$).



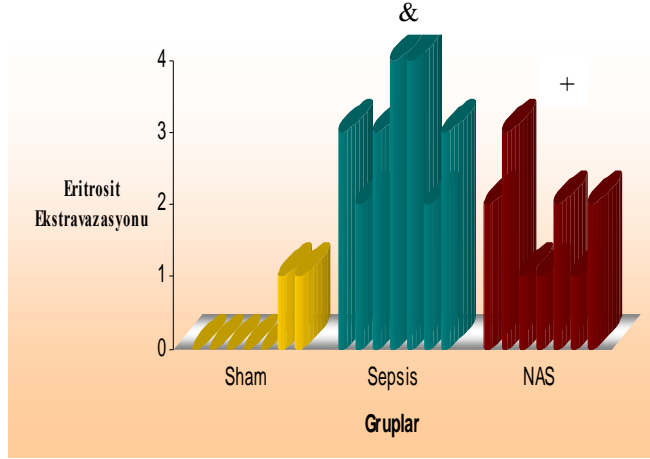
Grafik 1: Grupların proksimal tubuluslardaki yapısal değişiklikleri & Sham ile sepsis grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

Sham 00 (00-00), sepsis 2,00 (2,00 – 3,00) ve NAS grubundaki 1,00 (1,00 – 2,00) mononükleer hücre infiltrasyonu skorları karşılaştırıldığında, *sham* grubuna göre sepsis grubundaki artış anlamlı bulundu ($p=0,001$). Sepsis grubuna göre NAS grubundaki azalma anlamlı bulundu ($p=0,010$).



**Grafik 2: Grupların mononükleer hücre infiltrasyonu & Sham ile sepsis grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$
+ Sepsis ile NAS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$**

Sham 00 (00-00), sepsis 3,00 (2,00 – 4,00) ve NAS grubundaki 2,00 (1,00 – 3,00) eritrosit ekstravazasyonu skorları karşılaştırıldığında, *sham* grubuna göre sepsis grubundaki artış anlamlı bulundu($p=0,001$). Sepsis grubuna göre NAS grubundaki azalma anlamlı bulundu($p=0,01$).

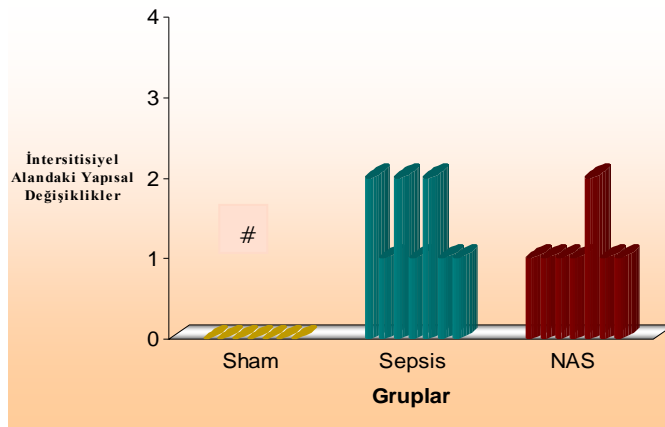


Grafik 3: Grupların eritrosit ekstravazasyonu

& *Sham* ile sepsis grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

+ Sepsis ile NAS grubu karşılaştırıldığında $p < 0,05$

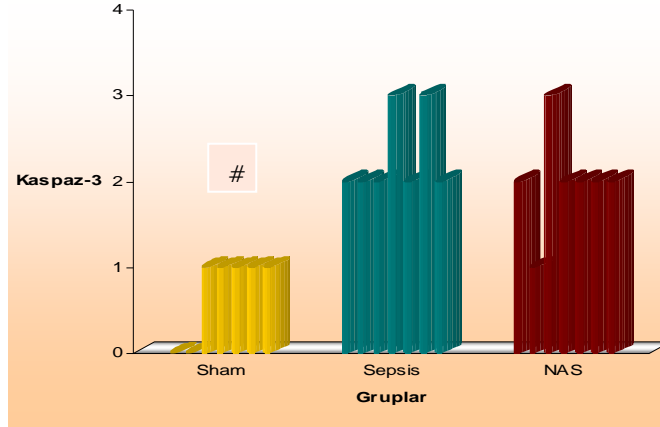
Sham 00 (00-00), sepsis 1,00 (1,00 – 2,00) ve NAS grubuları 1,00 (1,00 – 2,00) intertisyel alandaki yapısal değişiklik skorları bakımından karşılaştırıldığında *sham* grubuna göre sepsis grubundaki artış ($p=0,001$) ve NAS grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p=0,000$)



Grafik 4: Grupların intertisyel alandaki yapısal değişiklikleri

Sham ile diğer gruplar karşılaştırıldığında $p < 0,05$

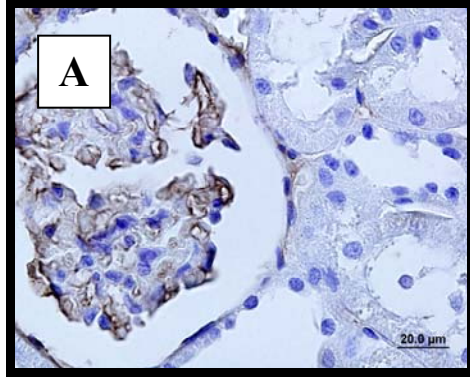
Sham 1,00 (00 – 1,00), sepsis 2,00 (2,00 – 3,00) ve NAS grupları 2,00 (1,00 – 3,00) kaspaz 3 immünreaktivitesi bakımından karşılaştırıldığında *sham* grubuna göre sepsis grubundaki ($p=0,001$) ve NAS grubundaki artma anlamlı bulundu ($p=0,003$).



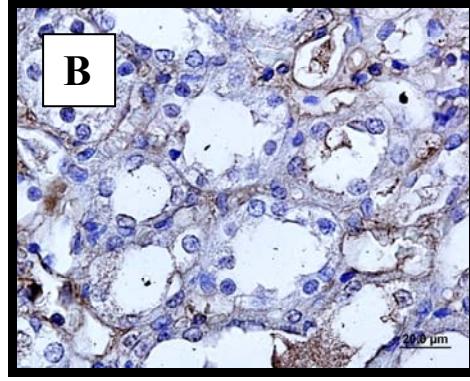
Grafik 5: Grupların kaspaz 3 immünreaktivitesi

Sham ile diğer gruplar karşılaştırıldığında $p < 0,05$

SHAM GRUBU (İmmunhistokimyasal Boyama)



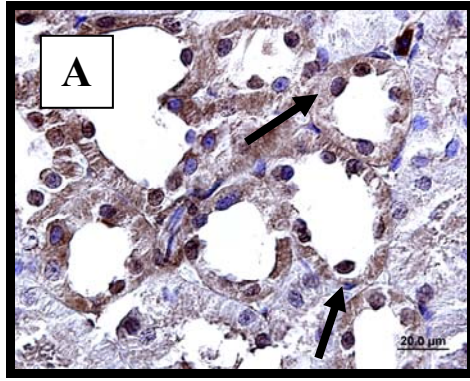
X 100 lük büyütme



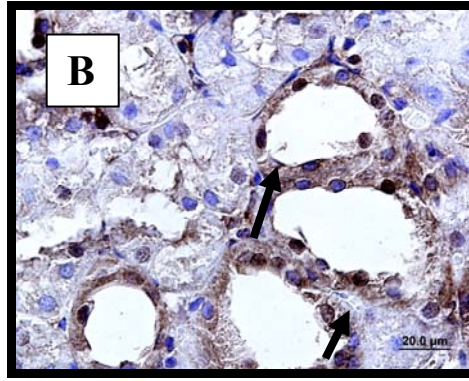
X 100 lük büyütme

Resim 5: *Sham* grubuna ait kaspaz-3 immunhistokimyasal boyamaya ait kesit görüntüleri

SEPSİS GRUBU (İmmunhistokimyasal Boyama)



X 100 lük büyütme

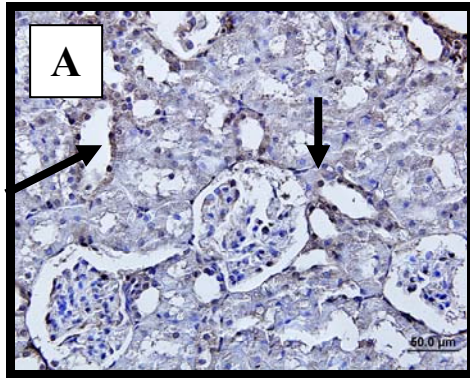


X 100 lük büyütme

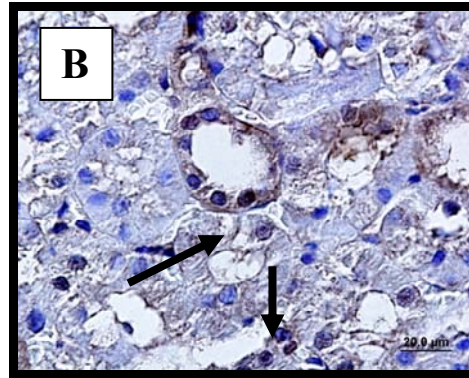
Resim 6: Sepsis grubuna ait kaspaz-3 immunhistokimyasal boyamaya ait kesit görüntüleri.

(➡) kaspaz-3 immunpozitif hücreler.

NAS GRUBU (İmmunohistokimyasal Boyama)



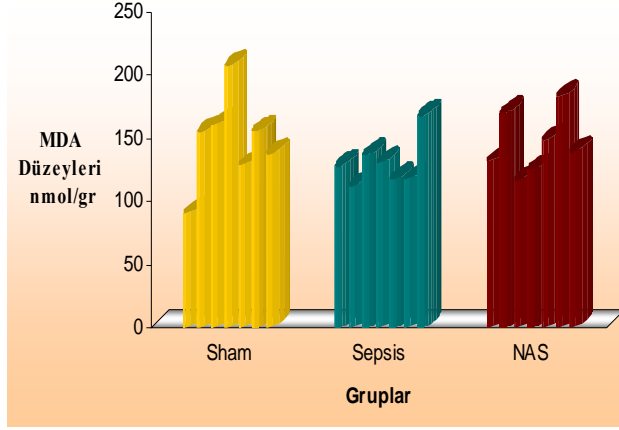
X 40 lük büyütme



X 100 lük büyütme

Resim 7: Böbrek dokusu NAS grubuna ait kaspaz-3 immunhistokimyasal boyamaya ait kesit görüntüleri. (➡) kaspaz-3 immunpozitif hücreler.

Sham 154,490 (90,38 - 207,05), sepsis 127,560 (111,54 - 167,31) ve NAS 139,100 (116,67 - 182,69) grupları MDA düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).



Grafik 6: Grupların malondialdehid (MDA) düzeyleri

TARTIŞMA

Sepsis her geçen gün patogenezi, fizyopatolojisi, tanı ve sağıltım yöntemlerindeki gelişmelere karşın bugün hala önemini koruyan ölümcül bir süreçtir (36). Kontrolde n çıkmış proinflatuar mekanizmalar ve regölasyonu bozulmuş antiinflatuar mekanizmalar arasındaki dengesizlik söz konusudur. Endotelial hasar ile sonuçlanan immunpatojenik olaylar serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasına neden olur ve proinflatuar yöndeki abartılı sistemik yanıt sonucunda organ yetmezliğı gelişir. Deneysel ve klinik olarak sepsisin yol açtığı uzak organ hasarlarını azaltmaya yönelik araştırmalar sürmektedir.

Çalışmamızda deneysel sepsis modellerinden biri olan ÇLP modeli kullanılmıştır. ÇLP modeli sepsis ile ilgili çalışmalarda uzun zamandır kullanılmaktadır. İntraabdominal enfeksiyon çalışmalarında kullanılan tüm hayvan türleri için ÇLP basit ve kliniğe uygulanabilir bir modeldir (13,37,38).

Messaris ve ark. nın (37) yaptığı bir çalışmada ÇLP ile oluşturulan deneysel sepsis modelinde renal tübüler hücredeki apoptozis araştırılmıştır. ÇLP sonrası 6. saatte apoptotik hücre oranı yüksekken daha sonraki saatlerde bu değer azalmış ve 60. saatte tekrar pik yapmıştır. Bu çalışmaya dayanarak, çalışmamızda apoptozisi tespit edebilmek için 60. saatte renal doku örneklerini aldık.

Gürer ve ark.nın(38) yaptığı bir çalışmada kırkbeş ratda %30'luk oranda haşlanma yanığı oluşturulduktan 72 saat sonra ÇLP ile peritonit oluşturulmuştur. 6 gün boyunca 150 mg/kg/gün dozunda NAS tedavisi uygulanmıştır. Sonuçta NAS iki darbeli travma modelinde doku oksidatif stres düzeyini ve AC deki doku hasarını hafifletirken KC deki doku hasarına etkin bulunmamıştır. Özdülger ve ark.nın(13) yaptıkları bir çalışmada ise ÇLP yapılan deney hayvanlarında 7 günlük 150 mg/kg/gün dozunda NAS tedavisinin AC dokusunda lipid peroksidasyonu azalttığı AC doku MDA düzeyindeki düşme ile hücre hasarı azalttığı kaspaz 3 pozitif hücre oranındaki azalma ile gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda böbrek dokusunda kaspaz 3 pozitif boyanan hücre sayısı ve MDA düzeyleri ve 3 gün boyunca 150 mg/kg/gün dozunda NAS tedavisi uygulandıktan sonra değerlendirildi. Bizim çalışmamızda MDA düzeyleri açısından gruplar arasında fark saptanmadı, bunun nedeni bizim çalışmamızdaki NAS tedavisi süresinin bu çalışmaya göre kısa olmasına (7 güne karşın 3 gün) veya AC ve böbrek dokularının tedaviye yanıtının farklı olmasına bağlı olabilir. Tavşanlarda yapılan bir

çalışmada 10 mg/kg/gün dozunda verilen NAS tedavisinin 12. saatinde MDA düzeyi *sham* grubuna göre serumda düşük bulunurken KC dokusunda yüksek bulunmuştur. Bu durum, lipid peroksidatif hasarın göstergesi olan MDA düzeyinin dokulardaki düzeyinin düşmesi için yeterli süre geçmediği ile açıklanmaktadır (39).

Birçok çalışmada; ağır sepsis ve septik şokun ilk saatinde uygulanan NAS tedavisinin oksidatif stresi azalttığı, doku oksijenasyonunu iyileştirdiği, hepatik ve solunumsal fonksiyonları geliştirdiği, sellüler glutatyon depolarını doldurduğu, anlamlı derecede antioksidan olduğu gözlenmiştir(10,40). NAS nitrik oksit (NO) ve cGMP sentezini artırır. Bir çok çalışmada NAS'ın sol ventrikül *stroke* volüm indeksini üç mekanizma ile artırdığı gösterilmiştir: kardiyomiyosit kontraktilesini artırarak, *afterload* ve TNF- α gibi kardiyak depresif faktörleri azaltarak(41). Molnar ve ark.nın(42) yaptığı çalışmada ise organ fonksiyon bozukluğu gelişen yoğun bakım hastalarında gecikmiş NAS uygulaması sonucunda sağkalım negatif yönde etkilenmiş, NAS uygulanan gruptaki 58 septik şoklu hastalarda ilk 24 saatte kardiyovasküler performansda azalma ve inotrop destek ihtiyacında artış saptanmıştır. Spapen ve ark. (43) ağır sepsis hastalarında NAS'ın mikroalbuminüri ve organ fonksiyonları üzerine etkilerini değerlendirmiş ancak kontrol grubuna göre giriş APACHE II ve SOFA skoru takiplerinde anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Akıncı ve ark.nın(44) NAS tedavisinin çoklu organ yetmezliğindeki etkinliğini araştıran bir çalışmada, çoklu organ yetmezliği ölçütü olarak toplam maksimum SOFA ve delta SOFA skorları ve beraberinde mekanik ventilasyon, yoğun bakım kalış süreleri ve mortalite oranları değerlendirilmiştir. Bu ölçümlerle, 40 mg /kg/gün dozda yoğun bakıma kabulün en erken döneminde uygulanan NAS tedavisinin çoklu organ yetmezliği gelişimini engellemediği ve mekanik ventilasyon, yoğun bakım yatış süreleri ve mortaliteyi azaltmadığı bulunmuştur.

Ratlarda endotoksin verilmesiyle oluşturulan sepsis modelinde alveolar ve interstisyel hemoraji, ödem ve lökosit infiltrasyonu gözlenirken; 275mg/kg/gün NAS'ın 48 saat süreyle IV infüzyonu verilen gruplarda AC de histopatolojik bulguların gerilediği, bu dozda mortalitenin azaldığı ancak 550mg/kg/gün ve 950mg/kg/gün dozlarında uygulanan NAS tedavisinin mortaliteyi artırdığı gözlenmiştir (45). Biz de, 150 mg/kg/gün dozunda 3 gün NAS tedavisi uyguladığımız çalışmamızda, mononükleer hücre infiltrasyonunun ve eritrosit ekstravazasyonunun sepsise göre NAS grubunda anlamlı olarak azaldığını saptadık. Bu bulgular, NAS ile tedavinin sepsise bağlı oksidatif hasar ve

organ yetmezliğinde koruyucu rol alabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak, oksidatif stresli hastalardaki NAS tedavisi ile ilgili optimum doz, zamanlama, uygulama şekli ve süresi halen net değildir.

RCM nefropatisine bağlı NO bağımlı renal tübüler hasarı önlemede N-acetylcysteine amide (NACA) ve NAS'ın membran penetrasyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada indüklenbilir nitrik oksit sentetaz enziminin aracılık ettiği p38 MAPK yolunun iohexol ile uyarılması sonucu renal tübüler hücrede apoptozis gerçekleşmiştir. Yeni antioksidan ajan olan NACA NAS'a göre bu yolu daha fazla inhibe ederek apoptozisi yavaşlatmıştır (46).

M.Zafarullah ve ark.(14) NAS'i moleküler düzeyde etkinliğini araştırmışlardır. Bu araştırmalar sonucunda NAS'ın transforme hücrelerin seçilmiş apoptozisini artırdığını, hücre siklusunu etkileyerek antimetastatik etki gösterdiğini ve kondrosit ve nöron gibi bazı hücrelerin büyümesini ve yaşamını teşvik ettiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmaların sonuçları da, NAS'ın antioksidatif bir ajan olarak sepsise bağlı hücre hasarında koruyucu olabileceğini işaret etmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz bulgular sepsisin erken döneminde NAS uygulamasının böbrekteki inflamatuvar hasarlanmayı azalttığını göstermektedir. Serbest oksijen radikali süpürücüsü olan NAS'ın, sepsiste hücre korunması ve apoptozise etkisinin spesifik çalışmalar ile değerlendirilmesi ve etkinliğinin dozu, uygulama zamanlaması ve süresi ile ilgisi araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Duran A, Kafalı E, Fidan M, Köylü Ö ve ark. Tavşanlarda oluşturulan deneysel sepsis modelinde düşük doz n-asetilsistein tedavisinin etkinliği. Selçuk Tıp Derg 2004; 20:140-149
2. İskit A. Deneysel şok modelleri. Anestezi Dergisi 2006;14(2):71-75
3. Ryan MD, Steven MSc, Dean PhD, Daniel MD et al. Early intravenous unfractionated heparin and mortality in septic shock. Crit Care Med November 2008 36(11):2973-2979
4. Thomas Lee Hua Xu Cory D. Siegel Igor E. Krichevsky. Local Anesthetics Induce Human Renal Cell Apoptosis. Am J Nephrol 2003;23:129-139
5. Cankurtaran M, Kıyıkım A. Sepsiste renal hemodinami ve mediyatörler. Erciyes Tıp Dergisi. 2002; 24(4) 202-208
6. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. Türk kardiyoloji dern arş 2008;36(2):120-130.
7. Reinout A, Albert P, Gustavo M, MD, et al. Lung epithelial cell apoptosis during acute lung injury in infancy. Pediatr Crit Care Med 2007 Vol. 8, No. 2 132-137
8. Kapucuoğlu N, Boduroğlu EC, Irkkan Ç, Pak I. Bazal hücreli karsinomda p53 protein ekspresyonunun immünhistokimyasal yöntemle saptanması. Patoloji Bülteni 2001; 18(1): 31-34.
9. Tomatır A. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. T.Klin.Tıp.Bilimleri. 2003,23:499-608
10. Ortolani O, Conti A, Moraldi E, Cantini Q. The Effect of Glutathione and N-Acetylcysteine on Lipoperoxidative Damage in Patients with Early Septic Shock. AJRCCM 2000 Vol 161 No 6 1907-1911
11. Kılçksız S, Demirel C. Oksidatif stres, radyasyona bağlı hasar ve radyokoruyucu olarak N-asetilsistein'in potansiyel rolü. Türk Onkoloji Dergisi 2008;23(4):200-207
12. Uzun Ş, Çeliker V, Okur H, Başgül E ve ark. N-Asetilsisteinin anesteziistlerde nötrofil ve lenfosit apoptozisine etkileri. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005, 25:817-823
13. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L ve ark. The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Apoptotic Lung Injury In Cecal Ligation And Puncture-Induced Sepsis Model. Shock, Vol. 19, No. 4, pp. 366-372, 2003

14. Vincent JL. Update on sepsis: Pathophysiology and treatment. *Acta Clinica Belgica* 2000; 55: 79-87
15. Evans T, Singh S. Organ dysfunction during sepsis. *Intensive Care Med* (2006) 32:349–360
16. Levy MM 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* -2003; 29;530-538
17. Badley AD, Steckelberg JM. Sepsis Syndrome. In: Wilson WR, Sande MA (eds): *Current Diagnosis and Treatment In Infectious Diseases*. McGraw-Hill, New York, 2001:231-9.
18. Cinel I, Dellinger R. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20(4):345-352
19. Khan N, Adhami VM, Mukhtar H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Endocrine-Related Cancer* (2010) 17 R39–R52
20. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death.-*Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516
21. Ow Y-L P, Green R.D, Hao Z, Mak T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 9 :532-542 July; 2008.).
22. Heiser D, Labi V, Erlacher M, Villunger A. The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease. *Experimental Gerontology* 2004;39(8):1125-35.
23. Spierings D.C, Vries E.G, Vellenga E. et al: Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52(6): 821-831; 2004
24. Taylor R.C, Cullen S.P, Martin S.J. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 9 :231-241 March; 2008
25. Bohlinger I, Leist M, Gantner F. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol* 1996; 149:1381-93
26. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999; 162:4148-56.
27. Cinel İ, Özer İ, Poyraz A, Oral U. Prevention of Apoptosis by Poly(ADP-Ribose) Synthetase Inhibition in LPS-induced sepsis. *Pharmacological Research*, Vol. 46, No. 2, 2002
28. Cinel İ, Oral U. SIRS, Sepsis, MODS Patofizyolojisinde Apoptozis *Türk Anest Rean Cem Mecmuası* 29: 52-58, 2001

29. Yazıcı P, Alizadehshargh S, Güner G. Apoptoz: Düzenleyici Moleküller, Hastalıklarla İlişkisi ve Apoptozu Saptama Yöntemleri Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009;29(6):1677-86
30. Oberholzer A, Oberholzer C et al. Apoptosis in sepsis a new target for therapeutic exploration. FASEB J. Apr 2001;15:879-892
31. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? British Medical Journal/ (Clinical Research Ed.) (BMJ) 2001; 322:1536-8.
32. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci 2003; 60: 6-20.
33. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ et al. Peroxynitrite induces heme oxygenase-1 in vascular endothelial cells: Biochem J 1999; 339: 729–36.
34. Zaragoza A, Diez-Fernandez C, Alvarez AM, Andres D et al: Mitochondrial involvement in cocaine-treated rat hepatocytes: effect of N-acetylcysteine and deferoxamine. Br J Pharmacol 2001; 132: 1063–70.
35. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. Clin Biochem. 2000 Nov;33(8):619-25.
36. Aykaç B. Sepsiste Sağlık Kampanyası Rehberinin Tedavi Algoritmasındaki Yeri Türkiye Klinikleri J Surg Med 34 Sci 2006, 2(32)
37. E. Messaris, N. Memos, E. Chatzigianni. Apoptotic Death of Renal Tubular Cells in Experimental Sepsis. Surgical Infections Volume 9, Number 3, 2008
38. Gürer A, Özdoğan M, Gökakın A, Gömcel İ. Tissue oxidative stress level and remote organ injury in two-hit trauma model of sequential burn injury and peritoneal sepsis are attenuated with N-acetylcysteine treatment in rats. Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery 2009;15(1):1-6
39. Duran A, Kafalı M. E, Şahin M, Köylü Ö. ve ark. Taşlanlarda oluşturulan deneysel sepsis modelinde düşük doz n-asetilsistein tedavisinin etkinliği Selçuk Tıp Derg 2004
40. Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. Am J Med 1991; 91: 54S-59S.
41. Del Sorbo L, Zhang H. Is there a place for N-acetylcysteine in the treatment of septic shock? *Critical Care* 2004, 8:93-95

42. Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure. *Crit Care Med* 1999; 27: 1100-1104
43. Spapen H, Zhang H, Demanet C et al. Does N-acetyl-L-cysteine influence response during early human septic shock? *Chest* 1998; 113: 1616-1624
44. Akıncı B, Erden A, Kanbak M, Aypar Ü. Klinik Çalışma N-asetil Sistein Tedavisinin Çoklu Organ Yetmezliği Gelişmesini Önlemedeki Yeri *Türk Anest Rean Der Dergisi* 2005; 33: 76-81
45. Corinne RS, Miranda A, Winkelhuyzen-janssen L, Colinda JMA. Lowdose N-acetylcysteine protects rats against endotoxinmediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157:1283-93.
46. Gong X, Celsi G, Carlsson K, Norgren S et al.N-Acetylcysteine Amide Protects Renal ProximalTubular Epithelial Cells against Iohexol-Induced Apoptosis by Blocking p38 MAPK and İnos Signaling *Am J Nephrol* 2010;31:178–188