

Tavşanlarda oluşturulan deneysel sepsis modelinde düşük doz n-asetilsistein tedavisinin etkinliği

Arif DURAN¹, M. Ertuğrul KAFALI¹, Mustafa ŞAHİN², Öznur KÖYLÜ³, Adil GÖKALP¹, Uğur ARSLAN⁴, Hatice TOY⁵

¹Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı,

²Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı,

³Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı,

⁴Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

⁵Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Amaç: Deneysel sepsis modelinde N-asetilsistein'in (NAC) serbest oksijen radikalleri ve plazma düzeylerine olan etkilerini, organ fonksiyon bozuklukları ve doku hasarını önlemedeki rolünü belirlemektir. **Materyal ve metod:** 30 dişi tavşan 10'arlı gruplara ayrıldılar. Tavşanlarda çekum ligasyon perforasyon (ÇLP) yöntemiyle sepsis oluşturuldu. Sham grubu, sepsis grubu ve sepsis + NAC(10 mg/kg/gün) şeklinde gruplar oluşturulup, ilaçları ÇLP'den hemen sonra, 12.ve24. saatte verildi. Aynı saatlerde kan gazları, plazma glutatyon(GSH), malondialdehid(MDA), biyokimyasal tetkik için kan örnekleri alındı. Doku örnekleri alındı. **Bulgular:** Sepsis grubuyla kıyaslandığında NAC grubunda plazma GSH artmış ($P<0.05$) ve MDA değerleri azalmış bulundu ($P<0.05$). NAC grubunda SGOT, SGPT ve kreatinin değerleri sepsis grubuna göre artmış bulundu ($P<0.05$). NAC grubunun arteriyel kan PO₂ ve SaO₂ değerleri sepsis grubuna göre artmış bulundu ($P<0.05$). NAC grubunda karaciğerin histopatolojik incelemesinde apoptoz derecesi incelemesinde sepsis grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştı ($P<0.05$). NAC grubunun böbrekteki mononükleer hücre infiltrasyonu derecesi sepsis grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olarak bulundu ($P<0.05$). **Sonuç:** Deneysel sepsis modelinde antioksidan bir ajan olan NAC'in düşük doz uygulanmasında plazma MDA, GSH düzeylerine ve akciğer fonksiyonlarına olumlu etkileri mevcuttur. Daha kapsamlı ve yeni çalışmalarla NAC'in değişik dozlarda verilmesiyle sepsis tedavisinde NAC tedavisinin önemi daha iyi anlaşılacaktır.

Anahtar kelimeler: Sepsis, antioksidan ajanlardüşük doz N-asetilsistein, plazma MDA seviyesi, plazma GSH seviyesi
Selçuk Tıp Derg 2004; 20:140-149

SUMMARY

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

Purpose: To determine the effect of NAC therapy on plasma levels, the protective role of tissue injury and organ dysfunction of free oxygen radicals in experimental sepsis model. **Material and method:** 30 female rabbits were divided into 3 groups, each composed of 10 rabbits. Sepsis was constituted by caecum ligation perforation technique. Groups named sham, sepsis and sepsis + NAC (10mg/kg/day) were formed and medication was given 12and 24 hours after caecum ligation and perforation. At the same time blood samples to measure blood gases, plasma glutathion(GSH), malondialdehyde(MDA) and biochemical diagnosis were collected. Tissue samples were obtained. **Findings:** Plasma GSH levels were elevated in NAC group with respect to sepsis group($P<0.05$). Plasma MDA levels were decreased in sepsis group when compared to NAC group($P<0.05$). Liver tissue MDA levels were found to be same in both groups. AST, ALT and creatinine values were elevated significantly in NAC group when compared to sepsis group($P<0.05$). Apoptosis in liver tissue was significantly decreased in NAC group when compared to sepsis group($P<0.05$). Degree of mononuclear infiltration in kidneys were decreased in NAC group when compared to sepsis group($P<0.05$). **Conclusion:** Application of low dose NAC, an antioxidative agent, in experimental sepsis model has beneficial effects on pulmonary functions and plasma MDA, GSH levels. More and comprehensive studies which tests different NAC doses are needed to determine the role for NAC in experimental sepsis model.

Key words: Sepsis, antioxidant agents, low-dose N-acetylcystein, plasma MDA levels, plasma GSH levels

Sepsis ve septik şok, mortalitesi yüksek, sıklığı giderek artan, oluşan sekellerinin rehabilitasyonu zor, son derece karmaşık patofizyolojik olayların

olduğu bir klinik durumdur. Sepsis ve septik şok yüksek morbidite, mortalitesi ve oluşturduğu sekelleri nedeniyle acil ve agresif tedavi gerektirir (1).

Haberleşme Adresi: Dr. M. Ertuğrul KAFALI, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı, KONYA
Geliş Tarihi : 13.09.2004 Yayına Kabul Tarihi : 09.02.2005 e-posta: kafali1405@hotmail.com

Serbest radikal reaksiyonları vücutta istenmeyen bir takım değişikliklere neden olur. Bu süreç, genetik ve çevresel etmenlerin üzerine eklenmesiyle kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir. Serbest radikallerin organizma için fagositoz gibi yararlı işlevleri vardır. Bununla birlikte, aşırı miktarda bulunmaları başta lipidler ve glikoproteinler olmak üzere hücre yapısı üzerine toksik etki yapmaktadır. (2-6) Serbest radikallerin seviyelerinin tespiti, ileri derecede reaktif olmaları nedeniyle ve normal koşullarda ömürlerinin kısa olması ve düşük yoğunlukta bulunmaları nedeniyle oldukça güçtür (7). Genellikle biyolojik serbest radikal reaksiyonları sonucunda oluşan lipid peroksidasyon ürünleri, özellikle son ürün olan malondialdehid (MDA) seviyesi bize fikir verir. Ayrıca koruyucu antioksidan savunma sistemi elemanlarının incelenmesi, serbest radikaller ve oluşturdukları doku harabiyeti hakkında fikir verir.

NAC (N-asetilsistein) bir thiol bileşiği olmakla birlikte potent bir antioksidan ve antiinflamatuvar özelliğindedir(8). Aynı zamanda iyi bilinen bir glutatyon (GSH) prokürsörü ve direkt hareket etkileriyle serbest oksijen radikallerini, hidroksil radikallerini ve hipoklorik asidi esas indirgeyicisi olarak temizler.(9) Redoks, sensitif değişim faktörlerini hızla aktive ederken inflamasyon, immün ve akut faz yanıtını içeren genleri aktive eder (10,11). NAC deneysel çalışmalarda seruleinin maximum doza yakın etkilerinde uyarılmasıyla koruyucu role sahiptir (11). Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi plazma MDA düzeylerini düşürmüştür (12-15) Ratlarda alkol stresi altında NAC verilmesi sonucu serum SGOT, SGPT, plazma MDA, GSH ve karaciğer MDA değerleri herhangi bir işlem yapılmamış kontrol gurubu değerleriyle aynı düzeyde ölçülmüştür (14).

Bu çalışmanın amacı deneysel sepsis modelinde antioksidan ajan olan N-asetilsistein'in (16,17), sepsiste serbest oksijen radikalleri düzeylerine olan etkilerini belirlemek (12,18) ve sepsisin neden olduğu organ fonksiyon anormallikleri (13,14), akciğer, karaciğer ve böbrekteki doku hasarını önlemedeki rolünü belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

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

Çalışmada 3.500-4.500 gr (ort 3.900 gr) ağırlıkta Yeni Zelanda tipi 30 dişi deney tavşanı kullanıldı. Tavşanlar 10'arlı 3 gruba ayrıldı. Sham grubu haricindeki tavşanlarda çekal ligasyon-ponksiyon (ÇLP) yöntemi kullanılarak sepsis oluşturuldu (19).

Grup I (Sham grubu, n=10):Mini laparotomi ile çekum izole edilip Çekal Ligasyon Perforasyon (ÇLP) uygulanmadan batın kapatıldı.

Grup II (Sepsis grubu, n=10):Mini laparotomi ile çekum izole edilip ÇLP metoduyla sepsis oluşturularak batın kapatıldı.

Grup III (N-asetil sistein grubu, n=10):ÇLP metoduyla sepsis oluşturularak batın kapatıldı. Tavşanlara iv NAC 10 mg/kg/gün üç eşit dozda verildi.

Operatif işlem: 50mg/kg İM ketamin hydrochloride ve 15 mg/kg İM xylasin HCL ile anestezi yapıldı. Tavşanların karın tıraşı ve betadin solüsyonu ile dezenfeksiyonundan sonra 3 cm'lik orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı. Sepsis oluşturmak için ratlarda ÇLP modeli seçildi (19). Laparotomi sonrası çekum izole edildi, çıkan kolon sıvazlanarak çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileocekal valvin altından 3/0 ipekle bağlanıp, çekum ön yüzü 22 numara intraket iğnesi ile iki defa delindi. Sham grubunda ÇLP uygulanmadı, sadece çekum eksplore edildi. Batın 2/0 ipekle devamlı sütürlerle kapatıldıktan sonra tavşanlar kafeslere konularak nemi, ısı ve ışığı kontrol altında tutulan odalarda tutuldular. Tavşanlara ilaçları önceden belirlenen saatlerde verildi. Postoperatif 12. saatten itibaren standart tavşan yemi ve içme suyu almalarına izin verildi.

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

ayrıldı ve plazma (-80 °C) de derin dondurucuda saklandılar.

Plazma GSH ölçümü 3 ml antikoagülanlı tam kanla aynı gün içinde Beutler yöntemiyle manuel olarak çalışıldı.

Plazma MDA ölçümü: Drapper ve Hadley (20) yöntemleri ile (TBA-MDA) manuel olarak çalışıldı..

Doku MDA ölçümü tavşandan alınan ve -80 °C de saklanan karaciğer parçaları çözündükten sonra çift kaynatma yöntemiyle manuel olarak çalışıldı.

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

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

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

Biyokimyasal değerlerin ölçümü karaciğer ve böbreklerde doku hasarı ve organ fonksiyonlarını belirlemek için otoanalizörle serumda SGOT,SGPT, LDH, üre, kreatinin ve CRP değerleri kolorimetrik olarak ölçüldü.

Dokuların histopatolojik olarak değerlendirilmesi Alınan doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonu içine kondular ve çalışma anına kadar saklandılar.

Deneklerden alınan akciğer, karaciğer ve böbrek dokularından hazırlanan parafin bloklarından 5 mikron kalınlıkta kesitler alındı. Bu kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopu altında 40 ve 100 büyütmede incelendiler. Histopatolojik incelemeler grupları bilmeyen bir patoloji uzmanı tarafından yapıldı.

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

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

BULGULAR

Serbest oksijen radikal düzeyleri

Plazma GSH, MDA ve karaciğer doku MDA sonuçları NAC ve sham grupları 12.saat plazma GSH değerleri açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12.saat plazma GSH değerlerinin NAC ve sham gruplarında sepsis grubuna göre arttığı saptandı (P<0.05) (Tablo 1). NAC ve sham grupları 12. saat plazma MDA değerleri açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma MDA değerlerinin NAC ve sham gruplarında sepsis grubuna göre azaldığı saptandı (P<0.05) (Tablo 1). NAC ve sepsis grupları karaciğer dokusu MDA değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında, karaciğer dokusu MDA değerlerinin sepsis grubuna göre arttığı saptandı (P<0.05) (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların plazma GSH, plazma MDA ve karaciğer MDA düzeyleri ortalamaları

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

*= P<0.05

Arteriyel kan gazı sonuçları

Grupların 12. ve 24. saat arteriyel kan pH ve PCO₂ arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (P>0.05) (Tablo 2). NAC ve sham grupları arteriyel kan PO₂ ve SaO₂ değerleri açısından sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 24. saat arteriyel kan PO₂ ve SaO₂ değerlerinin sepsis grubuna göre yüksek olduğu saptandı (P <0.05) (Tablo 2).

Biyokimyasal parametre sonuçları

NAC ve sepsis grupları arasında plazma LDH (Tablo 3), üre ve lökosit (Tablo 4) değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında arttığı saptandı (P<0.05). NAC grubu 12. saat plazma SGOT ve SGPT değerleri açısından sham ve sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma SGOT ve SGPT değerlerinin sham ve sepsis gruplarına göre arttığı saptandı (P<0.05).

NAC ve sepsis grupları 12. ve 24. saat plazma CRP değerleri açısından sham grubuyla karşılaştırıldığında 12. ve 24. saat plazma CRP değerlerinin sham grubuna göre arttığı saptandı (P <0.05) (Tablo 3).

NAC grubu 12. saat plazma kreatinin değerleri açısından sham ve sepsis grubuyla karşılaştırıldığında 12. saat plazma kreatinin değerlerinin sham ve gruplarına göre arttığı saptandı (P<0.05).

Sepsisle yaşam süreleri tespiti

Sepsis gruplarının ÇLP oluşturulduktan sonra ortalama yaşam saatleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (P>0.05) (Tablo 4).

Kan kültürü sonuçları

Sepsis grubunda yapılan aerop kan kültürü sonucunda Streptococcus mitis ve E. Coli ürerken, NAC grubunda Enterobacter cloaca ve S.aureus üredi. Yapılan anaerob kültürlerde üreme yönünden anlamlılık tespit edilmedi (P>0.05).

Histopatolojik bulgular

Akciğerde tespit edilen histopatolojik değişiklikler (Şekil 1) Sepsis grubuyla NAC grubu arasında akciğerdeki intraalveolar fibrin birikimi, akciğerdeki nötrofil infiltrasyonu, akciğerdeki interstisyel ödem, akciğerdeki lenfoid hiperplazi ve akciğer

Tablo 2. Grupların arteriyel kan pH, PO₂, PCO₂ ve SaO₂ ortalama değerleri

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

*= P<0.05

Tablo 3. Grupların plazma SGOT, SGPT, LDH ve CRP ortalama değerleri

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

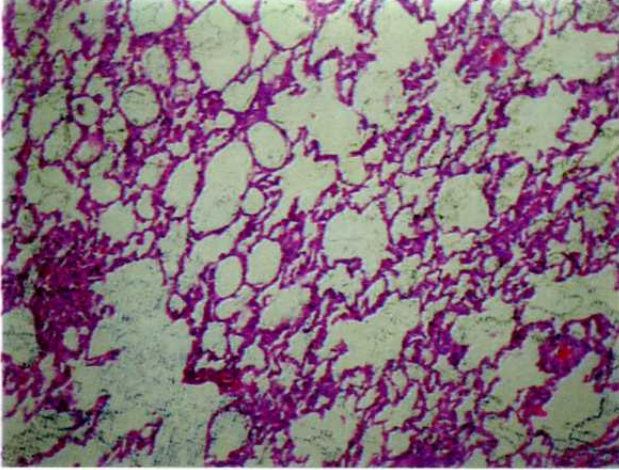
*= P<0.05

Tablo 4. Grupların plazma üre, kreatinin, lökosit düzeyleri ve deneklerin yaşam süreleri ortalama değerleri

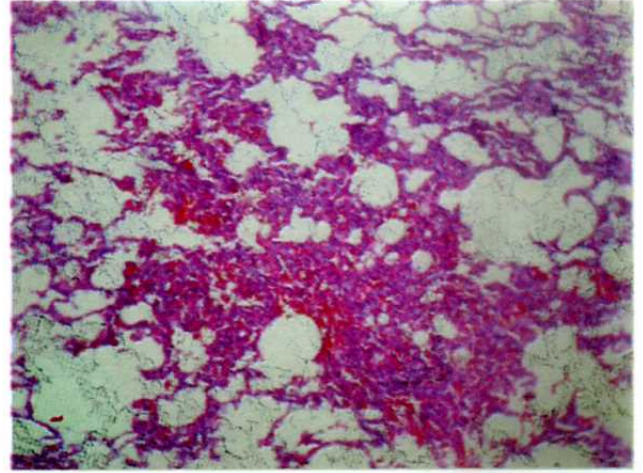
	Sham grubu		Sepsis grubu		NAC grubu	
	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat	12.saat	24.saat
Lökosit (mg/dl)	8,68±2,32	10,80±1,98	8,5±1,8	10,7±4	8,7±1,2	13,5±1,2
Üre (mg/dl)	47,2±21,7	50,2±19,9	69±29,7	72±36,8	67,3±16,3	70,2±19,5
Kreatinin (k/UL)	0,96±0,28	1,3±0,18	1,2±0,6	1,3±1,2	2,08±0,75*	1,5±0,27
CRP (U/L)	2,28±0,27	2,76±0,83	29,8±20,3	42,9±15	43,1±23,7	51±28,6
Yaşam süreleri (saat)	-	-	24,1±5,2	-	25,5±14,1	-

*= P<0.05

Sepsis grubuna ait akciğer kesiti

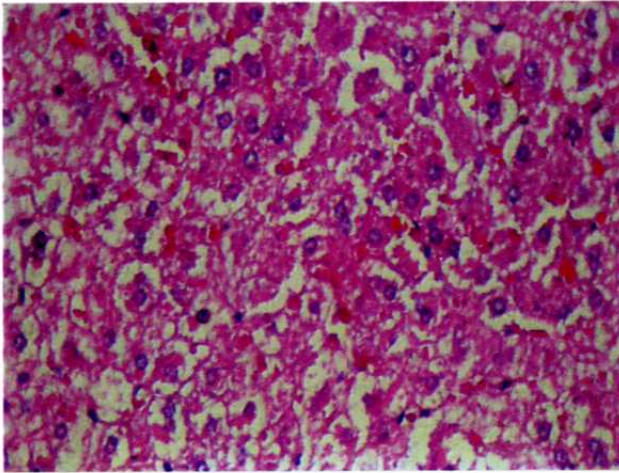


NAC grubuna ait akciğer kesiti

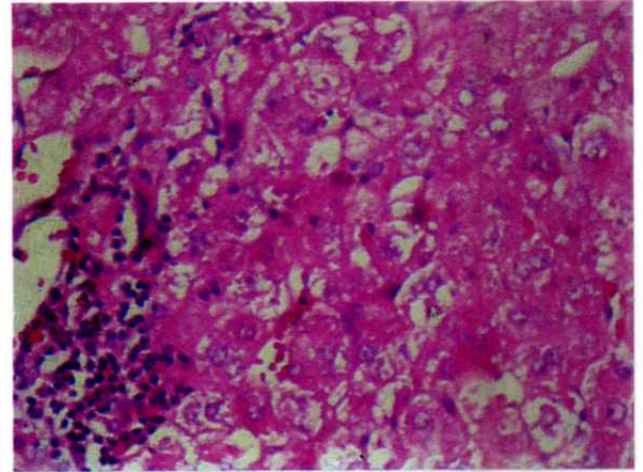


Şekil 1. Sepsis ve NAC grubuna ait akciğer histopatolojik inceleme

Sepsis grubuna ait karaciğer kesitleri



NAC grubuna ait karaciğer kesiti



Şekil 2. Sepsis ve NAC grubuna ait karaciğer histopatolojik inceleme

konjesyonu derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$).

Karaciğerde tespit edilen histopatolojik değişiklikler: (Şekil 2) Sepsis grubuyla NAC grubu arasında karaciğerdeki hidropik dejenerasyon, Kupffer hücre hiperplazisi, mononükleer hücre infiltrasyonu ve nötrofil infiltrasyonu derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$). NAC grubuyla Sepsis grubu karaciğerdeki apoptoz derecesi açısından karşılaştırıldığında ise, karaciğerdeki apoptoz derecesinin NAC grubunda sepsis grubuna göre daha düşük olduğu saptandı ($P<0.05$).

Böbrekte tespit edilen histopatolojik değişiklikler (Şekil 3) Sepsis grubuyla NAC grubu arasında böbrekteki Bowman aralığında genişleme, böbrek tübül hücrelerinde dejenerasyon ve böbrekteki vakuolizasyon derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$). Buna

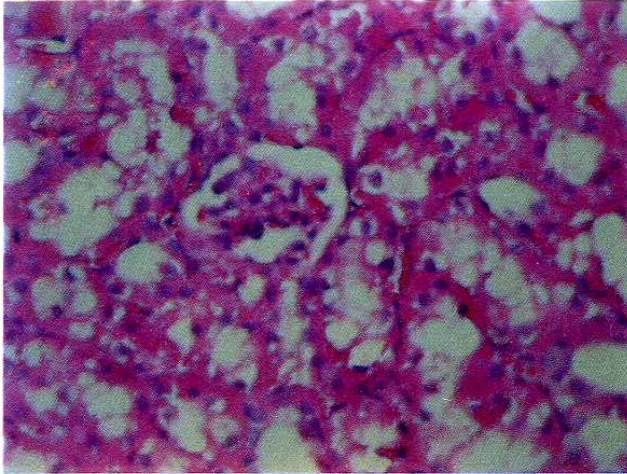
karşılık NAC grubunun böbrekteki mononükleer hücre infiltrasyonu derecesinin sepsis grubuyla karşılaştırılmasında böbrekteki mononükleer hücre infiltrasyonu derecesinin NAC grubunda sepsis grubuna göre daha düşük olduğu saptandı ($P<0.05$).

TARTIŞMA

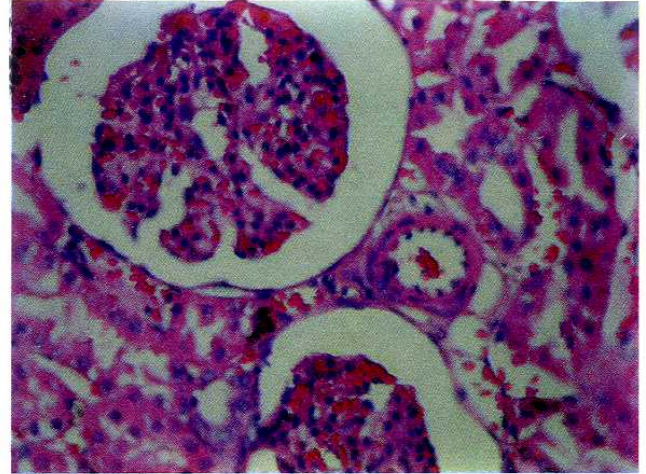
Septik peritonitli ratlarda diyafram kasının kasılma gücü ve dayanıklılığı azalmıştır. Sepsiste ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin etkilerini nötralize etmek için uygulanan antioksidan ajanların (alfa tokoferol analogları) sepsiste sağ kalımı uzattığı gösterilmiştir (21).

Serbest oksijen radikalleri sepsis patogeneğinde önemli rol oynar. Antioksidan ajanların sepsis veya endotoksemi tedavisinde hücresel yaralanmayı azaltarak etkili olduğu, serbest oksijen radikallerinin aktivitesinin ölçülmesiyle gösterilmiştir (22).

Sepsis grubuna ait böbrek kesitleri



NAC grubuna ait böbrek kesiti



Şekil 3. Sepsis ve NAC grubuna ait böbrek histopatolojik incelemesi

Hüresel antioksidan bir ajan olan NAC'in septik hastalar, sistemik inflamatuvar yanıt sendromlu (SIRS) hastalarda kullanımı insan, hayvan ve laboratuvar çalışmalarında (sitopatojenik serbest oksijen radikallerine glutatyon ile birlikte olumlu etkisi) gösterilmiştir (23).

Plazma MDA seviyesi ratlarda Satoh metoduyla 1.8 ± 0.2 nmol/ml olarak tespit edilmiştir ve antioksidan ajan vermekle plazma MDA düzeyleri anlamlı ölçüde düşmüştür (24). Normal ratlarda ölçülen MDA (MDA-TCA metoduyla) değeri 1.75 ± 0.11 nmol/ml, sepsis oluşanlarda 3.8 ± 0.2 nmol/ml olarak ölçülmüştür (25). Ratlarda normal plazma MDA değeri 0.94 nmol/ml olarak ölçülmüştür. Alkol stresi altında NAC verilmesi sonucu serum plazma MDA değerleri herhangi bir işlem yapılmamış kontrol grubu değerleriyle aynı düzeyde ölçülmüştür (26).

Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi plazma MDA düzeylerini düşürmüştür (13,27,28).

Çalışmamızda plazma MDA değeri NAC tedavisinin 12. saat değerleri gözönüne alındığında tedavinin etkili olduğu ve bunun yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi. Fakat 24. saat değerlerindeki değişimin artma yönünde olması diğer çalışmalarla uyumlu değildi. Bunun sebebi olarak NAC tedavisinin erken dönemde etkili olduğu, ilaç dozunun düşük olduğu, sepsisin ilerleyen saatlerinde etkisini kaybettiği ve kombine tedavilerde etkili olabileceği düşünüldü.

Ratlarda normal karaciğer MDA değeri 49 nmol/100mg protein olarak ölçülmüştür. Alkol stresi altında NAC verilmesi sonucu karaciğer MDA

değerleri herhangi bir işlem yapılmamış kontrol grubu değerleriyle aynı düzeyde ölçülmüştür (26). Tavşan karaciğer dokusundaki MDA düzeyi 1.75 ± 0.18 nmol/g doku olarak bulunmuştur (13).

Antioksidan ajan olarak NAC verilen gruplarda karaciğer dokusu MDA değerleri ortalamasının sepsis grubuna göre azalması beklenirken, özellikle NAC grubunda anlamlı düzeyde artma oldu. Bu sonuçlar diğer çalışmalarla uyumlu değildi. Bunun sebebi olarak verilen ilacın 10mg/kg/gün dozunun karaciğerde hasara neden olduğu düşünüldü. Bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması aydınlatıcı olacaktır.

Farelerde yapılan bir çalışmada normal GSH düzeyi 4.71 ± 0.32 $\mu\text{mol/dl}$ olarak bulunmuştur (29). Bir başka yapılan mice çalışmasında herhangi bir işlem yapılmamış deneklerin plazma GSH düzeyleri 19.0 ± 1.8 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur (30). Deneysel sepsis modelinde NAC verilmesi GSH aktivitesini arttırmıştır (31,32). Tavşanlarda NAC verilmesi ile GSH ve serbest radikal toplayıcılar artmıştır (33). Endotoksemik ratlarda NAC tedavisi plazma GSH aktivitesini arttırmıştır (14,34).

Antioksidan ajan olarak NAC verilen grupta sepsis grubuna göre plazma GSH düzeyinin yüksek olması diğer çalışmalarla uyumaktadır. Vermiş olduğumuz NAC'in serbest radikaller üzerine anlamlı düzeyde etkisi bulundu.

ÇLP metoduyla ratlarda oluşturulan sepsis modelinde antioksidan verilmesi sonucu hayatta kalma süresi uzamıştır (35). Sepsiste antioksidan tedavi endojen antioksidanların etkinliğini artırıp klinik düzelmeyi hızlandırmaktadır (36). Deneysel sepsis modelinde NAC hayatta kalma süresini uzatmak-

tadır (37). Tavşanlarda oluşturulan (intraperitoneal E.Coli injeksiyonu ile) septik şok modelinde uygulanan antioksidan (sodium thiosulfate, alpha-tocopherol, desferoksamine ve diethyldithiocarbamate) tedavi sonucunda, sadece antioksidan tedavinin oluşan septisemiye düzeltmediği gösterilmiştir (38). Deneysel sepsis modelinde NAC kullanımının immun yanıt ve sepsis sonucu lenfositlerden salınan endotoksinlere karşı oluşan yanıtı da arttırmış ve sepsisin oluşturduğu oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (39).

NAC grubunun sepsis grubuna göre yaşam süresi ortalamasının sepsis grubuyla yaklaşık aynı olmasının NAC tedavisinin tek başına etkili olmasına, verilen 10mg/kg/gün dozunun yetersiz olmasına ve verilen tedavi süresinin kısa olmasına bağlandı.

ÇLP modeliyle oluşturulan sepsiste NAC kronik kullanımı (1 hafta) akciğer dokusundaki sepsise bağlı apoptozu antioksidan ve antiinflamatuvar etkiyle önlemiştir (40). NAC'in yoğun bakım hastalarında nötrofil fagositozunu arttırdığı, bakterilerin hücrelere adezyonu, fagositozu ve bakteriyel akciğer zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir (41). Erken septik şokta NAC verilmesi akciğer fonksiyonlarında düzelmeye sağlamaktadır (42). Çalışmamızda NAC PO₂ değerlerini düzeltmede diğer çalışmalarla uyum gösterdi. NAC tedavisinin kan PCO₂ değerleri açısından herhangi bir etkisi olmadı. NAC kan SaO₂ değerlerini normale çekerek, kan SaO₂ değerlerine olan etkisiyle diğer yapılan çalışmalarla uyum gösterdi.

Gram (-) sepsiste serum CRP değerlerinin arttığı bilinmektedir (43,44). Deneysel sepsis çalışmalarında NAC tedavisi ile plazma CRP seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (45). Çalışmamızda sham grubuna göre sepsis grubunda serum CRP değerlerinin yüksek seyretmesi diğer çalışmalarla uyumluydu. NAC verilen grupta serum CRP düzeylerinin artması ilacın serum CRP değerini etkilemediğini düşündürdü. Bu sonuç diğer yapılan çalışmalarla uyum göstermedi. Bu uyumsuzluğun nedeni olarak ilacın 10mg/kg/gün dozunun az olması ve uygulama azlığı düşünüldü.

ÇLP ve endotoksemi ile oluşturulan sepsis modelinde renal disfonksiyon ile üre ve kreatinin düzeyleri artmıştır (46). Çalışmamızda üre ve kreatinin değerleri sham grubuna göre sepsis gruplarında yüksek seyretti. NAC grubunda sep-

sile aynı düzeyde üre değerlerinin olması, ilacın diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında bu değerler üzerine etkili olmadığını düşündürdü. Özellikle kreatinin değerlerinde olumsuz etkileri olduğu ve bu olumsuzluğun ilacın 10mg/kg/gün dozuyla ilgili olduğu düşünüldü.

ÇLP ve endotoksemi ile oluşturulan sepsis modelinde hepatosellüler disfonksiyon ile SGOT ve SGPT değerleri artmaktadır (47-49). Çalışmamızda sepsis gruplarında SGOT değerleri sham grubuna göre artmıştır. NAC tedavisinin plazma SGOT ve SGPT değerleri üzerine olumsuz etkileri oldu. Bu olumsuz etkinin sepsisle birlikte ilacın karaciğer üzerine olan toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünüldü.

NAC tedavisinin LDH ve lökosit değerleri üzerine herhangi bir etkisi bulunmadı. Kan kültürlerinde üreme olmaması, ardışık kan kültürleri alınmamasına ve sepsiste her zaman kan kültüründe üreme olmamasına bağlandı.

ÇLP modeliyle oluşturulan sepsiste NAC'in kronik kullanımında (1 hafta) akciğer dokusundaki sepsise bağlı apoptozu antioksidan ve antiinflamatuvar etkiyle önlemiştir (40). NAC'in yoğun bakım hastalarında nötrofil fagositozunu arttırdığı bakterilerin hücrelere adezyonu, fagositozu ve bakteriyel akciğer zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir (41). ÇLP metoduyla yapılan sepsis modelinde akciğerde nötrofil infiltrasyonunun arttığı gözlenmiştir. NAC tedavisi alan grupta da sonuçların ÇLP grubundan histopatolojik olarak farklı olmadığı görülmüştür. Yalnız akciğer epiteliyal hücre apoptozunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görülmüştür (50).

Ratlarda endotoksin verilmesiyle oluşturulan sepsis modelinde alveolar ve interstisyel hemoraji, ödem ve lökosit infiltrasyonu gözlenirken; yüksek doz (275mg/kg/gün-48 saat) NAC verilen gruplarda histopatolojik bulguların gerilediği gözlenmiştir (51).

NAC tedavisinin diğer yapılan çalışmalardaki gibi akciğer histopatolojik incelemelerinde olumlu etkilerinin olmayışı, ilaç dozlarının düşük olmasına bağlandı. Bu konuda kapsamlı çalışmaların yapılması aydınlatıcı olacaktır.

NAC tedavisinin karaciğer histopatolojik incelemelerinde sepsis grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer apoptozu dışında anlamlı düzeyde

katkısı olmadığı düşünülürdü. Beklenenin aksine karaciğer histopatolojik incelemelerinde anlamlı farklılık olmamasının, ilacın ve sepsisin karaciğer üzerine olan toksik etkilerine bağlı olduğu düşünülürdü.

NAC tedavisinin böbrek histopatolojik incelemelerinde sepsis grubuna göre böbrek mononükleer hücre infiltrasyonu haricinde anlamlı düzeyde katkıları olmadı. Verilen NAC tedavisiyle, böbrek histopatolojik incelemelerine olumlu etkisinin olmaması, ilacın 10mg/kg/gün dozunun düşük olmasından kaynaklandığı düşünülürdü.

NAC tedavisinin sepsiste plazma GSH, MDA, arteriyel kan PO₂ ve SaO₂ değerleri dışındaki bakılan kan parametrelerine anlamlı düzeyde olumlu katkıları olmadı. NAC tedavisinin beklenenin aksine sepsis tedavisinde etkinliğinin az olmasının nedeninin, düşük (10mg/kg/gün) dozda verilmesine bağlı olduğu düşünülürdü. NAC tedavisinin sepsis tedavisi için doz hesaplaması NAC'in (Assist amp) prospektüs bilgileri ve rutin kullanımdaki dozu baz alınarak yapılmıştır. Sepsis modelinde uygulanan NAC dozu 75 mg/kg/gün (50), antioksidan etkinlik için en az 275 mg/kg/gün ve en fazla da 950mg/kg/gün/48saat olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (52). Deneysel sepsis modelinde NAC tedavisi dozunun bu değerlerin

dikkate alınmasıyla, sepsis tedavisinde antioksidan bir ajan olarak NAC'inde yeri tartışılabilir.

Sonuç olarak; deneysel sepsis modelinde antioksidan ajan olan NAC'in düşük doz uygulanmasında serbest oksijen radikallerinin plazma düzeylerine ve arteriyel kan gazı sonuçlarına olumlu etkileri mevcuttur. Sadece serbest oksijen radikalleri üzerine etkileri hedeflendiğinde verilen doz yeterlidir ve daha yüksek dozlar verilmesi gereksizdir. NAC'in sepsisin neden olduğu organ fonksiyon anormalliklerini düzeltmede ve akciğer, karaciğer ve böbrekteki doku hasarını önlemede etkisiz olduğu tespit edildi. NAC'in biyokimyasal parametreler ve doku hasarını önlemek için daha yüksek dozlara gereksinim vardır. Çalışmamızda düşük doz uygulanmasına rağmen karaciğer ve böbrek üzerine olan olumsuz etkilerin yüksek doz uygulamalarında daha da fazla olacağı düşünülmüş ve bu nedenden dolayı da düşük doz tercih edilmiştir. NAC'in organ fonksiyon ve doku hasarlarını önlemedeki etkinliğini belirlemek için, yüksek dozda yapılacak yeni çalışmalar olası olumlu etkilerini daha da belirgin hale getirecektir. Böylece sepsis tedavisinde NAC'in önemi, etkinliği ve etkin dozu değerlendirilecektir.

KAYNAKLAR

1. Vincent JL. Update on sepsis: Pathophysiology and treatment. *Acta Clinica Belgica* 2000; 55: 79-87.
2. Buckman TD, Kling AS, Eiduson S, Sutphin MS, Steinberg A. Glutathion peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1987; 28:1349-56.
3. Cadet JL. Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. *Int J Neurosci* 1988; 40:13-8.
4. Halliwell B. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; 23:1396-8.
5. McCreadie RG, MacDonald E, Wiles D, Campbell G, Paterson JR. The Nithsdale schizophrenia survey XIV. Plasma lipid peroxide and serum vitamin E level in patient with and without tardive dyskinesia and in normal subject. *Br J Psychiatry* 1995; 167:610-7.
6. Reddy R, Sahebarao M, Mukherjee S. Enzymes of the antioxidants defence system in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1991; 30:409-12.
7. Southorn PA, Garth P. Free radicals in the medicine. II. involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1998; 63:390-408.
8. Cotgreave IA. N-Acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv. Pharmacol.* 1997; 38: 205-27.
9. Oka S, Kamata H, Kamata K, Yagisawa H, Hirata H. N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF-KB activation through inhibition of I κ B kinases. *FEBS Lett.* 2000; 472: 196-202.
10. Kim H, Seo J, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NFKB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29: 674-83.
11. Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Legros F, Louis H, Le Moine O. N-Acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice. *Pancreas* 2000; 20: 161-9.
12. Ilker D, Murat K, Burak M.Y.C, Serap B, Seranay E, Serdar H. O. The effects of cyclosporine on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in rabbit hepatic tissues. *Transplant Immunology* 2002; 10: 255-8.
13. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in Escherichia coli endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146: 730-4.
14. Konrad F, Schoenberg MH, Wiedmann H, Kilian J, Georgieff M. The application of n-acetylcysteine as an antioxidant and mucolytic in mechanical ventilation in intensive care patients. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Anaesthesist.* 1995; 44: 651-8

15. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: cruci-osity, cause, or consequence. *Lancet* 1994; 344:721-4.
16. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L et al; The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock*. 2003; 19(4):366-72.
17. Rank N, Michel C, Haertel C, Lenhart A et al; N-acetyl-cysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med*. 2000; 28(12):3799-807.
18. Ozaras R, Tahan V, Aydin S, Uzun H, Kaya S, Senturk H. N- acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats. *World J Gastroenterol*. 2003; 9:791-4.
19. Anton EO, Quinella AG, Sato AL, Liova J, Perez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001; 33: 77-9.
20. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 421-431.
21. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg* 1999; 57: 86-8.
22. Goode HF, Webster NR. Free radicals and antioxidants in sepsis clinical oxidant research Group. *Crit Care Med* 1993; 21: 1770-6.
23. Henderson A, Hayes P. Acetylcysteine as a cytoprotective antioxidant in patients with severe sepsis: potential new use for an old drug. *Australia Ann Pharmacother* 1994; 28: 1086-8.
24. Giyasettin B, Okkes Y, Sait C, Abdullah Y, Ferit M. G. Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation and homocysteine levels in rats. *Archives of Medical Research* 2002; 33: 515-9.
25. Bhattacharyya J, Data AG. Studies on the effects of lipopolysaccharide on lipid peroxidation of erythrocyte and its reversal by mannitol and glycerol. *Journal of Physiology and pharmacology* 200; 52:145-52.
26. Ozaras R, Tahan V, Aydin S, Uzun H, Kaya S, Senturk H. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats. *World J Gastroenterol*. 2003; 9: 791-4.
27. Van Surell C, Boczkowski J, Pasquier C, Du Y, Franzini E, Aubier M. Effects of N-acetylcysteine on diaphragmatic function and malondialdehyde content in *Escherichia coli* endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146:730-734.
28. Katsuya M, Kahoru N, Shun-ichi K, Hideofumi O. Propofol attenuates diaphragmatic dysfunction induced by septic peritonitis in hamsters. *Anesthesiology* 2001; 94: 652-60.
29. Govinder JS, Flora K, Prahlad KS. Beneficial effects of s-adenosyl-l-methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione and lipid peroxidation during acute lead- ethanol administration in mice. *Alcohol* 1999; 18: 103-8.
30. Christian L, Li LJ. Glutathione and glutathione ethyl ester supplementantation of mice after glutathione homeostasis during exercise. *Am Society for Nutritional Sciences*. 1998; 2420-6.
31. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabed M, Buurman WA, Vincent JL. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am J Physiol*. 1994; 266: 1746-54.
32. Sanz AG, Obeso A, Agapito MT, Gonzalez C. Reduced to oxidized glutathione ratios and oxygen sensing in calf and rabbit carotid body chemoreceptor cells. *Journal of Physiology* 2000; 537: 209-20.
33. Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabed M, Buurman WA, Vincent JL. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am J Physiol*. 1994; 266: 1746-54.
34. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. N-acetyl-cysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol*. 1992; 140: 390-9.
35. 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.
36. Goode HF, Webster NR. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21:1770-6.
37. Victor VM, Guayerbas N, Garrote D, Del Rio M, De la Fuente M. Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *Biofactors*. 1999; 10: 347-57.
38. Broner CW, Shenep JL, Stidham GL, Stokes DC, Fairlough D, Rehg JE, Hildner WK. Effect of antioxidants in experimental *Escherichia coli* septicemia. *Circ Shock* 1989; 29: 77-92.
39. De la Fuente M, Victor VM. Ascorbic acid and N-acetyl-cysteine improve in vitro the function of lymphocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res*. 2001; 35: 73-84.
40. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L et al; The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock*. 2003;19: 366-72.
41. Heller AR, Groth G, Heller SC, Breikreutz R, Nebe T, Quintel M, Koch T. N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit Care Med*. 2001; 29:272-6.
42. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock? *Chest*. 1998; 113: 1616-24.
43. Dornbusch HJ, Strenger V, Kerbl R, Lackner H, Schwinger W, Sovinz P, Urban C. Procalcitonin and C-reactive protein do not discriminate between febrile reaction to anti-T-lymphocyte antibodies and Gram-negative sepsis. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 32: 941-45.
44. Kepa L, Oczko-Grzesik B. Usefulness of plasma C-reactive protein (CRP) estimation in patients with bacterial sepsis. *Przegl Epidemiol*. 2001; 55: 63-7.
45. Molnar Z, Szakmany T, Koszegi T. Prophylactic N-acetyl-cysteine decreases serum CRP but not PCT levels and microalbuminuria following major abdominal surgery. A prospective, randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Intensive Care Med*. 2003; 29: 749-55.
46. Ruetten H, Thiemermann C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol*. 1997; 121: 695-704.

47. Rawson JS, Achord JL. Shock liver. *South Med J* 1985; 78: 1421-5.
48. Wang P, Ba ZF, Tait SM, Zhou M, Chaudry IH. Alterations in circulating blood volume during polymicrobial sepsis. *Circ Shock* 1993; 40: 92-98.
49. Hong KW, Kim KE, Rhim BY, Lee WS, Kim CD. Effect of rebamipide on liver damage and increased tumor necrosis factor in a rat model of endotoxin shock. *Dig Dis Sci*. 1998; 43:154-9
50. Hideki Y, Tomohiro W, Hatsue M, Kazuo E, Tsunemichi H, akio K, Ravi G, Shoichi F. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of long-evans cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. *Free Radical Biology and Med*. 2001; 30: 547-54.
51. Ali O, Ismail C, Oguz K, Leyla C, Dincer A, Ali U, Hulya O, Murat D, Ugur O. The protective effects of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock* 2003; 19: 366-72.
52. Corinne RS, Miranda A, Winkelhuyzen-janssen L, Colinda JMA, Johannes FLM van O, Tjonne Van Der B. Low-dose n-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:1283-93.