

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

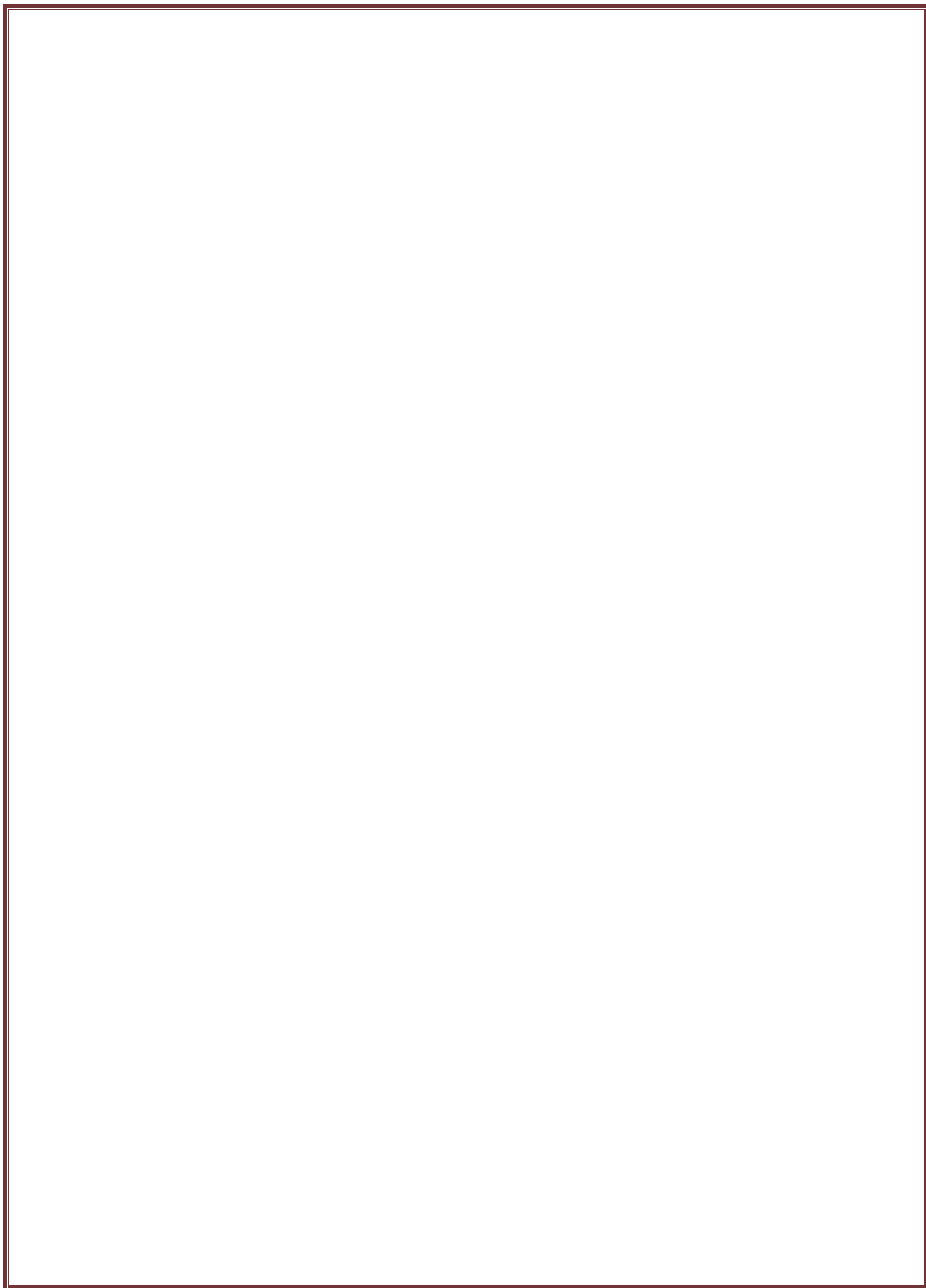
SEPTİK RATLARDA LEFLUNOMİDİN ANTİOKSİDAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Murat SÜRÜCÜ
Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Erdoğan ÖZTÜRK**

MALATYA - 2007



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SEPTİK RATLARDA LEFLUNOMİDİN ANTİOKSİDAN
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Murat SÜRÜCÜ
Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Erdoğan ÖZTÜRK**

MALATYA - 2007

İÇİNDEKİLER

1- Giriş ve Amaç	1
2- Genel Bilgiler	3
2.1. Sepsis	3
2.1.1. Tanımlar ve Tanı Kriterleri	3
2.1.2. Sepsis Evrelemesindeki Yenilikler	8
2.1.3. Epidemiyoloji	9
2.1.4. Sepsiste Prognozu Etkileyecek Faktörler	10
2.1.5. Patofizyoloji	11
2.1.6. Sepsiste NO'in Rolü	13
2.1.7. Sepsis Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar	13
2.2. Oksidan ve antioksidan sistemler	14
2.2.1. Serbest radikaller	14
2.2.2. Serbest oksijen radikallerinin çeşitleri	14
2.2.3. Serbest radikal üretim kaynakları	16
2.2.4. Serbest oksijen radikallerine karşı koruyucu sistemler	17
2.3. Leflunomid	19
2.3.1. Farmakodinamik özellikleri	20
2.3.2. Farmakokinetik özellikleri	20
2.3.3. Yan etkiler	24
2.3.4. Kullanım şekli ve dozu	24
3- Gereç ve Yöntem	25
4- Bulgular	28
5- Tartışma	32
6- Sonuç ve Öneriler	38
7- Özet	39
8- Summary	40
9- Kaynaklar	41

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sepsis, "konağın enfeksiyona karşı gösterdiği kontrolsüz inflamatuvar yanıt" olarak tanımlanır. Enfeksiyona karşı vücudun sistemik inflamatuvar yanıtı ile başlayan sepsis, ciddi sepsis, septik şok ve sonunda başlangıçtaki hasar bölgesinden uzaktaki organlarda önce işlev bozukluğuna takiben de organ yetmezliklerinin gelişmesine yol açarak hastanın kaybedilmesine neden olabilir (1,2). Sepsisin ilerlemesi organizmadaki birçok organ ve sistemi (akciğer, karaciğer, böbrek, kardiyovasküler, hematolojik, gastrointestinal, nörolojik, endokrin ve immün sistem) etkiler (3). Sepsisi tetikleyen moleküllerin başında, gram negatif hücre duvarı komponentlerinden endotoksin gelir. Endotoksinin ortaya çıkardığı jeneralize yanıt, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar mediyatörler (sitokinler, pıhtılaşma faktörleri, adezyon molekülleri, miyokardiyal deprese edici yapılar ve ısı-şok proteinleri) ile birlikte hem hücresel hem de humoral yolu kapsar (4). Genellikle inflamatuvar reaksiyonlar, sitokinler aracılığıyla başlatılır ve bu sitokinler inflamatuvar yanıtı tetikleyen uyarana yanıt olarak son organ reseptörüne bağlanır (5). İnflamasyon bölgesindeki lökosit birikimi birçok aşamayı kapsayan ardışık olaylar zinciridir. Bu kaskada, çözülmüş ve membrana bağlı faktörler ile endotel hücresi ve lökosit üzerindeki adezyon molekülleri arasındaki ilişki aracılık eder (4,6). Ağır sepsisin pek çok belirti ve bulgusundan sorumlu olan da dolaşımdaki tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) gibi inflamasyon mediatörleridir (7,8). Bunların aktifleşmesi ve progresyonu ile dokularda hasarlanma meydana gelir. Sonuç olarak sepsis seyrinde enfeksiyonun kendisinden çok, inflamatuvar sonuçları daha büyük bir sorun gibi görünmektedir (4). Leflunomid bir izoksazol derivesi olup antiinflamatuvar ve antiproliferatif özellikleri olan, hastalığı modifiye

edici bir antiromatizmal ve immünmodölatör ajandır (9). Bu özellikleri nedeniyle romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve Crohn hastalığında etkin bir biçimde kullanılmaktadır. İmmünmodölatör özelliklerinin yanı sıra TNF- α , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı da bildirilmiştir (9).

Bu çalışma ile leflunomidin oksidatif stres üzerine olumlu etkilerinin bulunması durumunda immünsüpresif, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünmodölatör etkinliği yanında antioksidan özelliğinin olduğu da kanıtlanmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEPSİS

Sepsis ve septik şok, koroner yoğun bakım dışındaki yoğun bakım ünitelerinde en sık karşılaşılan ölüm nedenidir. Konağa zarar veren infeksiyöz ya da noninfeksiyöz (iskemi, akut pankreatit, yanık, major travma, şok gibi) bir süreç başladığında, konağı hasarlanmaya karşı korumaya yönelik bir inflamatuvar yanıtı neden olur. Normal koşullarda inflamatuvar yanıt, konakta inflamasyonun zararlı etkilerini inaktive veya bloke etme yeteneğine sahip bazı karşıt endojen maddelerin (antioksidan maddeler) salınmasına neden olur. Böylece hem konağa zarar veren olaya hem de inflamatuvar yanıtı bağı olan doku hasarının gelişmesi önlenmeye çalışılır. Başlangıçta konağı korumaya yönelik olan bu inflamatuvar yanıt ardından çeşitli maddelerin salınmasına yol açarak (proteolitik enzimler, toksik oksijen radikalleri) konağa zarar verebilir. İnflamatuvar yanıt, konağın endojen yanıtının baş edemeyeceği kadar şiddetli ve yoğun ise yayılarak progresif inflamatuvar doku hasarına neden olur. Bu ilerleyici inflamatuvar yanıtın klinik sonucu ise multipl organ disfonksiyonu sendromudur (MODS) (10).

2.1.1. Tanımlar ve Tanı Kriterleri

Sepsis ve sepsis ile ilgili klinik tabloların tanımlanmasında geçmiş yıllarda bakteriyemi, septisemi, sepsis, sepsis sendromu ve septik şok gibi farklı terimler kullanılmıştır. Bu hastalığın tanımında görüş birliğinin olmaması, sepsis ile ilgili araştırmalarda, sepsis insidansı, prevalansı ve tedavi sonuçlarının karşılaştırılmasında önemli farklılıklar doğurmaktadır (11,12). “American College of Chest Physicians” ve “The Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)”in 1991 yılında yaptıkları ortak toplantıda sepsis

ile ilgili tanımlar yeniden gözden geçirilmiştir. Bu konferansta yaygın inflamasyonu tanımlayan sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) tanımı getirilmiştir. Bu tanım hastanede yatan pek çok hastada izlenen, infeksiyon dışında birçok nedene (pankreatit, yanık, travma gibi) bağlı gelişebilen, dolayısıyla spesifik olmayan bir tanımdır. Sistemik inflamatuvar cevabın bulgu ve semptomları SIRS'ın infeksiyöz ve noninfeksiyöz nedenlerini ayırt etmede yeterli değildir. Bunun yanı sıra yenidoğanlarda, postoperatif dönemde ve travma, yanık, pankreatit, nötropeni veya organ transplantasyonu yapılan hastalarda SIRS kriterleri kullanılarak infeksiyon tanısı koymak güvenilir olmayabilir. Ayrıca infeksiyonu olan bazı hastalarda sistemik cevap gelişmeyebilir. Dolayısıyla bu tanım yeterli bulunmamaktadır. Septisemi, sepsis sendromu ve dirençli şok tanımlarının kafa karıştırıcı ve nonspesifik olmalarından dolayı kullanımları önerilmemiştir (1).

Sepsis ile ilgilenen ACCP, SCCM, "American Thoracic Society (ATS)", "European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)" ve "Surgical Infection Society (SIS)" gibi bazı derneklerin destekleri ile Uluslararası Sepsis Tanımları Konferansı, Aralık 2001'de Washington'da toplanmıştır. Bu konferansta, sepsis fizyopatolojisindeki gelişmeler ve 1992 tanımları göz önünde bulundurularak, sepsis tanımı yeniden gözden geçirilmiş, sepsis tanısı için henüz herhangi bir altın standardın olmadığı, önerilerin ancak hasta başında klinisyenin karar vermesine yardımcı olacağı vurgulanmıştır (13).

2001 Uluslararası Sepsis Tanımları Konferansı önerileri aşağıda özetlenmiştir:

a) İnfeksiyon

Patojen veya potansiyel patojen mikroorganizmaların, normalde steril dokulara, sıvılara veya vücut boşluklarına invazyonu ile oluşan patolojik olaylar olarak tanımlanmıştır. Bu tanım esasında 1992 tanımı ile aynıdır ve mükemmel değildir (13).

b) Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS)

SIRS için infeksiyona bağlı olan veya olmayan nedenlerle başlayan sistemik inflamatuvar yanıt tanımı 1992 tanımında olduğu gibi aynen kabul edilmektedir. Sistemik inflamasyon belirtileri infeksiyon olmadan da, yanıklı, pankreatitli ve diğer hastalıklarda da ortaya çıkmaktadır. SIRS tanımında, 1992 önerilerinin hepsi spesifik değildir. Bu tanımlar, hastaya ait klinik tablo ile birlikte değerlendirilmelidir. Araştırmacılar, 1992 SIRS kriterlerine uyan hastalarda serumda; IL-6, adrenomedullin, soluble CD14, lökosit adezyon molekülü 1, makrofaj inflamatuvar protein 1a, ekstrasellüler fosfolipaz A₂ ve C-reaktif protein (CRP) artışının olduğunu göstermişlerdir. SIRS tanısında, klinik bulgularla beraber, serumda IL-6, prokalsitonin veya CRP bulunması kullanılabilir yorumu yapılmaktadır. Ancak henüz bu konuda yeterli klinik çalışma yoktur (13).

c) Sepsis

Klinisyenler ve araştırmacılar için, sepsis tanımı ve tanısının hemen konulması son derece önemlidir. 1992 tanımında olduğu gibi sepsis, infeksiyon ve sistemik inflamatuvar cevabın beraber bulunduğu klinik sendrom olarak tarif edilmiştir. İnfeksiyon veya sistemik inflamasyon için tanı kriterlerinin yeniden gözden geçirilmesi konusunda görüş birliği vardır. Bu kriterler hem hastayı tedavi eden klinisyen için hem de araştırmacılar için uygulanabilir olmalıdır. Ayrıca bu kriterlerin erişkin, pediatri ve yenidoğan hastaları için de uygulanabilir olması arzu edilmektedir (13).

Sepsis tanısının konulmasında kullanılabilecek kriterler arasında, hemodinamik bozukluk, arteriyel hipoksi, oligüri, koagülopati ve karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk yer almaktadır. Sepsisin tanı kriterlerini gösteren Tablo I' de yer alan bulguların hiçbirisi sepsis için spesifik değildir. Bu nedenle hekim hasta başında tabloda verilen bütün bulguları değerlendirerek ve ayırıcı tanısını yaparak sepsis tanısına gitmelidir.

d) Ağır Sepsis (Organ Fonksiyon Bozukluğu ile Beraber Sepsis)

Ağır sepsis tanısı değiştirilmeden aynen kalmış ve organ fonksiyon bozukluğu ile komplike sepsisi gösterdiği kabul edilmiştir. Organ fonksiyon bozukluğu, Marshall tarafından geliştirilen tanımlar (14) veya "Sequential Organ Failure Assessment (SOFA Skoru)" (15) kullanılarak tanımlanabilir. Erişkinlerde ağır sepsiste organ fonksiyon bozukluğuunda en fazla SOFA skoru kullanılması önerilmektedir (13).

e) Septik şok

Yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen dirençli hipotansiyon ile karakterize olan ve başka bir nedenle açıklanamayan akut dolaşım yetmezliği durumudur. Unutulmaması gereken bir durum da septik şok nedeni ile inotrop veya vazopressör uygulanan hastaların perfüzyon bozukluğu saptandığında hipotansif olmayabilecekleridir. Vasküler tonus, çocuklarda ve yeni doğanlarda daha fazla olduğu için şok hipotansiyondan çok daha önce gelişebilir. Çocuklarda hipotansiyon, dekompanze şokun geç bulgusudur (13).

İnfeksiyon

Gösterilmiş veya şüphe edilen infeksiyon ve aşağıdakilerden bazıları:

Genel Değişkenler

Ateş (vücut iç ısı >38.3 °C)

Hipotermi (vücut iç ısı <36 °C)

Kalp atım hızı > 90/dakika veya yaş için normal değer >2 SD olması

Takipne: >30/dakika olması

Mental durum değişikliği

Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte >20 mL/kg olması)

Diyabeti olmayan hastalarda hiperglisemi (plazma glukozu >110mg/dL veya 7.7 mM/L)

İnflamatuvar değişkenler

Lökositoz (beyaz küre sayısının >12.000/µL)

Lökopeni (beyaz küre sayısının <4.000/µL)

Normal beyaz küre sayısı ile birlikte >%10 olgunlaşmamış nötrofiller

Plazma CRP'sinin normal değerden >2 SD olması

Plazma prokalsitonin seviyesinin normal değer >2 SD olması

Hemodinamik değişkenler

Arteriyel hipotansiyon (sistolik kan basıncının <90 mmHg, ortalama arteriyel basıncın <70 mmHg veya sistolik kan basıncının yetişkinlerde 40 mmHg azalmış olması veya yaşa göre normal değerden <2SD olması)

Mikst venöz oksijen satürasyonu (SvO₂) >%70 olması

Kardiyak indeks >3.51 L.min⁻¹m²

Organ işlev bozukluğu değişkenleri

Arteriyel hipoksemi (PaO₂/FiO₂ <300)

Akut oligüri (idrar miktarı <0.5 mL/kg⁻¹h⁻¹ veya en az iki saat 45 ml/h)

Kreatininde ≥0.5 mg/dL artış

Koagülasyon bozuklukları (internasyonel normalizasyon oranı >1.5 veya aPTT >60 sn)

İleus (barsak seslerinin alınamaması)

Trombositopeni (trombosit sayısı <100.000/ µL)

Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin >4 mg/dL veya 70 mmol/L)

Doku perfüzyon değişkenleri

Hiperlaktatemi (>1 mmol/L)

Kapiller doluşta azalma veya deride renk değişikliği (beneklenme)

SD: Standart deviasyon.

Tablo I. Sepsisin Tanı Kriterleri- 2001 SCCM/ACCP/ATS/SIS (16)

2.1.1.1. MODS

Destekleyici girişimler olmadan organ fonksiyonunun devam ettirilmesinin mümkün olmadığı durum olarak tanımlanmıştır. Özetle SIRS'ı olan bir hastada (enfeksiyonla veya enfeksiyon olmaksızın) birden fazla vital organda fonksiyonel bozukluğun görülmesi MODS olarak adlandırılır (17).

Organ disfonksiyonları, 1991 yılındaki uzlaşma toplantısında, primer ve sekonder olarak ikiye ayrılmıştır. Primer organ disfonksiyonu (primer MODS); aspirasyon, travma veya direkt tetikleyen olay sonucu gelişen disfonksiyondur. Primer MODS olan hasta iyileşebilir veya SIRS olarak bilinen postresüsitatif hipermetabolik bir faza girebilir. SIRS gelişen hastalar ise iyileşebilir veya SIRS'a bağlı olarak, progresif, sekonder veya geç organ disfonksiyonları ile kaybedilebilir. SIRS ilerlemesi sonucu ortaya çıkan organ disfonksiyonuna ise "sekonder MODS" adı verilmiştir. Sekonder MODS, genelde uzamış bir yaşam desteği gerektiren enfeksiyon ve sepsisi takiben ortaya çıkar. Çok şiddetli ve kontrol altına alınamayan inflamatuvar yanıt mortalitenin en yüksek olduğu son basamaktır. MODS'un ilerlemesi ise multipl organ yetmezliği (MOF) ile hastanın kaybedilmesine yol açar.

MODS bir hastalık değil bir sendromdur. Bu nedenle kronik organ yetmezlikleri MODS kapsamına alınmamalıdır. MODS'da disfonksiyon gelişen başlıca organlar ve bu disfonksiyonların yol açtığı klinik sendromlar Tablo II'de belirtilmiştir (18,19).

Disfonksiyon gelişen organ/sistem	Klinik sendrom
Akciğerler	Akut Respiratuvar Yetmezlik Sendromu (ARDS)
Böbrekler	Akut Tübüler Nekroz (ATN)
Kardiyovasküler Sistem	Hiperdinamik hipotansiyon
Santral Sinir Sistemi	Metabolik ensefalopati
Periferik Sinir Sistemi	Polinöropati
Koagülasyon Sistemi	Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DİK)
Gastrointestinal Sistem	Gastroparezi, ileus, kolesistit
Karaciğer	Akut noninfeksiyöz hepatit
Adrenal glandlar	Akut adrenal yetmezlik
İskelet kası	Rabdomiyoliz

Tablo II. Sepsiste gelişen organ disfonksiyonları

2.1.2. Sepsis Evrelemedeki Yenilikler

Sepsis, ağır sepsis, septik şok ile ilgili tanımlar, klinik tablonun tam olarak karakterizasyonu ve hastanın evrelendirilmesi için yeterli değildir. Klinikte ortaya çıkması muhtemel olan riskleri ve tedaviye vereceği potansiyel cevabı tahmin edebileceğimiz bir evreleme sistemine ihtiyaç vardır. Bu tip evreleme sistemleri klinikte sıkça kullanılır. Bu evreleme sistemlerinden özellikle onkolojide kullanılan sistem en iyi geliştirilmiş ve hastanın klinik durumunu en açık anlatan TNM sistemidir. “T” primer malign tümörün kendisi, “N” reyonel lenf nodlarına metastazı ve “M” uzak metastazı gösterir. Bu TNM evreleme sisteminden esinlenerek 2001 yılında SCCM/ACCP ekibi “PIRO” olarak adlandırılan, sepsis için bir sınıflandırma tanımlamışlardır. “P” hastanın yatkınlık faktörü, “I” infeksiyon ve sepsis durumunda etkenin yapısı ve etkilediği alanın genişliği, “R” konakçının verdiği yanıtın yapısı ve büyüklüğü, “O” eşlik eden organ disfonksiyonunun derecesidir (13).

a) Yatkınlık (Predispozisyon)

Sepsis mortalitesinde genetik faktörlerin oldukça büyük rol oynadığı bilinmektedir. Sepsis tedavisine verilen yanıtın farklılığı ve klinik tablonun her hastada farklı ortaya çıkmasına neden olan genetik çeşitliliğin yanı sıra başka faktörler de vardır (13).

b) İnfeksiyon (Infection)

Prognoz açısından infeksiyonun tipi, bölgesi ve yayılımı önemlidir. Örneğin, bilateral bronkopnömoni, lokal pnömoniden, generalize fekal peritonitten ve appendisitten daha yoğun olaylar dizisine neden olur. Ayrıca gram (+) bir etkenle gram (-) etkene karşı gösterilen endojen konak yanıtının da farklı olduğu açıkça bilinmektedir. Gram (-) enfeksiyonlarda veya endotoksemide antikor tedavisinin faydalı olabileceği oysa gram (+) etkenlerde böyle bir tedavinin zararlı olabileceği bilinen bir gerçektir (13).

c) Yanıt (Response)

Sepsis tedavisi için gündemdeki hedef, infeksiyona neden olan organizma değil konakçının yanıtıdır. Konakçının yanıtının özelliklerini belirlemek kolay değildir. Prokalsitonin, IL-6 ve diğer pek çok mediatörün seviyesi yanıtın göstergeleridir. Yeni bir mediatör tanımlandığında, epidemiyolojik çalışmalar yaparak bu mediyatörün evrelemede faydalı olup olmayacağı araştırılmalıdır. Sepsis evrelendirilmesinde kullanılacak biyolojik göstergeler, uygulanacak tedavinin tipine göre değişiklik gösterir. Örneğin; tedavide aktive protein-C (APC) kullanılması planlanıyorsa koagülasyon sistemi bozukluğu ile ilgili göstergelerin bakılması daha faydalı olacaktır veya hidrokortizon ile ilgili bir tedavi düşünülüyorsa adrenal disfonksiyonla ilgili göstergeler daha değerlidir (13).

d) Organ disfonksiyonu (organ dysfunction)

TNM sisteminde olduğu gibi, sepsiste organ disfonksiyonu kanserli hastalardaki uzak metastaz varlığına benzerdir. Sepsis prognozunda organ disfonksiyonunun varlığı önemlidir. Şu anki bilgilerimize göre, organ disfonksiyonunun olmadığı durumlarda sepsis kaskadının erken mediatörü olan TNF'nin nötralizasyonu daha iyi sonuç verir (13).

PIRO sistemi, yeni ortaya atılan buluşlar ile daha da geliştirilmesi ve üzerinde daha çok çalışılması gereken bir sistemdir. Daha ayrıntılı bir hale getirildiği zaman sepsiste prognoz ve uygulanacak tedavi metodu hakkında daha fazla veriye ulaşılabilecek ve klinisyenler arasında ortak bir tanımlama oluşmasına imkan verecektir.

2.1.3. Epidemiyoloji

Ülkemizle ilgili genel bir insidans ve ölüm oranı vermek mümkün olmasa da hastanede yatan hastalarda, özellikle yoğun bakım ünitelerinde, sepsis önemli bir infeksiyon problemidir. Yoğun bakımda yatan hastalardaki ölüm nedenlerinin önemli bir kısmı sepsis kaynaklıdır. Son yıllarda hastalıkların ileri evrelerinde agresif tedavi uygulamalarının ve invaziv girişimlerin (santral venöz kateterizasyon gibi) artması nedeniyle sepsis insidansı ve mortalitesi artmaktadır. Sepsis, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ölüm nedenleri arasında 13. sırada, koroner yoğun bakım ünitesi (KYBÜ) dışındaki yoğun bakım ünitelerinde ise ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (20). Amerika Birleşik Devletleri'nde Hastalık Kontrol Merkezi'nce yapılan bir çalışmada septisemi insidansı 1979 yılında 100.000 hastada 73.6 iken, 1987 yılında 100.000 hastada 175.9'a yükselmiştir (21). Amerika ve Avrupa'da sepsis insidansı, günümüzde yapılan çalışmalara göre tüm hastane ve yoğun bakım ünitelerine başvuran hastaların % 2-11'ini oluşturmaktadır. Ciddi sepsiste mortalitenin %50'ye yakın olduğu bildirilmiştir (22). Quartin ve arkadaşları ise, 1984-1985 yılları arasındaki 1505 sepsisli hastadaki mortaliteyi % 57 olarak bildirmiştir (23).

Son yirmi yıldır yapılan klinik çalışmalar sonucu elde edilen verilere göre sepsis gelişen hastalarla ilgili özellikler şöyle sıralanabilir:

- ✓ Orta yaş ve yaşlı hasta grubunda sepsise daha sık rastlanır.
- ✓ Konakçının immün sistemini bozan durumlarda (neoplazmlar, renal veya hepatik yetmezlik, AIDS) sepsis yaygındır.
- ✓ Septik hastalarda görülen bu yandaş hastalıklar, sepsisten bağımsız olarak % 50 morbidite riski taşırlar.
- ✓ Ağır sepsis/SIRS tanısı almış hastaların %10 veya daha fazlasında infeksiyonun primer bölgesi tanımlanamaz (24).

2.1.4. Sepsiste Prognozu Etkileyebilecek Faktörler

Sepsisin şiddeti ile klinik karakteristiklerini etkileyen faktörler, infeksiyonun yeri ve tipi, infeksiyona konakçının verdiği yanıt, antimikrobiyal tedavinin tipi, başlama zamanı ve şok gelişmesidir.

a) İnfeksiyon bölgesi

Sepsise neden olan infeksiyonun geliştiği bölge, iyileşme üzerine etkili bir faktördür. Son yıllarda yapılan çalışmalar, pnömoni ve intraabdominal infeksiyonların üriner sistem infeksiyonlarından daha fazla mortalite riski taşıdığını göstermiştir. Sekonder nazokomiyal bakteriyemili hastalardaki mortalite riski, kateterle ilişkili veya primer bakteriyemili hastalardan daha yüksektir (25).

b) İnfeksiyona anormal yanıt

Ateş gelişimindeki yetersizlik veya hipotermi, sepsisli hastalarda mortalite insidansını artırır. Bir çalışmada vücut ısısı 35 °C altındaki hastalarda mortalite %17, sağkalım oranı %5 olarak bulunmuştur. Lökopeni (lökosit sayısı 4000/ µL düşük), sağkalım oranını etkileyen faktörlerdendir (25).

c) Kan kültürü pozitifliği

Ağır sepsis hastalarının yaklaşık %50'sinde teşhis sırasında bakteriyemi vardır. Sepsis iyileşmesinde kan kültürü pozitifliğinin önemi yoktur. Asıl önemli olan sepsisin şiddetidir (25).

d) Etken organizma

Mikroorganizmanın tipi, sepsisin yapısı ve şiddeti ile ilişkili olabilir. Gram (-) ve gram (+) mikroorganizmaların neden olduğu sepsiste iyileşme insidansı benzer olmasına rağmen nazokomiyal kaynaklı infeksiyonların prognozunun toplum kaynaklı infeksiyonlardan daha kötü olduğu saptanmıştır (25).

e) Antimikrobiyal tedavi

Sepsis iyileşmesi üzerine antimikrobiyal tedavinin etkisi kesinlik kazanmamıştır. Bazı çalışmalarda uygun antibiyotik tedavisinin bakteriyemik sepsis prognozu üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir (25).

f) Şok ve organ disfonksiyonu

Sepsis vakalarının yaklaşık %40'ında şok görülmektedir. Şok görülmesi prognozu kötüleştirir (25).

e) Altta yatan patoloji ve hastanın kronik sağlık durumu

Kırk yaş üzeri olmak, AIDS, karaciğer yetmezliği, hematolojik maligniteler, metastatik kanser veya immünsüpresyon gibi ek patolojilerin bulunduğu durumlarda mortalite riski artar (25).

f) Hastanın konumu ve sepsisin geliştiği dönem

Hastanın yoğun bakıma nereden geldiği prognoz açısından önemli bir faktördür. Acilden kabul edilen hastalarda prognozun, hastanenin diğer servislerinden veya başka bir yoğun bakım ünitesinden kabul edilen hastalara göre daha iyi olduğu saptanmıştır (25).

2.1.5. Patofizyoloji

Sepsiste ilk basamak mononükleer lökositte endotoksin bağlanmasıdır. Bu bağlanma nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ve çeşitli sitokinlerin, özellikle IL-1'in salgılanmasına neden olur (26). Erken proinflatuar yanıtta ilk rol oynayan primer hücreler ise nötrofillerdir. Bu hücreler, IL-1, TNF-α, kompleman fragmanları (örneğin C_{5a}) veya monosit, makrofaj gibi hücrelerden, diğer nötrofillerden, trombositlerden, lökotrienlerden (örneğin LT-B₄) salgılanan ürünler ve PAF (trombosit aktive edici faktör), histamin, interferon (IFN-γ), granülosit stimüle edici faktör, IL-8 ve formil methionyl phenil alanin ile aktive olurlar. Aktive olan nötrofiller hızla lokal inflamasyon bölgesine göç ederek yerleşirler. Bu nötrofiller, fagositoz ve degranülasyonla patojenleri yok etmeye çalışır ancak bu sırada lokal doku hasarına yol açabilir. Nötrofilin bakteri öldürmesindeki asıl etki mekanizması içindeki primer ve sekonder granüllerdeki miyeloperoksidaz, lizozim, elastaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimini salgılamasıdır. NADPH oksidaz, bir reaktif oksijen radikali olan superoksidi üreterek mikroorganizmaya direkt öldürücü etki oluşturur. Bu holoenzim, moleküler oksijen ve serbest elektronlardan süperoksid üretimini katalizler. Oluşan superoksidin organizmaya zarar vermemesi için süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen perokside dönüştürülür. Miyeloperoksidaz da süperoksidi güçlü bakterisidal etkili asidik yapıda ajanlara çevirir. Süperoksid üretim hızı ve nötrofillerden salınan reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) miktarı NADPH oksidaz sistemi tarafından regüle edilir. Uyarılan nötrofillerden fazla miktarda salgılanan toksik oksijen metabolitleri, multipl organ sistemlerinde disfonksiyona yol açan otoimmün doku hasarına neden olur. Aynı zamanda aktive nötrofiller pozitif feedback ile IL-1, TNF-α, IL-6, IL-8, makrofaj koloni stimüle eden faktör, granülosit koloni stimüle eden faktör ve plazminojen aktivatör salınımını artırır (27).

Komplemanın dolaylı ve dolaysız proinflatuar etkileri vardır. Örneğin C_{5a} dolaşımdaki nötrofiller için temel kemotaktik faktördür ve endotele adezyonlarında rol alır.

Nötrofillerden reaktif oksijen türlerinin veya proteolitik enzimlerin ve lökotrienlerin salıverilmesine yol açmaktadırlar.

Sitokinler, sepsis patofizyolojisinde anahtar rol oynayan başka sistemleri de aktive eder. Normalde nötrofiller, vasküler sistemde endotelle fazla temas etmeden dolaşırlar. İnflamatuar bir uyarı geliştiğinde nötrofiller inflamasyon bölgesine göç eder, endotelyal duvarda kümeleşir ve vasküler endotelyal hücrelere yapışır. Nötrofilin vasküler endotele adhezyonunu sağlayan integrin ve selektin gibi proteinler vardır. İntegrin, lökositlerin tüm yüzeyinde lokalize olur ve endotelyal hücre yüzeyine protein (intrasellüler adezyon molekülü ICAM-1 ve ICAM-2) bağlanmasını sağlar. Sitokin salınımını takiben ICAM-1 üretimi artar. Selektin, lökositlerde ve endotelyal hücrelerde bulunur ve aktive olduklarında nötrofil ve trombosit adhezyonunu sağlar. Nötrofillerin lokal adezyonu, konak savunmasının bir parçası olmasına rağmen ağır sepsiste nötrofillerin sistemik aktivasyonu ve adezyonuna neden olur. Ayrıca hasar yaratan oksidanların, endotelyal hasarı ve mikrovasküler permeability artıran fosfolipaz ve proteazların salınımını artırır. Organ sistem disfonksiyonuna neden olan mekanizmalardan biri de budur (28).

Sistemik IL-1 ve TNF- α miyokard kontraktilesini azaltır, düz kas damarlarında dilatasyona neden olur ve vasküler permeability artırır. Dolaşım sisteminde oluşan kollaps ve geniş dağılımlı mikrotrombozis, sepsiste MODS'a neden olur. MODS'un nedeni birçok faktöre bağlı olsa da sepsis sendromunda ve organ yetmezliğinde asıl patoloji, özellikle makrofajlardan sitokin salınımıdır. Son çalışmalara göre hem proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6 ve TNF- α) hem de antiinflamatuvar sitokinler (IL-1ra, IL-10) MODS patogenezinde önemli rol oynar (29).

İnfeksiyon, travma veya yanıklı bazı hastalarda orta şiddette sepsis veya SIRS ve minör organ disfonksiyonları hızlı bir şekilde düzelebilir. Bazılarında masif sistemik inflamatuvar reaksiyon gelişir ve şok nedeni ile erkenden ölür. Diğer bir grupta ise başlangıç daha hafif olur ancak sonradan MODS ve ölüm gelişir. Başlangıçtan sonra düzelmeyen bu grup CARS (kompanze antiinflamatuvar yanıt sendromu) olarak kabul edilir. MODS'a neden olan sepsisin beş evresi görülmektedir. Birinci evre, lokal inflamasyonun görüldüğü evredir. İkinci evre, klinik bulgunun ve semptomların az olduğu inflamatuvar mediatörlerin salındığı evredir. Üçüncü evrede sistemik reaksiyon belirgin hale gelir; sepsis, SIRS veya organ disfonksiyonu klinik belirti verir. Bu evre birçok tedavinin uygulandığı ve denendiği evredir. Dördüncü evre, uygunsuz immünsüpresyon ve yeni eklenen enfeksiyona aşırı CARS reaksiyonu ile karakterizedir. Beşinci evre ise artık denge durumundan çıkmış MODS ile birlikte SIRS veya CARS reaksiyonunun görüldüğü evredir (30).

2.1.6. Sepsiste Nitrik Oksitin (NO) Rolü:

Yarı esansiyel amino asit olan L-argininden NOS aracılığıyla L-sitrülin ve NO oluşur. NO stabil, suda çözünebilir, renksiz bir gazdır. Solüsyonda yarı ömrü 0.1-10 saniyedir. Kardiyovasküler, nöronal ve immün sistemde belirgin etkileri vardır.

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenir. Bilinen üç tip NOS vardır. Nöronal NOS (nNOS), endotelyal NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). nNOS ve eNOS birlikte constitutive NOS (cNOS) adını alır. NOS, NO ile birlikte süperoksit üretimini de sağlar. L-arginin yokluğunda süperoksit üretimi artar, varlığında ise inhibe olur (31).

İnflamasyon sırasında NO önemli bir rol oynar. Vazodilatasyon, vasküler permeabilite değişimi, ekstravazasyon, lökosit migrasyonu ve aktivasyonundan sorumludur. Makrofajlar tarafından immünolojik uyarılarla sentezlenen NO, konak savunmasının en önemli parçalarından biridir. Aktive makrofajlardan iNOS aracılığıyla sentezlenen NO, bakteri, protozoa ve tümör hücrelerine karşı gelişen nonspesifik sitotoksisiteye neden olur. Bu sitotoksik aktivitenin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca NO, mitokondriyal solunum zincirinde demir sülfidril grubunu bağlayarak hücre ölümüne neden olur. NO, lenfositlere özellikle T-helper hücreleri üzerine etkisi ile immüniteden de sorumludur (31).

2.1.7. Sepsis Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar:

2.1.7.1. Aktive Protein C (APC)

Sepsis tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış ilk antiinflamatuvar ajan bir antikoagülan olan rekombinant human aktive protein C'dir. APC, faktör Va ve VIIa'yı inaktive ederek trombin oluşumunu engeller. Bunun sonucunda trombosit aktivasyonu, nötrofil salınımı ve mast hücre yıkımı inhibe olur ve inflamasyon azalır. APC, direkt antiinflamatuvar etkisini monositler tarafından üretilen sitokin salınımını ve hücre adezyonunu engelleyerek gösterir (2).

2.1.7.2. Hiperglisemiye Karşı İnsülin Tedavisi:

Van der Berghe ve arkadaşları yoğun insülin tedavisiyle kan glukoz düzeyini 80-110 mg/dl (4,4-6,1 mmol/l) arasında tuttıkları kritik yoğun bakım hastalarında, geleneksel insülin tedavisiyle kan glukoz düzeyini 180-200 mg/dL (10-11,1 mmol/L) arasında sürdürdükleri hastalardan daha düşük morbidite ve mortaliteyle sonuçlandığını göstermişlerdir. Yoğun insülin tedavisi, sepsis epizodlarının sıklığını %46 düşürmüştür (32).

2.1.7.3. Volüm Resüsitasyonu

Septik şok ve ciddi sepsis hastalarında kardiyak preload, afterload ve kontraktiletiyi artırmak için uygulanan erken agresif sıvı tedavisi sağ kalımı artırır (2).

2.1.7.4. Kortikosteroidler

Sepsisli hastalarda kortikosteroidlerin kısa süreli ve yüksek dozlarda kullanımı sekonder infeksiyonların sıklığının artmasına ve mortalitede artışa neden olmuştur (33). Ancak yüksek doz kortikosteroidlerin negatif etkilerine rağmen bir çalışmada fizyolojik dozlarda kullanılan kortikosteroidlerin, kritik hastalarda, vasopressör desteği gerektiren şokta ve uzamış mekanik ventilasyondaki septik hastalarda faydalı olabileceği belirtilmiştir (34).

2.1.7.5. İmmün Stimülanlar:

IL-12'nin kendisi güçlü bir immün stimülan ve Th1 indükleyicisidir ve septik mortaliteyi azaltmada yardımcı olduğu bildirilmiştir (36).

2.2. Oksidan Ve Antioksidan Sistemler

2.2.1. Serbest Radikaller

Bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren maddeye serbest radikal denir. Bir veya birden fazla çiftlenmiş elektron bulunması o maddenin magnetik bir alana çekilmesine neden olur ve bazen o maddenin son derece reaktif olmasına yol açar (37). Oksijen; travma, ödem, oklüzyon gibi dokuda beslenme ve dolaşım bozukluğu meydana getirebilen durumlarda doku tarafından üretilen bazı metabolitlerle reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. Bu serbest oksijen radikalleri, dokuda daha fazla hasar meydana getirebilmektedir (36).

Serbest radikallerin hücrel hasar yaptığına dair bilinen en iyi örnekler (36,37), pulmoner oksijen toksisitesi, post iskemik reperfüzyon hasarı, inflamatuvar olaylar, radyasyon hasarı, bir çok kimyasalın toksik etki göstermesi, Alzheimer hastalığı, diyabetes mellitus (DM), ateroskleroz, yaşlanma, karsinogenezis.

2.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Çeşitleri

2.2.2.1. Oksijen Türevi Serbest Radikaller

a) Süperoksit Radikali (O_2^-)

Moleküler oksijene fazladan bir elektron bağlanması, onu redükleyerek süperoksit serbest radikal anyonunu meydana getirir. Zayıf bir oksidan olarak O_2^- , kendi başına önemli bir hücre hasarı oluşturmaz. Milisaniyelik bir yarı ömürle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. O_2^- , oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve SOD enzimi buna karşı organizmayı korur. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması, geçiş metal iyonlarını redüklemesi ve NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmalarıdır (38,39,40).

b) Hidroksil Radikali (OH⁻)

OH⁻ biyomoleküler sistemlerde bulunan en güçlü radikaldır. Hidrojen peroksitin geçiş metallere iyonları varlığında parçalanmasıyla oluşur. Anlatılan reaksiyon Fe⁺⁺ katalizli Haber-Weiss (fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH + OH + Fe^{3+}$). Hidroksil radikali, hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen reaktivitesi yüksek olan bir ajandır. Fakat başlıca etkileri; lipitler, proteinler, sitokromlar ve nükleik asitler üzerindedir (37,38,39).

c) Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

O₂⁻'nin dismutasyon reaksiyonu ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) veya direkt olarak oksijenin indirgenmesiyle ($O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) meydana gelir. H₂O₂, son derece güçlü bir oksitleyici ajan olmasına karşın yavaş reaksiyon verir. Protein tiyollerini oksitleme ve DNA'da zincir kırılmaları meydana getirerek hasar oluşturur. Asıl önemi, geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. H₂O₂ ile oluşturulan hasar, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri aracılığı ile önlenir (37,38,39,41).

d) Hipokloröz Asit (HOCl)

Aslında bir radikal olmamasına rağmen SOR içinde yer almaktadır. HOCl, fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli rol oynar. Aktive edilen monositler, nötrofiller, eozinofiller ve tüm makrofajlar O₂ üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde çok önemlidir. Özellikle nötrofiller içerdikleri miyeloperoksidaz enzimi ile O₂'nin dismutasyonu sonucu oluşan H₂O₂ molekülünü, klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür. $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^-$ (42).

e) Singlet Oksijen (singlet O₂)

Oksijen molekülünün daha reaktif türü olan singlet O₂'ler moleküler oksijenin enerji almasıyla meydana gelirler. Bunların delta ve sigma olmak üzere iki tipi mevcuttur. Sigma tipi daha reaktif olduğu için hızla delta tipine dönüşür. Bu yüzden biyolojik sistemlerde delta tipinden bahsedilir (43).

2.2.2.2. Oksijen Türevi Olmayan Serbest Radikaller

a) Nitrik Oksit (NO)

NO, bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftlenmemiş elektron vererek birleşmesinden oluşmuştur (41). Bir serbest radikal olan NO, kolaylıkla biyokimyasal reaksiyonlara giren ve biyolojik membranları hızla geçebilen çok kısa ömürlü (6-10 saniye etki gösterir) bir gazdır. Oksijen ve su tarafından nitrat ve nitritlere dönüştürülür veya süperoksit ile birleşerek peroksiti oluşturur. NOS'lar başlıca, yapısal (constitutively) NOS (cNOS) ve uyarılabilen

(inducible) NOS (iNOS) olarak iki gruba ayrılır. cNOS normalde hücrede yapısal olarak sentezlenir ve başlıca kan basıncının düzenlenmesinden ve nörotransmisyonundan sorumludur. Oysa iNOS lipopolisakkarid ve interferon- γ ile indüklenmekte, çok yüksek ve toksik miktarda NO sentezini katalizlemektedir. cNOS başlıca endotelial hücrelerde ve nöronlarda bulunur, kalsiyum/kalmodülün ile aktive edilir. iNOS ise makrofajlarda ve damar düz kaslarında bulunur, kalsiyum/kalmodülinden bağımsızdır (44).

2.2.3. Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Normal fizyolojik süreçte SOR üretimi ve yıkımı arasında bir denge vardır. İskemi yaratan olaylarda (ödem, damar hasarı, damar oklüzyonu) SOR'ların üretimi artmaktadır (45).

a) Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri

Süperoksit radikalinin in vivo en önemli kaynağı bir çok aerobik hücrelerde mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki elektron transport zinciridir. Mitokondrideki elektron taşıyıcılar büyük oranda redüklendiğinde elektron akımının %2'si oksijenin tek bir elektronla redüksiyonuna yol açar; bu da süperoksit meydana getirir. Bu durum, solunum zincirinin nispeten redükte duruma geçtiği fokal ve global iskemilerde oluşmaktadır (46).

b) Ksantin Oksidaz (XO) Aktivasyonu

XO sistemi, dokuların beslenme bozukluğundaki en önemli SOR üretim kaynaklarından biri olarak kabul edilir. Hipoksi durumunda XD, XO'ya dönüşür. Herhangi bir nedenle oluşmuş doku iskemisinde ATP ve adenin nükleotidlerinin yıkımı ile 10 dakika içinde hipoksantin birikir (47). Oluşan hipoksantin de XO tarafından metabolize edilir. Bunlardan XDH, elektronları NAD'ye transfer ederken, XO akseptör olarak oksijeni seçer ve süperoksit oluşturur. XO'nun çoğu endotel hücrelerinde bulunmakla birlikte salgılanan XO'nun kan dolaşımıyla vücudun her tarafına dağıldığı gösterilmiştir (48).

c) Fenton Reaksiyonu

Beyinde bulunan demirin çoğu HEM enzimlerindedir veya ferritine bağlıdır. Muhtemelen iskemik alandaki düşük pH veya Fe^{+3} 'ün süperoksite bağlı redüksiyonu ile demir bu proteinden ayrılır ve serbestleşmiş demir üç katına çıkar (33). Serbest demirdeki artış demirin rol aldığı Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu ile OH radikali üretimini artırmaktadır (41).

d) Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum başlıca sitokrom p450 olarak bilinen sitokromları içerir. Bunlar moleküler oksijeni kullanarak bir çok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu sistem moleküllere bir elektron

ilavesiyle (indirgenme olayı; karbon tetraklorür ve halotanda olduğu gibi) veya molekülden bir elektron çıkararak (oksidasyon olayı) serbest radikal oluşturur (49).

e) Redoks Döngüsü

Bu reaksiyonlar sitokrom p450 gerektirmez. Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menandion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, adriamisin, bleomisin ve furosemid gibi bileşikler ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikal tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve sonuçta O_2^- oluşur (42).

f) Araşidonik Asit Metabolizması

Doku iskemisine bağlı olarak ATP'nin azalması sonucu hücre içi ile dışı arasında elektrolit dengesini sağlayan kanalların yapısı bozulur. Sonuçta hücre membranından içeriye Ca^{++} iyonu girerek inaktif litik enzimleri aktive eder (fosfolipaz A₂ ile protein kinazınki gibi) ve hücre membranındaki fosfolipidlerin parçalanmasıyla başta araşidonik asit olmak üzere yağ asitleri birikimine yol açar. Biriken araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu ile serbest radikal ara ürünler O_2^- meydana gelmektedir (50).

g) Nötrofil Akümüasyonu ve Aktivasyonu

Travma sonrası dokuda oluşan damar hasarı sonucunda nötrofiller damar endoteline yapışarak bir miktar parankime sızarlar. Nötrofillerin membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi, çevreden sağlanan moleküler oksijeni O_2^- 'e dönüştürür. Nötrofillerde oluşan O_2^- 'den, daha sonra süperoksit dismutaz (SOD) etkisiyle H_2O_2 oluşturulur. Miyeloperoksidaz varlığında H_2O_2 de HOCl'e dönüşür (50).

h) Monoamin Akümüasyonu

Sıçanlarda 15 dakika süren global iskemiden beş dakika sonra biriken katekolaminlerden monoaminooksidaz (MAO) aracılığı ile H_2O_2 üretildiği gösterilmiştir. Fakat MAO'nun bloke edilmesi hasarı azaltmamıştır. Bu durum erken H_2O_2 üretiminin hasar meydana getirmedeğini göstermektedir (50).

2.2.4. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Koruyucu Sistemler

Hücreleri oksidatif streslere karşı koruyan antioksidan sistem, enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılır (50):

Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler: SOD, CAT, GSH-Px ve selenyum bağımsız GSH-Px olan glutatyon S-transferazdır (GST). Ayrıca glutatyon redüktaz (GSHrd) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenazda (G6PD) bu sistem içinde bulunmaktadır (50).

Nonenzimatik sistemler: Glutatyon, N-asetil sistein, vitamin C, A, E, metalloprotein ve tiyoller gibi protein olmayan sülfidridlerdir (50).

2.2.4.1. Enzimatik Olan Antioksidan Sistemler

a) SOD

Bakır (Cu)-çinko (Zn) içeren, mangan (Mn) içeren ve demir (Fe) içeren alt tipleri vardır. Cu-Zn SOD enzimi O_2^- detoksifikasyonunda anahtar bir enzimdir. O_2^- 'i H_2O_2 'e dönüştürür (41,50).

b) Katalaz (KAT)

KAT, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. biyolojik sistemler için zararlı olan H_2O_2 aynı zamanda HO^- oluşumunu artırmaktadır. H_2O_2 , KAT tarafından su ve oksijene yıkılır (50).

c) Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Aşırı H_2O_2 varlığında indirgenmiş (redükte) glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu katalize eder ve bu arada H_2O_2 de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur (51). ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$)

2.2.4.2. Non Enzimatik Antioksidan Sistemler

a) GSH

HO^- ve singlet O_2 temizleyicisidir. Bir çok hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalarak inaktif olmuş bazı enzimleri rejenere edebilir. GSH eksikliği hayvan hücrelerinde hemoliz gibi ciddi sonuçlar doğurabilir (41,50).

b) C Vitamini (Askorbik Asit)

Kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Güçlü indirgeyici özelliğinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. O_2^- ve HO^- ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C Vitaminin bir diğer özelliği de antioksidan etkisinin yanı sıra oksidan etki göstermesidir. C Vitamini, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen O_2^- dışındaki tek hücrel ajandır (51).

c) E Vitamini

α , β , γ ve δ olarak dört tokoferolün karışımıdır. α -tokoferol, doğada en fazla bulunan ve biyolojik etkisi en fazla olan tokoferoldür. Hücre membranındaki fosfolipitlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma elemanıdır. Bir molekül E vitamini 100 molekül yağ asiti peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, O_2^- , HO^- , singlet O_2 , lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri temizler. α -tokoferol, etanol, karbon tetraklorür, dikuat, parasetamol, kalsiyum deşarjı ve diğer uyarıcılarla oluşan hepatosit peroksidasyonunu inhibe eder.

d) Karotenoidler

A vitamininin ön maddesi olan β -karoten, bitkilerdeki kloroplast membranının bir bileşenidir. Son derece güçlü singlet O_2^- temizleyicisi olup ayrıca HO^- , peroksit ve alkol radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir (50).

e) Ürik Asit

Singlet O_2 , peroksit radikalleri (RO_2), HO^- , ozon, ve $HOCl$ için güçlü bir temizleyicidir ve in vivo antioksidan olarak kabul edilmektedir (50).

f) Desferoksamin (DFO)

Bu şelatör ajan başlıca demir için spesifiktir. Demir bağımlı H_2O_2 'den HO^- oluşumunu inhibe eder. Peroksit radikalleri için de iyi bir temizleyicidir. Kalp, deri, barsak ve böbrekte iskemi sonrası reoksijenasyon hasarını oluşturan HO^- 'ini temizleyerek önlemektedir (41).

g) Melatonin

HO^- temizleyen güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen en potent antioksidandır. Lipofilik bir madde olduğu için kan-beyin bariyeri de dahil bir çok kompartmana girerek geniş bir antioksidan özellik gösterir, bu diğer antioksidanlara karşı bir üstünlüktür (50).

h) Diğerleri

- Sistein,
- Albümin,
- Serüloplazmin,
- Haptoglobülinler,
- Transferrin,
- Laktoferrin,
- Bilirubin,
- Ferritin,
- Mannitol.

2.3. LEFLUNOMİD

Leflunomid, antiinflamatuvar, antiproliferatif, immüsupresif etkileri olan bir ilaçtır. Hücre içinde aktif metaboliti olan A771726'ya dönüştürülür. Leflunomidin etkileri bu aktif metaboliti ile oluşturulur (52).

A771726'nın insan dihidroorotat dehidrogenaz (DHODH) enzimini inhibe ederek antiproliferatif etkisi olduğunu göstermektedir ki bu enzim pirimidin sentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir (53).

2.3.1. Farmakodinamik özellikleri:

Leflunomid, hastalığı modifiye edici bir antiromatizmal ajandır. Leflunomid, dihidroorotat dehidrogenaz enzimini (novo pirimidin sentezinde yer alan bir enzim) inhibe eden bir izoksazol immün modülatör ajandır (54).

2.3.2. Farmakokinetik özellikleri:

Leflunomid, barsak duvarında ve karaciğerde ilk geçiş metabolizmasıyla (halka açılması) hızla aktif metaboliti olan A771726'ya dönüşür. Bu metabolit, esas olarak leflunomidin bütün in vivo aktivitesinden sorumludur.

A771726, insan dihidroorotat dehidrogenaz (DHODH) enzimini inhibe eder ve antiproliferatif etki gösterir (54).

a) Absorbsiyon

Leflunomid, tokluk ve açlık durumlarındaki absorpsiyon derecesi benzer olduğundan yemeklerle birlikte alınabilir.

Dozun yaklaşık olarak en az %82-95'i absorbe edilir. A771726'nın doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşması için geçen süre çok değişkendir; doruk plazma düzeyleri, tek uygulamadan sonra 1 saat ile 24 saat arasında elde edilir (54).

b) Dağılım

A771726 yüksek oranda albümine bağlanır. A771726'nın bağlanmamış fraksiyonu yaklaşık %0.62'dir. Terapötik konsantrasyon sınırında A771726'nın bağlanması lineerdir. A771726'nın yüksek proteine bağlanma oranına bağlı olarak görünürdeki dağılım hacmi düşüktür (yaklaşık 11 L) (54).

c) Metabolizma

Leflunomid, bir primer (A771726) ve TFMA (4- trifluorometilalanin) dahil olmak üzere birçok minör metabolite dönüşür. Leflunomidin A771726'ya metabolik transformasyonu ve bunu izleyen A771726 metabolizması tek bir enzimle kontrol edilmemektedir ve mikrozomal ve sitozolik hücresel fraksiyonlarda olduğu gösterilmiştir. Simetid (non-spesifik sitokrom p450 inhibitörü) ve rifampisin (non-spesifik sitokrom p450 indükleyicisi) ile yapılan etkileşim araştırmaları in vivo CYP enzimlerinin leflunomid metabolizmasıyla ancak küçük bir oranda ilişkili olduğunu göstermektedir (54).

d) Eliminasyon

A771726'nın eliminasyonu yavaş ve görünürdeki klirensin yaklaşık 31 mL/saat olmasıyla karakterizedir. Hastalardaki eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2 haftadır. Radyoaktif işaretli leflunomid dozunun uygulanmasından sonra, radyoaktivite muhtemelen biliyer eliminasyonla feçes ve idrarla eşit olarak atılmıştır. İnsanlarda, oral süspansiyon formunda aktive kömür tozu veya kolestiramin uygulamasının, A771726 eliminasyon hızında hızlı ve anlamlı bir artışa ve plazma konsantrasyonlarında düşüğe yol açtığı gösterilmiştir.

Böbrek yetmezliği olan hastalarda farmakokinetik parametreler sağlıklı gönüllülerdeki değerlerle uyumlu bulunmuştur. Karaciğer bozukluğu olan hastalardaki tedaviye ilişkin veri bulunmamaktadır. 18 yaşın altındaki bireylerde ve yaşlılarda (>65) farmakokinetik veriler sınırlıdır, ancak genç erişkinlerdeki farmakokinetik ile uyumludur (54).

e) Endikasyonları

Leflunomid, aktif romatoid artrit ve psöriatik artritli hastalarda methotrexate veya salozopyrin'in yeterli doz ve sürede kullanılmasına rağmen etki elde edilemeyen erişkin hastaların tedavisinde "hastalığı modifiye edici antiromatizmal ilaç" (DMARD) olarak;

- Belirti ve semptomların azaltılmasında,
- Radyolojik erozyonlar ve eklem aralığı daralmasıyla belirgin yapısal hasarın inhibisyonunda,
- Fiziksel fonksiyonlarının düzeltilmesinde endikedir.

Hepatotoksik ya da hematotoksik DMARD'larla (örn. metotreksat) yapılan yakın tarihli veya eş zamanlı tedaviler ciddi yan etki riskinde artışla sonuçlanabilir; bu nedenle leflunomid tedavisine başlanırken yarar/risk oranı göz önüne alınmalıdır.

Bunun yanı sıra, leflunomidden diğer bir DMARD'a geçerken ilacın organizmadan arınma prosedürünün izlenmemesi, bu değişiklikten uzun bir süre dahi ciddi yan etki riskini artırabilir (54).

f) Kontrendikasyonları

Leflunomide karşı aşırı duyarlılığı olan hastalarda (özellikle daha önce geçirilmiş Stevens-Johnson sendromu, toksik epidermal nekroliz, eriteme multiforme) kullanılmamalıdır. Leflunomid aşağıdaki durumlarda kontrendikedir:

- Karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalar,
- Ağır immün yetmezlik durumları (ör. AIDS),
- Kemik iliği fonksiyonu belirgin biçimde bozulmuş olan ya da romatoid artrit veya psöriatik artrit dışındaki nedenlerle belirgin anemisi, lökopenisi, nötropenisi veya trombositopenisi olan hastalar,

- Ciddi enfeksiyonu olan hastalar ,
- Yeterli klinik deneyim bulunmadığından, orta dereceli-ağır böbrek yetmezliği olan hastalar ,
- Nefrotik sendromdaki gibi ağır hipoproteinemisi olan hastalar,
- Gebe kadınlar ya da leflunomid ile tedavi sırasında ve sonrasında aktif metabolitin plazma düzeyleri 0.02 mg/L olduğu sürece güvenilir bir kontrasepsiyon metodu uygulamayan çocuk doğurma potansiyeli olan kadınlar,
- Leflunomid ile tedaviye başlamadan önce gebelik mutlaka elimine edilmelidir.

Laktasyon dönemindeki kadınlar, leflunomid kullanımı sırasında çocuklarını emzirmemelidir. Erkek hastalar, erkeğe bağlı fetal toksisite olasılığından haberdar olmalıdır. Leflunomid tedavisi sırasında yine güvenilir bir kontrasepsiyon sağlanmalıdır (54).

Güvenilirliği ve etkinliği pediatrik hasta grubunda araştırılmamış olduğundan, leflunomidin 18 yaş altındaki hastalarda kullanımı önerilmemektedir.

g) İmmüsupresyon potansiyeli

Leflunomid, şiddetli immün yetmezliği, kemik iliği displazisi veya şiddetli, kontrol edilemeyen enfeksiyonları olan hastalara önerilmemektedir.

Leflunomid kullanan hastalarda nadir olarak pansitopeni bildirilmiştir. Bu olguların bir çoğunda, hastalar methotrexate veya diğer immüsupresif ajanları birlikte kullanmış veya yakın zamanda bu tür tedavileri kesmişlerdi. Bazı durumlarda hastalarda, önceden belirgin hematolojik anomali mevcut idi. Bu grup hastalarda leflunomid dikkatli bir şekilde kullanılmalı ve sıklıkla klinik ve hematolojik açıdan izleme yapılmalıdır. Metotrexat ile leflunomidin kombine olarak kullanılmaları kontrollü araştırmalarda yeterince çalışılmamıştır. Başka bir ilaca geçişten sonra başlangıç fazında yakın takip önerilmektedir.

Leflunomid kullanan hastalarda kemik iliği supresyonu tespit edildiğinde tedavi kesilmelidir. Leflunomidden hematolojik supresyon potansiyeli olan başka bir anti-romatizmal ajana geçiş kararı verildiğinde, her iki ilacın sistemik maruziyeti artacağından, hematolojik toksisite açısından hastalar izlenmelidir. Kolestiramin veya aktif kömür ile arınma bu riski azaltabilir (54).

h) Enfeksiyonlar

İmmüsupresif ilaç -leflunomid gibi- tedavilerinin hastaların fırsatçı enfeksiyonları da içeren enfeksiyonlara daha duyarlı hale gelmesine yolaçabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, enfeksiyonlar daha şiddetli olabilir ve erken ve ciddi tedavi gerektirebilir. Ağır, kontrol edilemeyen enfeksiyonlar oluşması durumunda, leflunomidin kesilmesi ve aşağıda

tanımlandığı gibi arınma uygulanması gerekebilir. Tüberküloz reaktivasyonu riski nedeniyle tüberkülin reaktivitesi bulunan hastalar dikkatle izlenmelidir (54).

i) Solunum Yolu Enfeksiyonları

Leflunomid ile tedavide interstisyel akciğer hastalığı bildirilmiştir. İnterstisyel akciğer hastalığı tedavisi sırasında akut olarak gelişebilen ve potansiyel olarak ölümcül bir hastalıktır. Öksürük ve nefes darlığı gibi pulmoner semptomların görülmesi tedaviye devam etmemek ve ileri bir araştırma yapmak için bir neden olabilir (54).

j) Hepatotoksisite ve enzim yükselmelerinde doz ayarlaması

Yapılan klinik çalışmalarda, leflunomid ile tedavide başlıca ALT ve AST olmak üzere karaciğer enzimlerinde yükselmeler görülmüştür. Bu etkiler genellikle geri dönüşümlü olmuştur. Çoğu transaminaz yükselmeleri hafif (normalin üst sınırının iki katına eşit veya daha az) olmuş, genellikle tedavi sırasında düzelmiştir. Belirgin yükselmeler (normalin üst sınırının üç katından fazla) az sıklıkla görülmüş, dozun azaltılmasıyla veya tedavinin kesilmesiyle düzelmeye sağlanmıştır (54).

k) Daha önceden karaciğer hastalığının varlığı

Hepatit B veya C virüs enfeksiyonu veya belirgin karaciğer yetmezliği olan hastalarda, hepatotoksisite riski olasılığı arttığından ve ilacın aktivasyonunda, eliminasyonunda ve metabolizasyonunda karaciğerin rolünden dolayı leflunomid kullanılması önerilmez (54).

l) Arınma Prosedürü

Leflunomid ile tedavi bırakıldıktan sonra 0.02 mg/L'den düşük tayin edilemeyen plazma düzeylerini sağlamak için aşağıda belirtilen arınma prosedürü önerilir.

1. 11 gün süreyle günde 3 kez 8 g kolestimamin verilir (plazma düzeyini hızlı bir şekilde düşürme gerekliliği yoksa bu süre birbirini takip eden 11 gün olmak zorunda değildir.)
2. En az 14 gün arayla iki ayrı testle plazma düzeylerinin 0.02 mg/L'in altında olduğu doğrulanır. Plazma düzeyleri 0.02 mg/L'den yüksek ise ilave kolestimamin uygulaması düşünülmelidir.

Arınma prosedürü uygulanmazsa, leflunomidin aktif metabolitinin plazma düzeyleri yaklaşık 2 yıl sonra 0.02 mg/L'nin altına düşebilir (54).

m) İlaçtan arınma için gereklilik

Leflunomidin aktif metaboliti plazmadan yavaş yavaş elimine olur. Leflunomidin kaynaklanan ciddi herhangi bir toksisite (hipersensitivite dahil) durumunda, ilacın kesilmesinden sonra ilaç konsantrasyonunun hızlı bir şekilde düşürülmesi için yukarıda

belirtilen şekilde arınma prosedürünün uygulanması tavsiye edilir. Hipersensitivite şüpheli klinik bir mekanizma ise hızlı ve yeterli klirens elde etmek için uatılmış kolestiramin veya aktif kömür uygulaması önemli olabilir. Süre hastanın klinik durumuna göre değiştirilebilir.

Klinik açıdan gerekirse, arınma prosedürleri tekrar edilebilir.

Dializ hastalarında yapılan tek doz çalışmaları, leflunomidin aktif metabolitinin plazma serbest fraksiyonunun iki katına çıktığını göstermiştir. Böbrek yetmezliği olan hastalarda, leflunomidin kullanımı ile ilgili klinik deneyim yoktur. Bu grup hastalarda ilacın kullanımı sırasında dikkatli olunmalıdır (54).

2.3.3. Yan Etkiler

Genel olarak ağrı ve ateşe sebep olur.

Ürogenital sistem: Albuminüri, hematüri, vajinal moniliazis

Kardiyovasküler sistem: Yaygın olarak kan basıncında artış (genellikle hafif), palpasyon taşikardi, nadir olarak hipertansiyon

Gastrointestinal sistem ve karaciğer: Yaygın diyare, bulantı, kusma, iştahsızlık, oral mukozadaki rahatsızlıklar (örn. aftöz stomatit, ağız ülserasyonu, oral moniliazis), abdominal ağrı, karaciğer parametrelerinin yükselmesi (transaminazlar; özellikle ALT, daha az sıklıkla GGT, alkalen fosfataz, bilirubin).

Metabolik ve beslenme bozuklukları: Yaygın olarak kilo kaybı (genellikle önemsiz), periferik ödem; daha nadir olarak da hipokalemi gelişebilir.

Solunum yolu, torasik (göğüs), mediastinal bozukluklar: Nadiren ölümle sonuçlanabilen interstisyel akciğer bozukluğu (interstisyel pnömoni dahil)

Kan ve lenf sistemi: Yaygın olarak lökopeni, daha az olarak anemi ve hafif trombositopeni, nadiren eozinofili, lökopeni, pansitopeni ve çok nadiren de agranülositoz, vaskülit gözlenebilir (54).

2.3.4. Kullanım şekli ve dozu

ALT (GPT), tedaviye başlamadan önce ve tedavinin ilk 6 ayı boyunca (2 haftada bir) tam kan sayımı ile aynı sıklıkta ve daha sonra her 8 haftada bir kontrol edilmelidir.

Leflunomid tedavisine başlamadan önce, tedavinin ilk 6 ayı boyunca 2 haftada bir ve daha sonra da 8 haftada bir ALT ile birlikte lökosit formülü ve trombosit de dahil olmak üzere tam kan sayımı yapılmalıdır.

Romatoid artrit tedavisinde leflunomid, 3 gün süreyle günde bir kez 100 mg'lık bir yükleme dozuyla başlanır. Terapötik etki genel olarak 4 ila 6 hafta sonra başlar ve 4-6 aylık bir süreye kadar daha da artabilir (54).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yaptığımız bu çalışma İnönü Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Erciyes Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'ndan alınan ağırlıkları 150-200 g arasında değişen “Wistar Albino” cinsi 50 adet ratta gerçekleştirildi. Yedi gün boyunca hayvan laboratuvarında uygun koşullarda yiyecek ve içecekleri temin edilerek uyum süreci için beklendikten sonra deneysel protokol başlatıldı. Denekler randomize olarak beş gruba ayrıldı. Gruplar, grup K: Kontrol grubu (n: 10 adet), grup Sh: Sham grubu (n: 10 adet), grup L: Leflunomid verilen grup (n: 10 adet), grup S: Sepsis grubu (n: 10 adet), grup SL: Sepsis+Leflunomid grubu (n: 10 adet) olarak planlandı.

Grup K'deki ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Grup Sh'deki ratlarda sadece batin açılıp tekrar kapatıldı. Grup S'de sepsis, CLP (çekal ligasyon ve çekal perforasyon) yöntemi ile gerçekleştirildi. Ketamin ile anestezi sağlandıktan sonra abdomen traş edilerek diafragma altından 2 cm uzunluğunda orta hatta insizyon yapıldı. Çekum ortaya çıkarılıp barsak pasajını engellemeyecek şekilde ileoçekal valvin altından bağlandı. Daha sonra 16 gauge iğne ile delme işlemi gerçekleştirildi. Kontaminasyon için çekum sıkıştırılarak gaitanın deliklerden çıkması sağlandı. Barsaklar yerine yerleştirildikten sonra insizyon 3/0 steril ipek ile çift kat kapatıldı.

Grup L ve Grup SL'ye, deneyden 16 ve 8 saat öncesinde 2x10 mg/kg/gün leflunomid, kateter ile mide içerisine verildi. Ratlar sakrifiye edildikten sonra barsak doku örnekleri alındı. Mikrobiyolojik kültür analizi için, periton sıvısı ve kan örnekleri alındı. Dokulardaki oksidatif stresin araştırılması için SOD, KAT, NO, malondialdehit (MDA) ve protein karbonil (PC) bakılması planlandı.

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan dokular numaralandırılarak alüminyum folyoya sarıldı. Plastik kaplara konularak donduruldu. Derin dondurucuda (-30 °C) biyokimyasal testlerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi. Testler yapılacağı zaman dokular distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu. Daha sonra buz aküleri yardımıyla soğukluğu muhafaza edilerek bir bistüri yardımıyla küçük parçalara bölündükten sonra dokuların yaş ağırlıkları hassas terazi ile tartıldı ve cam tüplere aktarıldı. Dokular üzerine pH'sı 7,4 olan 2 ml 0,2 mM soğuk Tris-HCL tamponu eklendi (0.2 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve HCL solüsyonu 50/39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı. Homojenizasyon işlemlerinin tamamında bu tampon kullanıldı.). Daha sonra cam tüplerdeki dokular içi kar ile dolu bir beher içinde soğukluğu muhafaza edilerek homojenizatörde 16.000 devir/dk hızda iki dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat üzerine 4 ml daha tampon ilave edildi ve bir dakika süreyle tekrar homojenize edilerek toplam süre üç dakikaya tamamlandı. Elde edilen homojenat vortekslendikten sonra 2 ml'lik kısmı eppendorf tüplere aktarıldı ve bu homojenatlarda MDA tayini yapıldı. Homojenatların bir bölümü 45 dakika süreyle 3500 X g'de 6 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüje edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatandan bir hacim alınarak 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) karışımı ilave edilip 45 dk süreyle 3500 X g'de soğutmalı santrifüjde santrifüje edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein, SOD; enzim tayinleri yapıldı.

SOD aktivitesinin tayini: Bu metotta SOD aktivitesi tayini, ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazanı oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorpsiyon verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi bir renk oluşur. Ortamda SOD olduğunda ise indirgenme olayı olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte veya enzimin miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Sonuçlar U/mg protein yaş doku olarak ifade edildi (55).

KAT aktivitesinin tayini: Hidrojen peroksit (H₂O₂), ultraviyole spektrumu aralığında dalga boyunun azalması ile artan bir absorpsiyon verir. Deney ortamında, KAT enziminin kataliziyle H₂O₂'nin parçalanması, 240 nm'de (E₂₄₀= 40.0 cm²/mikromol) bir azalma olarak

takip edilir. Absorbansta gözlenen azalma hızı enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. Sonuçlar k/g protein yaş doku olarak ifade edildi (56).

NO düzeyi tayini: Alınan kan örneği 1000 devirde 15 dakika santrifüje edildi ve plazma inceleninceye kadar derin dondurucuda bekletildi. NO, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonra da nitrate (NO_3^-) dönüşür. Bunun için, numuneler kadmiyum ile 2 saat süreyle işleme sokuldu. Numunedeki nitratın (NO_3) nitrite (NO_2) dönüşmesini takiben deproteinizasyondan sonra Griess reaktifi ile renklendirildi ve 545 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (57). Protein ölçümünde Lowry metodu uygulandı (58). Sonuçlar $\mu\text{mol g}^{-1}$ yaş doku olarak ifade edildi.

Dokularda Malondialdehit (MDA) tayini: TBA ile 95 °C'de reaksiyona giren MDA, pembe renkli bir görünüm oluşturur. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki MDA miktarı ile orantılı olarak artmaktadır. Ortamdaki n-butanol geçecek şekilde MDA floresans spektrofotometrede eksitasyon 525 nm, emisyon 547 nm dalga boylarında ölçüldü. MDA standart grafiği kullanılarak, numunelerin MDA miktarı tayin edildi. Sonuçlar nmol g^{-1} yaş doku olarak ifade edildi (59,60).

Doku PC aktivitesinin tayini: Karbonil içerikleri spektrofotometrik olarak karbonil grubunun 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girerek 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturduğu bir reaksiyona dayanılarak belirlenmektedir. 2,4-dinitrofenilhidrazin, metal katalizasyonu yapan oksidasyon için kullanılan proteinlere yönelik bir ajandır. Sonuçlar, proteinin karbonil permiligram olarak nanomolü şeklinde ifade edildi (61).

Veriler SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arası veriler Tukey post hoc test varyans analizi; grup içi, tekrarlayan ölçüm için varyans analizi ve ardından Tukey post hoc test ile değerlendirildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart sapma ($\text{ort} \pm \text{SS}$) olarak verildi.

4. BULGULAR

Deneklerde çekal bağlama ve delme işleminden sonra titreme, ateş, oküler ve nazal akıntı, piloereksiyon ve letarji gibi belirgin sepsis bulguları gözlemlendi. Bazılarında bunlara ek olarak ishal de eşlik etti. Uyarılara tepkileri azalmış olarak gözlemlendi. Sepsis grubuna laparotomi yapıldığında periton içinde kötü kokulu sıvı olduğu görüldü. Bağırsak yüzeyi ödemli ve hiperemik, yer yer fibrinle kaplıydı. Bağırsaklar ileri derecede birbirlerine yapışmıştı. Diğer gruplarda bu değişikliklere rastlanmadı. Tüm ratlar deney sonuna kadar yaşadı. Ratlardan alınan kan ve periton sıvısı kültüründe E. Coli üredi. Ayrıca bu modelde çalışma süresince pozitif kan kültürleri elde edildiği ve üreyen mikroorganizmaların peritondaki bakterilerden en az birkaçını içerdiği bildirilmiştir.

Ratlardan alınmış olan barsak doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri düzeylerinde değişiklikler bulunmaktaydı. Grup S'de SOD düzeyinde, Grup K, Grup Sh ve Grup L ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşme saptandı ($p<0.05$). Grup SL'deki SOD düzeyi ise Grup K'den düşük olmasına rağmen anlamlı değildi (Grafik 1).

Doku KAT düzeyi, Grup S'de, Grup K, Grup Sh ve Grup L ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı ($p<0.05$). Grup SL'de ise Grup K'ya göre düşük olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık görülmedi (Grafik 2).

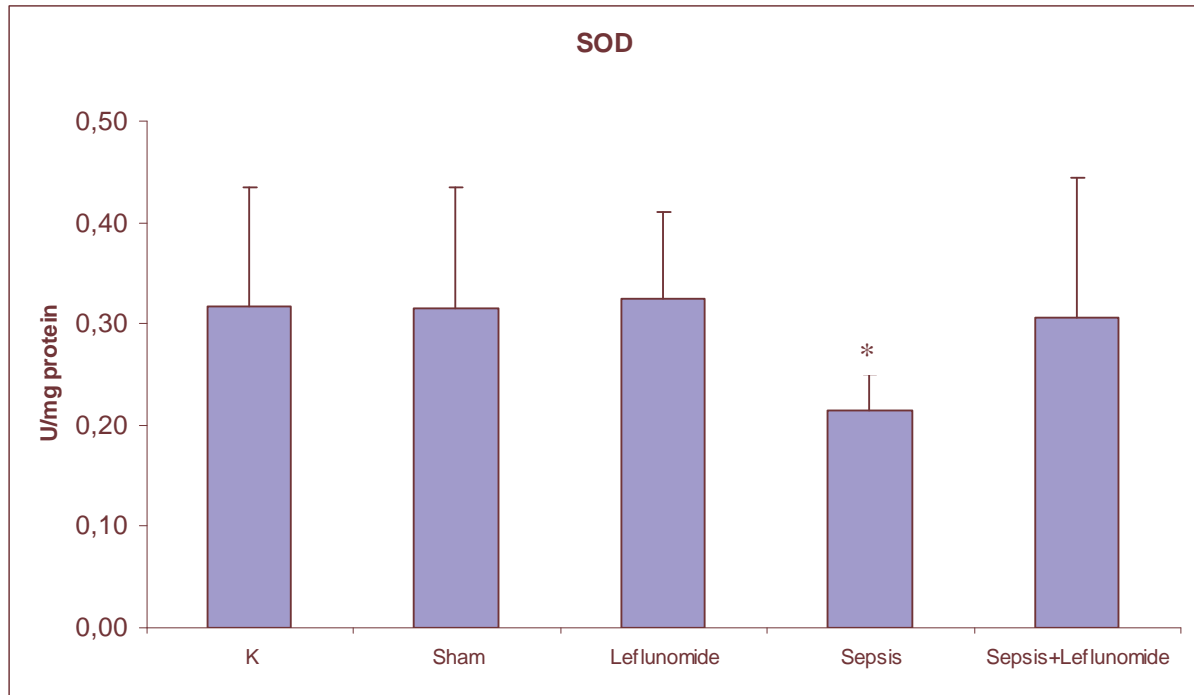
Grup S'de NO düzeyi, Grup K, Grup Sh, Grup L ve Grup SL ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0.05$) (Grafik 3).

Doku MDA düzeyi de Grup S'de Grup K, Grup Sh, Grup L ve Grup SL ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<0.05$) (Grafik 4).

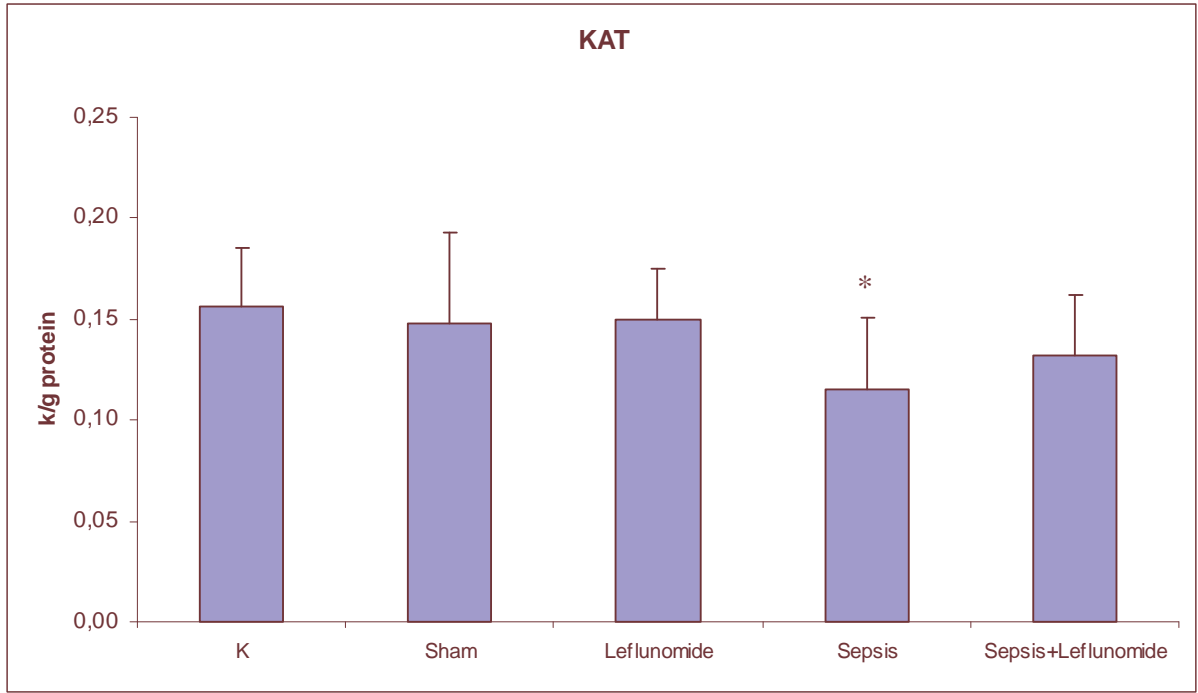
MDA düzeyine benzer şekilde doku PC düzeylerinde Grup S'de Grup K, Grup Sh, Grup L ve Grup SL ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü ($p<0.05$) (Grafik 5).

	KAT (k/g protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g yas doku)	NO (μ mol/g yas doku)	PC (nmol/mg prot)
K	0,1566 \pm 0,0288	0,3168 \pm 0,1181	11,0917 \pm 4,0430	0,2529 \pm 0,0851	0,8646 \pm 0,1982
Sham	0,1481 \pm 0,0449	0,3154 \pm 0,1202	10,2595 \pm 3,2083	0,2482 \pm 0,0567	0,8401 \pm 0,1952
Leflunomid	0,1494 \pm 0,0261	0,3244 \pm 0,0868	10,3012 \pm 2,4998	0,2500 \pm 0,0678	0,8393 \pm 0,2204
Sepsis	0,1152 \pm 0,0359 *	0,2139 \pm 0,0352 *	20,6227 \pm 8,4321 *	0,3873 \pm 0,1445 *	1,3111 \pm 0,2597 *
Sepsis+leflunomid	0,1319 \pm 0,0302	0,3060 \pm 0,1382	9,7532 \pm 4,0786	0,2645 \pm 0,0882	0,8269 \pm 0,2319

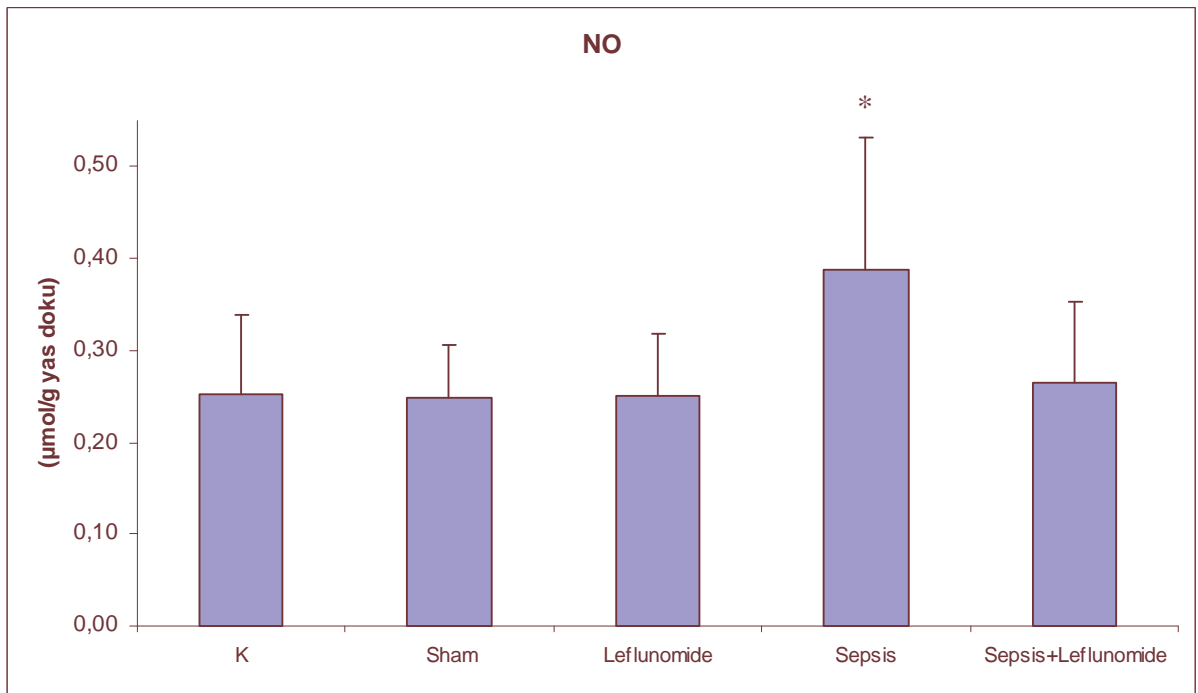
Tablo 3. Deney sonrası incelediğimiz biyokimyasal analiz sonuçlar ortalama ve standart deviasyon şeklinde verilmiştir.



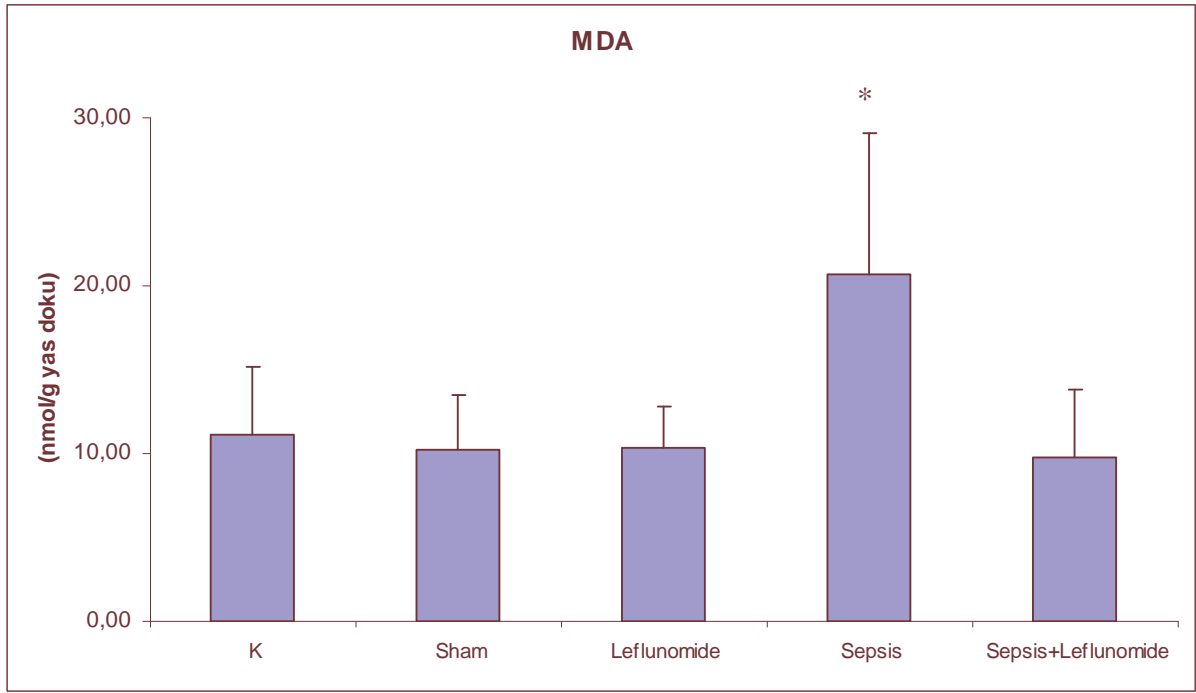
Grafik 1. Süperoksit dismutaz (SOD); Kontrol grubu (K) (n=10); Sham grubu (Sh) (n=10); Leflunomid grubu (L) (n=10); Sepsis grubu (S) (n=10); Sepsis-leflunomid grubu (SL) (n=10). * $p<0.05$; Grup S ile Grup K, Sh ve L karşılaştırıldığında.



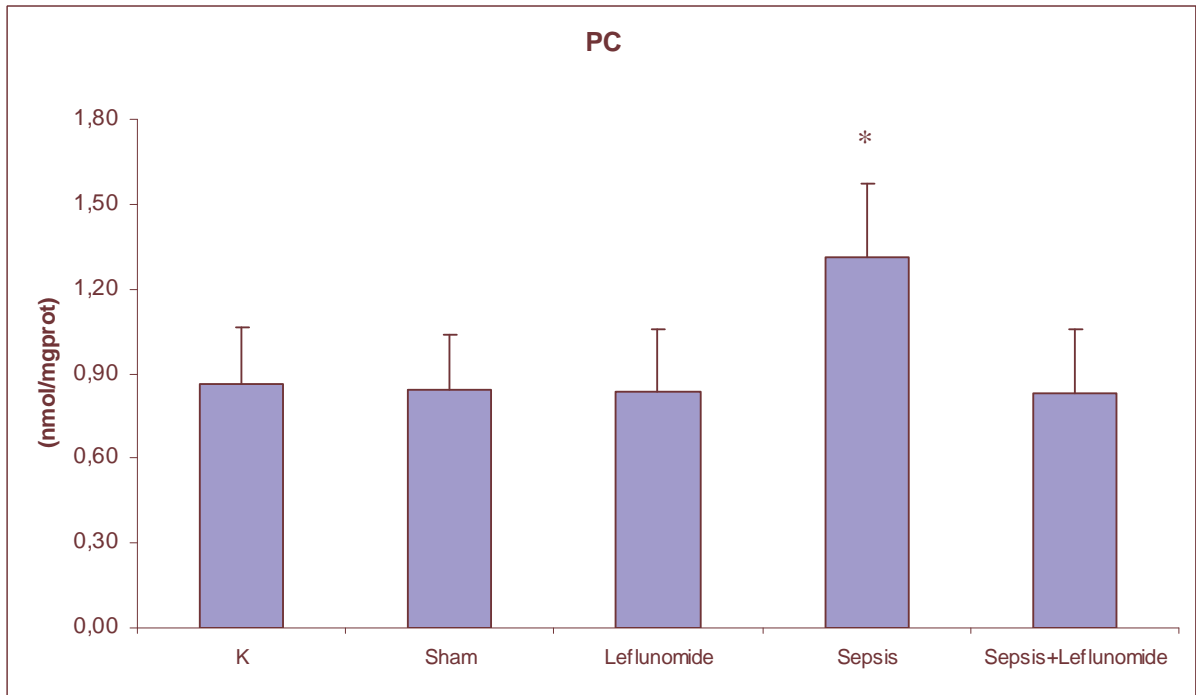
Grafik 2. Katalaz (KAT); Kontrol grubu (K) (n=10); Sham grubu (Sh) (n=10); Leflunomid grubu (L) (n=10); Sepsis grubu (S) (n=10); Sepsis+leflunomid grubu (SL) (n=10). * p<0.05; Grup S ile Grup K, Sh ve L karşılaştırıldığında.



Grafik 3. Nitrik oksit (NO); Kontrol grubu (K) (n=10); Sham grubu (Sh) (n=10); Leflunomid grubu (L) (n=10); Sepsis grubu (S) (n=10); Sepsis+leflunomid grubu (SL) (n=10). *p<0.05; Grup S ile Grup K, Sh, L ve SL karşılaştırıldığında.



Grafik 4. Malondialdehit (MDA); Kontrol grubu (K) (n=10); Sham grubu (Sh) (n=10); Leflunomid grubu (L) (n=10); Sepsis grubu (S) (n=10); Sepsis-leflunomid grubu (SL) (n=10). *p<0.05; Grup S ile Grup K, Sh, L ve SL karşılaştırıldığında.



Grafik 5. Protein karbonil (PC); Kontrol grubu (K) (n=10); Sham grubu (Sh) (n=10); Leflunomid grubu (L) (n=10); Sepsis grubu (S) (n=10); Sepsis-leflunomid grubu (SL) (n=10). *p<0.05; Grup S ile Grup K, Sh, L ve SL karşılaştırıldığında.

5. TARTIŞMA

Sepsis ve septik şok özellikle yoğun bakım ünitelerinde sık görülen infeksiyöz veya noninfeksiyöz (iskemi, akut pankreatit, yanık, major travma, şok vb) nedenlerle olabilen ve mortalitesi yüksek bir klinik tablodur. Tanıdaki yenilikler, son yıllardaki agresif tedavi uygulamaları ve invaziv girişimlerin artması nedeniyle sepsis insidansı artmıştır (20). Yoğun bakım ünitelerindeki bakım ve destekleyici tedavi yöntemlerindeki gelişmeler, geniş spektrumlu antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesi ile erken dönem mortalitesinde düşmeye neden olmakla birlikte hastaların hastanede kalma süresi, maliyeti ve morbiditesi yükselmektedir (61).

Sepsis sürecinde inflamasyonu tetikleyen patolojinin kendisinden çok inflamatuvar sonuçları daha büyük bir önem taşımaktadır. Sepsis patogenezinin karmaşık olması tek bir hedefe yönelik tedavi girişimlerini (antibiyotik, TNF- α antikorları, anti trombin-III vb.) başarısız kılmaktadır (62). Sepsisi tetikleyen maddelerin başında gram (-) bakteri hücre duvarı komponentlerinden olan endotoksin gelmektedir (62). Bu maddenin neden olduğu yaygın immün yanıt, hem hümmoral hem de hücresele immün yolu kapsamaktadır. Ayrıca inflamatuvar mediatörleri de (sitokinler, koagülasyon faktörleri, adezyon molekülleri vb.) etkilediği anlaşılınca sepsis tedavisindeki yenilikler bu alana kaymıştır.

Biz bu çalışmada ratlarda sepsis oluşturmak için CLP (çekal ligasyon puncture) modelini kullandık. Bunun nedeni CLP'nin fizyolojik etkilerinin hayvan modellerinde iyi çalışılmış ve tanımlanmış olması ayrıca insanlarda görülen sepsisteki hemodinamik, metabolik ve inflamatuvar yanıtı çok iyi bir şekilde taklit ettiğinin kabul görmesidir (63).

Sepsisin neden olduğu organ disfonksiyonu hedeflerinden biri de gastrointestinal sistemdir. İntestinal sistemdeki programlı hücre ölümü demek olan intestinal apoptozis, sepsis ve onun komplikasyonlarının gelişmesinde kritik rol oynamaktadır. Çünkü sepsiste intestinal apoptozisin artışı intestinal mukozanın oluşturduğu bakteriyel bariyerin disfonksiyonuna neden olabilir. Bu da bakteriyel translokasyona ve immun aktivasyona yol açabilmektedir (64). Bu nedenle intra abdominal sepsis çalışmamızda barsak dokuları kullanılmıştır. Sepsiste oksidatif hasar gelişimi birçok çalışma tarafından desteklenmiştir. Şener ve ark.'na göre sepsis, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, diyafram ve beyin dokularında oksidatif doku hasarına neden olmaktadır. Bu sonuca yaptıkları çalışma ile dokulardaki artmış lipid peroksidasyonu ve azalan GSH seviyeleriyle ulaşımlardır (65). Sepsisin indüklediği oksidatif strese oluşan ROS, hücrelerde ve dokularda sitotoksik etki gösterebilmektedir (66). ROS, bunu hücrenel komponentlerdeki protein, karbonhidrat, lipid ve nükleik asitlerde morfolojik değişikliğe yol açarak yapmaktadır. Crimi ve ark.'na göre ROS'taki masif artış inflamatuvar cevabı tamamen baskılayabilir ve doku hasarına neden olabilir (66). ROS'a maruz kalan biyolojik yapılarda lipit hasarı sonucu dokularda MDA, protein hasarı sonrasında PC miktarı artar. ROS'un potansiyel hasarına karşı organizmanın enzimatik (SOD, glutatyon peroksidaz ve KAT) ve nonenzimatik (glutatyon, askorbik asit, karotenler, tokoferoller, ubikinol vb.) antioksidan sistemleri bulunmaktadır (67).

Sepsisteki oksidatif stress gelişmesindeki birinci basamak mitokondriyal bozulmadır ve ilk adım nitrik oksitteki artıştır. NO, süperoksitin oluşumunu bu da peroksinitrit oluşumunu artırır (68).

Leflunomid (HWA- 486), hücre içinde aktif metabolitine dönüşerek (A771726) antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünesupresif (70) etkiler gösterir. Ancak bunların mekanizması tam olarak anlaşılammıştır (53). Sunil ve ark. TNF'nin indüklediği ROS oluşumuna etkisini inceledikleri çalışmada, leflunomidin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (53).

Vücudun endojen antioksidan enzimlerinden olan SOD, fenton reaksiyonu aracılığı ile O_2 , H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize eder. H_2O_2 ise hidroksil radikalleri üretmek için demir ile tepkimeye girebilen, canlıda (in vivo) en toksik oksijen molekülüdür (67).

CLP ile oluşturduğumuz sepsis ile konağın savunma sisteminde, başta uyarılmış nötrofiller olmak üzere diğer savunma sistemlerince ROS üretimi tetiklenmektedir. Meydana gelen oksidatif strese cevap olarak SOD sentezinin arttığı bildirilmektedir (67) ancak ROS'un aşırı miktarda olması durumunda SOD'la ROS arasındaki denge ROS lehine bozulacak ve SOD düzeyi azalacaktır. Demirbilek ve ark. (71) yaptıkları çalışmada bizim sonuçlarımıza

benzer olarak SOD aktivitesinin sepsis grubunda azaldığını göstermişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızdaki sepsis grubunda SOD düzeyinin düşük bulunmasının nedeninin sepsisin indüklediği ROS ürünlerinin SOD'un tüketimini artırdığını düşündürmektedir.

Sepsis oluşturulan gruba leflunomid ilave edildiğinde SOD aktivitesinin kontrole yakın bir düzeyde olması bu ajanının sepsise bağlı ROS üretimini kontrol altına aldığını göstermektedir. Karaman ve ark.'nın yaptığı renal iskemi/reperfüzyon çalışmasında iskeminin böbrekte indüklediği oksidatif hasarı leflunomidin azaltmakta olduğu ve ROS üretimini sınırladığını göstermişlerdir (72). Başka bir çalışmada ekstrahepatik kolestaziste leflunomidin karaciğerde SOD ve KAT tüketilmesini azalttığı gösterilmiştir (73).

SOD enzimi, O_2^- 'i H_2O_2 'e dönüştürür. Oluşan H_2O_2 , tüm biyolojik yapılarla (yağ asiti, protein, DNA vb) reaksiyona girebilmektedir. Vücudun diğer bir antioksidan enzimi olan KAT, H_2O_2 'nin yıkılmasını sağlamaktadır. Ritter ve ark. sepsiste KAT aktivitesinde bir artış olduğunu belirtmişlerdir (69). Bu sonucun aksine yaptığımız çalışmada KAT düzeyi sepsisli ratlarda azalmış bulundu. Bu azalmanın nedeninin sepsiste oluşan oksidatif strese bağlı olarak hidrojen peroksit seviyesinin artmasına bir cevap olduğunu ve KAT sentez artışının yetersiz kalarak tüketiminin artması ile olduğunu düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmada ise grup SL'de KAT düzeyi, grup S'den yüksek bulundu. Bu sonuç, uyguladığımız leflunomidin oksidatif stres oluşumuna ve yayılmasına karşı koruyucu etkileri olduğunu bu yüzden de KAT tüketiminin azaldığını düşündürdü. Elkayam ve ark. yaptıkları çalışmada leflunomidin lökositlerden reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (74). Bu sonuç bizim elde ettiğimiz KAT düzeyindeki azalmayı açıklayabilir.

NO, damar düz kaslarında vazodilatör tonusu sağlayarak doku perfüzyonu için oteoregülasyona katkıda bulunur. NO, damar endotelinde L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından üretilmektedir. NOS'un iNOS (indüklenebilir), cNOS (constitutive) ve nNOS (nöronal) gibi farklı izoformları mevcuttur. Endotoksin ve sitokinlerin uyarısıyla farklı NOS izoformları değişik hücre tiplerinde sentezlenir (74). Bu indüklenebilir NOS enzimi, constitutive izoformdan farklılık gösterir ve uzun periyotlarda masif NO salınımına neden olur. Potent bir vazodilatör olan NO'nun aşırı üretilmesinin vazodilatasyon, hipotansiyon ve katekolaminlere rezistans oluşturarak sepsis ve endotoksemideki hemodinamik ve metabolik süreçlerden sorumlu olduğunu düşündürmektedir (75).

Sepsiste iNOS tarafından indüklene aşırı NO salgılanması vazodilatasyon, vazopressörlere yanıtın azalması ve miyokardiyal disfonksiyona neden olur. Septik şokta serumda artan NO düzeyleri, NO ürünleri olan nitrit/nitrat düzeyini de artırır. Septik şok tedavisinde kan basıncının ve doku perfüzyonunun yeterli olmasını sağlayacak vazopressör

tedaviye ihtiyaç vardır. NO, güçlü bir vazodilatör, immünmodülatör ve yüksek konsantrasyonlarda sitotoksiktir. NO sentezinin veya aktivitesinin inhibisyonu septik şokta doku perfüzyonunun sağlanması için tedavi edici bir yaklaşım olabilir (76).

Yaptığımız çalışmada sepsis grubunda NO düzeyinin yüksek bulunması NO'nun sepsisteki inflamasyonun şiddeti ile korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalarla benzerlik göstermektedir (77). Sepsis grubundaki NO artışının miktarı, hastalığın ciddiyeti hakkında fikir vermektedir çünkü sepsiste meydana gelen mitokondriyal bozulmanın ilk adımı (69-RİTTER), mitokondriyal matrikste protein nitrasyonu ve mitNOS öncülüğünde aşırı peroksinitrit üretiminin NO üretimini artırarak mitokondriyal disfonksiyona ve organ yetmezliğine neden olmasıdır (78). Benzer şekilde NO'in normalden fazla üretilmesi durumunda immün sistemin aşırı aktivasyonuna neden olarak sepsiste ve diğer otoimmün hastalıklarda doku hasarına neden olduğu bildirilmektedir (79).

Sepsis grubuna leflunomidin verilmesi NO düzeyinin kontrol grubuna yakın olmasını sağlamıştır. Bu sonuç leflunomidin, hümorale ve hücresele inflamasyonu regüle ettiğini ve NOS aktivitesini etkileyebildiğini göstermektedir. Ancak NO düzeyini NOS'u kontrol altında tutarak mı yoksa NOS sentezini uyaran hümorale ve hücresele immunitiyi baskılayarak mı yaptığı açık değildir. Deneysel çalışmalarda leflunomidin (rat makrofaj, fibroblast ve astrositlerde) iNOS'u inhibe ettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (80, 81). Ayrıca insanlarda yapılan bir çalışma leflunomidin aktive RA'li hastalarda NO üretimini inhibe ettiğini göstermiştir (82). Bu sonuçları göz önüne alırsak makrofaj, fibroblast ve astrositlerde NO sentezinin azalması leflunomidin immünmodülatör ve anti romatik aktivitesine bağlı olabilir.

Yao ve ark. farelerde IL-1, BCG ve LPS tarafından indüklenen karaciğer hasarında leflunomidin serumda NO seviyesini belirgin olarak azalttığını bildirdikleri (9) çalışmanın sonucu bizim bulgularımızla paralel bulunmaktadır.

NF-κB, SIRS ve sepsisin patofizyolojisinde rol oynayan IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin, interstisyel adezyon molekülü Tip I'in ve ayrıca NOS'un sentezini içeren genlerin kontrolünü etkileyen bir transkripsiyon faktörüdür (83). Hong-wei Yao ve ark. leflunomidin NF-κB aktivasyonunu baskılamasıyla NO üretimini düzenlediğini bildirmektedir (84).

Hücre membranının lipofilik iç yapısı araşidonik asit gibi poliansatüre yağ asitlerinden zengindir ve bu yağ asitlerinin düşük erime noktası hücre membranının akışkanlığından sorumludur. Lipid peroksidasyonu, hücre membran lipidlerinin oksidatif hasarı olarak tanımlanır ve membran geçirgenliğinin bozulması ve bütünlüğünün hasar görmesi ile sonuçlanır. Peroksidasyon reaksiyonu, güçlü reaktif oksijen türlerinden birinin (hidroksil

radikali vb) poliansatüre yağ asitindeki karbon atomundan bir hidrojen atomu (proton ve elektron) kopararak lipid radikali oluşturması ile başlar. Oluşan lipid radikali oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksi radikalini meydana getirir, Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehiddir (MDA) (85).

Serbest oksijen radikallerince meydana getirilen lipid peroksidasyonunun yıkım ve hücre membranları hasarında önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır. Bu olaylar sonucunda hücrel membranların poliansatüre yağ asitleri degrade olurlar. Bunun sonucunda da membran geçirgenliği ve bütünlüğü hasar görür. Membran peroksidasyonu, membran akışkanlık ve permeabilitesinde değişikliğe neden olabilir ve ayrıca protein degradasyonunda artışa neden olabilir ve bu olaylar da hücrel lizise neden olur (66). Şener ve ark'nın yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın seviyesi tüm dokularda belirgin olarak artmıştır (66).

Yaptığımız sepsis modelinde sepsisin oksidatif stresi indüklediğinin en önemli kanıtı çalışmadaki sepsis grubundaki MDA düzeyinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmasıdır. Leflunomidin sepsis grubunda doku MDA düzeylerini kontrol altında tutmuş olması leflunomidin antioksidan özelliğinin en önemli kriteridir.

Yao ve ark. leflunomidin proinflamatuvar sitokinleri ve lökosit migrasyonunu azaltarak MDA sentezini sınırladığını bildirmektedir (9). İmmün modülatör bir ajan olan leflunomidin MDA artışını sınırlamasını özellikle polimorf lökositlerde respiratuvar burst aktivasyonunu sınırlamasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Yapılan bir başka çalışmada iskemi/reperfüzyonun indüklediği böbrek hasarında oluşan renal oksidatif streste MDA düzeyinin arttığı görülmüş ve leflunomid kullanımının renal fonksiyon bozukluğu ve renal morfolojide oluşan değişiklikleri önemli derecede hafiflettiği bildirilmiştir (72). Bu sonuç leflunomidin olumlu biyokimyasal sonuçlarının yanı sıra biyolojik sistemdeki fizyolojik ve histolojik yapıları koruduğunu göstermektedir. Ancak bu etkiyi nasıl yaptığı açık değildir.

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrarlar. Bu değişikliklerin bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinler de dahil olmak üzere diğer hücrel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar (86).

Lipit peroksidasyon ürünleri ile karşılaştırıldığında, PC gruplarının oksidatif stres belirteci olarak kullanılmasının bazı avantajları vardır. PC'nin bu avantajları arasında erken dönemde oluşması ve stabil olması gelmektedir (85). Hücreler oksidasyona uğrayan proteinleri saatler ve günler içinde yaktığı halde (86), lipit peroksidasyon ürünlerini dakikalar içinde yıkmaktadır (87).

Sepsis grubumuzda protein karbonil düzeyinin yüksek çıkması lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA artışı ile orantılı idi. Protein karbonilasyonu, hücrelerdeki oksidatif hasarın en geniş kullanımlı markeridir ve ROS tarafından oluşturulan sellüler hasarı yansıtır (88). Bu modelimizin yeterli oksidatif stres indüksiyonu sağladığını göstermektedir. PC'in yüksek düzeyde bulunması sadece oksidatif stresteki artışı değil aynı zamanda protein fonksiyon bozukluğunu göstermektedir (88,89). Sepsis+leflunomid grubunda ise PC düzeyinin kontrol grubuna yakın olması leflunomidin oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu gösterdi. Karaman ve ark. deneysel hepatik hasar oluşturdukları çalışmalarında leflunomidin karaciğerde PC, MDA ve NO artışını sınırlamakla beraber histopatolojik olarak doku hasarını önlediklerini göstermişlerdir (73). Leflunomidin PC artışını sınırlamasını açıklamak için literatürde yeterli kaynak bulunmamaktadır. Ancak bu etkiyi immunmodülasyon ve lökosit aktivasyonuna yaptığı sınırlamaya bağlayabiliriz.

Sepsis ve septik şok için antibiyotikler ve destek tedavisi dışında çeşitli yardımcı tedaviler denenmektedir. Bunlardan bazıları lipopolisakkaritler gibi mikrobiyal ürünlerin nötralizasyonu, nonspesifik antiinflamatuvarlar, immünsüpresif ilaçlar, proinflamatuvar sitokinlerin nötralizasyonu ve aktive protein C (drotrekogin alfa)'dir (90). Ancak bu çalışmaların sonuçları henüz istenen düzeyde olmamasına karşın benzer yöndeki araştırmalar için ümit verici sonuçları sağlamaktadır (21).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Leflunomid, antiinflamatuvar ve antiproliferatif özellikleri olan, hastalığı modifiye edici antiromatizmal ve immünmodülatör bir ajandır. Bu özellikleri nedeniyle romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve crohn hastalığında etkin bir biçimde kullanılmaktadır.

Yaptığımız çalışma ile şu ana kadar antioksidan amaçlı olarak kullanılmamış olan leflunomidin oksidatif stres parametrelerinde belirgin düzelme sağlamış olması bu ajanın immünsüpresif, immünmodülatör ve antiinflamatuvar olarak kullanımının dışında antioksidan özelliklerinin de bulunduğu saptandı. Çalışmamızdaki bulgularımız sepsis gibi mortalitesi yüksek olan bir süreçte leflunomid tedavisinin sepsiste yardımcı tedaviler arasına girebileceğini düşündürmektedir.

7. ÖZET

Septik Ratlarda Leflunomidin Antioksidan Etkisi

Amaç: Sepsis, koroner yoğun bakım dışındaki yoğun bakım ünitelerinde en sık karşılaşılan ölüm nedenidir. Konağın enfeksiyona karşı gösterdiği kontrolsüz inflamatuvar yanıt olarak tanımlanan sepsis, ciddi sepsise, septik şoka ve sonunda başlangıçtaki hasar bölgesinden uzaktaki organlarda yetmezliklerin gelişmesine neden olarak hastanın kaybedilmesine neden olabilen patolojik bir süreçtir. Leflunomid, immünmodülatör ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle klinikte kullanılan bir ilaçtır. Bu çalışmada leflunomid kullanımının sepsisin neden olduğu oksidatif stres üzerine etkisini araştırdık. Bunun için oksidatif stres parametreleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA) ve protein karbonil (PC) düzeylerine etkilerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Wistar Albino cinsi 50 rat, randomize olarak kontrol grubu (n=10) sham grubu (n=10) leflunomid grubu (n=10) sepsis grubu (n=10) sepsis+leflunomid grubu (n=10) olmak üzere beş gruba ayrıldı. Sepsis, çekal ligasyon ve delme ile oluşturuldu. Sepsis ve sepsis+leflunomid grubuna deneyden 16 ve 8 saat öncesinde 2x10 mg/kg/gün leflunomid, kateter ile mide içerisine verildi. Ratlar deneyden 24 saat sonra sakrifiye edilerek barsak dokuları alınarak doku SOD, KAT, NO, MDA ve PC düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Sepsis grubunda SOD düzeyi, kontrol, sham ve leflunomid grubuna göre anlamlı olarak düşük izlendi ($p<0.05$). Sepsis+leflunomid grubunda ise anlamlı değişiklik görülmedi. KAT düzeyi sepsis grubunda kontrol, sham ve leflunomid grubuna göre anlamlı olarak düşük izlendi ($p<0.05$). Sepsis+leflunomid grubunda ise anlamlı değişiklik görülmedi. NO düzeyi, sepsis grubunda, kontrol, sham, leflunomid ve sepsis+leflunomid grubuna göre anlamlı olarak artmış izlendi ($p<0.05$). Sepsis grubunda MDA düzeyi, kontrol, sham, leflunomid ve sepsis+leflunomid grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.05$). PC düzeyi, sepsis grubunda grup K, Sh, L ve SL'ye göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0.05$).

Sonuç: Leflunomidin sepsiste gelişen protein ve lipid oksidasyonunu belirgin bir şekilde sınırlamış olması bu ajanın anti inflamatuvar etkisinin yanında antioksidan özelliklerinin de bulunduğunu gösterdi. Ayrıca leflunomidin sepsisin başlama ve yayılmasındaki sınırlayıcı etkilerinden dolayı sepsiste yardımcı tedaviler arasına girebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Sepsis, leflunomid, oksidatif stres

8. SUMMARY

The Antioxidant Effect of Leflunomide in Septic Rats

The aim of the study: Sepsis is the most mortality cause of the intensive care units except coronary intensive care units. Sepsis is a pathological condition, which is defined as uncontrolled inflammatory response against the host. The process leads to severe sepsis, septic shock and eventually far organ failure from the primary site and patient death. Leflunomide, is a drug which is used in clinically conditions for its immunomodulatory and antiinflammatory effects. In our study, we investigate the effects of leflunomide use on the septic oxidative stress. For this purpose, we study the effects of this drug on oxidative stress parameters as superokside dismutase (SOD), catalase (CAT), nitric oxide (NO), malonydialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PC) levels.

Materials and methods: Wistar Albino type 50 rats were randomly divided into five groups; control (n=10), sham (n=10), leflunomide (n=10), sepsis (n=10) and sepsis+leflunomide (n=10) groups. Sepsis was performed with cecal ligation and puncture method. Leflunomide 2x10 mg/kg/day was administered via gastric catheter in sepsis and sepsis+leflunomide groups eight and sixteen hours before the experiment. At the end of 24 hours rats were sacrificed and bowel tissues were extracted. The tissue levels of SOD, CAT, NO, MDA and PC were measured.

Results: SOD level of the sepsis group is significantly lower than control, sham and leflunomide groups ($p<0.05$). But there is no significant change in sepsis+leflunomide group. CAT level is significantly lower than control, sham, leflunomide groups in sepsis group ($p<0.05$). But there is no significant change in sepsis+leflunomide group. NO level is significantly higher in sepsis compared to control, sham, leflunomide and sepsis+leflunomide groups ($p<0.05$). In sepsis group MDA level is significantly higher compared to control, sham, leflunomide and sepsis+leflunomide groups ($p<0.05$). PC level is significantly higher in sepsis group than control, sham, leflunomide and sepsis+leflunomide groups ($p<0.05$).

Conclusion: Significant limitation of the protein and lipid peroxidation in sepsis by leflunomide showed that it has also antioxidant effect beside its antiinflammatory effect. The significant limitation of the leflunomide on protein and lipid peroxidation, which occurs in sepsis, suggested that drug have anti-inflammatory effects with anti-oxidant properties. It is thought that leflunomide can be used in adjunctive sepsis treatment because of limitation effect on the beginning and spreading of the sepsis.

Key words: Sepsis, leflunomide, and oxidative stress.

9. KAYNAKLAR

- 1- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Concensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure guidelines for the use innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 101: 1644-55.
- 2- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and threatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.
- 3- Balk RA. Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16: 337-52.
- 4- Peters K, Unger RE, Brunner J, et al. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Research* 2003; 60: 49-57.
- 5- Kanjii S, Dewlin JW, Piekos KA, et al. Recombinant human activated protein C, drotrecogin alfa (activated): a novel therapy for severe sepsis. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 1389-402.
- 6- Dhainaut JF, Yan B, Cariou A, et al. Soluble thrombomodulin, plasma-derived unactivated protein C and recombinant human activated protein C in sepsis. *Critical Care Med* 2002; 30: 318-24.
- 7- van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13: 413-26.
- 8- Hinshaw LB. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 1996; 24: 1072-8.
- 9- Yao HW, Li J, Jin YO, et al. Effect of leflunomid on immunological liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2003; 9(2): 320-3.
- 10- Tulunay M, Oral M. Sistemik enflamatuar yanıt sendromu, sepsis, septik şok ve multipl organ disfonksiyonu sendromu, in Cuhruk H (ed), *Anesteziyoloji ve Reanimasyon; AÜTF ANTİP AŞ*, Ankara, 1999.
- 11- Balk RA. Severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000; 16: 179-92.
- 12- Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27: 3-9.
- 13- 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29: 530-8.
- 14- Marshall JC, Panacek EA, Teoh L, et al. Modeling organ dysfunction as a risk factor, outcome, and measure of biologic effect in sepsis. *Crit Care Med* 2001; 28: 46.
- 15- Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-Related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22: 707-10.

- 16- 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 31: 1250-6.
- 17- American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-74.
- 18- Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in 1990s. *JAMA* 1994; 271: 226-33.
- 19- Barriere S; Lowry S. An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med* 1995; 23: 376-93.
- 20- Balk RA. Severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000; 16: 179-92.
- 21- Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* 2003; 326: 262-6.
- 22- Leland S, Jeffrey G. Cytokines in disease. In: *Textbook of critical care*. Shoemaker W, Ayres S, Grenvik A, Holbrook P. (Eds) Philadelphia, Pennsylvania 2000 Fourth edition pp 570-85.
- 23- Quartin AA, Schein RM. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. *JAMA* 1997; 277: 1058-63.
- 24- Angus D, Randy W. Epidemiology of sepsis: An update. *Crit Care Med* 2001; 29: 109-16.
- 25- Sibbald W, Nevriere R. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: Definitions and prognosis. 2003 www.uptodate.com
- 26- Arndt P, Abraham E. Immunological therapy of sepsis: experimental therapies. *Intensive Care Med* 2001; 27: 104-15.
- 27- Nyugen A, Yaffe M. Proteomics and systems biology approaches to signal transduction in sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 1-6.
- 28- Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *Am Health Syst Pharm*. 2002; 59: 3-8.
- 29- Rongione A, Kusske A, Ashley S et al. Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J Surg Res* 1997; 70: 107-12.
- 30- Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24: 1125-8.
- 31- Kirkeboen K, Strand A. The role of nitric oxide in sepsis- an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 275-88.
- 32- Berghe V, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Eng J Med* 2001; 345: 1359-67.

- 33- Cronin L, Cook DJ, Carlet J, et al. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995; 23: 1430-9.
- 34- Annane D. Corticosteroids for septic shock. *Crit Care Med* 2001; 29: 117-20.
- 35- O'Suilleabhain C, O'Sullivan ST, Kelly JL, et al. Interleukin-12 treatment restores normal resistance to bacterial challenge after burn injury. *Surgery* 1996; 120: 290-6.
- 36- Harris RJ, Symon L, Branston NM, et al. Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1: 203-9.
- 37- Brent JA, Rumack HH. Role of free radicals in toxic hepatic injury. *Free Radicals Biochemistry, Clin Toxicol* 1993; 31: 139-71.
- 38- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
- 39- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- 40- Fridovich L. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.
- 41- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Second Edition. Clarendon Press, Oxford, 1989.
- 42- Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *The Am J Medicine* 1991; 91: 14-22.
- 43- Packer L. *Methods in enzymology oxygen radicals in biological system*. Academic Press Inc, Orlando Florida, 1984.
- 44- Mariotto S, Cuzzolin L, Adami A, et al. Effect of a new non-steroidal anti-inflammatory drug, nitroflurbiprofen on the expression of inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils. *B J Pharmacol* 1995; 115: 225-6.
- 45- Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 1990; 27: 1-11.
- 46- Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Reports* 1997; 17: 3-8.
- 47- Beckman JS, Liu TH, Hogan EL, et al. Oxygen free radicals and xanthine oxidase in cerebral ischemic injury in rat. *Soc Neurosci* 1987; 13: 1498.
- 48- Saugstad OD. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia; its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res* 1988; 23: 143-50.
- 49- Sies H, De Groot H. Role of ROS in cell toxicity. *Toxicol Lett* 1992; 64/65: 547-51.

- 50- Aydın A, Sayal A, Isımer A. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. 2001; 20: 2-71.
- 51- Bralet J, Schreiber L, Bouvier C. Effects of asidosis and anoxia on iron delocalization from brain homogenats. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 979-83.
- 52- Manna SK, Aggarval BB. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A771726) blocs TNF-dependent NF- κ B activation and gene expression. *J Immunol* 1999; 162: 2095-102.
- 53- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Leflunomide suppresses TNF-induced cellular responses: effects on NF- κ B, activator protein-1, c-Jun N-terminal protein kinase, and apoptosis. *J Immunol* 2000; 165: 5962-69.
- 54- RxMediaPharma® 2007 İlaç Bilgi Kaynağı
- 55- Oberly LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1998; 34: 497-500.
- 56- Aebi HC. Ed. Bergmeyer U. In methods of enzymatic analysis. New York and London. Academic pres, 1974; pp: 673-7.
- 57- Moshage H, Kok B, Johannes R, et al. Nitrite and nitrate determinations in plazma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-6.
- 58- Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L. Protein measurement with theophiline phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 183- 265-75.
- 59- Sinnuber RO, Yut C, Chang YT. Characterization of the red pigment forme in the thiobarbituric acid determinatio of oxidative rancidity. *Food Res* 1958; 23: 626-32.
- 60- Sakawa T, Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test of detecting lipids hydroperoxides. *Lipids* 1980; 15; 137-44.
- 61- Ozyurt B, Sarsilmaz M, Akpolat N, et al. The protektive effects of omega-3 fatty acides against MK-801-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. *Neurochem İnt* 2007; 50: 196-202.
- 62- Martin GS, Mannino DM, Eaton S et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
- 63- Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 49-57.
- 64- Ozdemir D, Uysal N, Tugyan K, Gonenc S, Acikgoz O, Aksu I, Ozkan H. The effect of melatonin on endotoxemia-induced intestinal apoptosis and oxidative stress in infant rats. *Intensive Care Med.* 2007; 33 :511-6.
- 65- Rongione AJ, Kusske AM, Ashley SW, et al. Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J Surg Res* 1997; 70: 107-12.

- 66- Sener G, Toklu H, Ercan F, et al. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1387-96.
- 67- Crimi E, Sica V, Slutsky AS, et al. Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction. *Free Radic Res* 2006; 40: 665-72.
- 68- E. Ozturk, S. Demirbilek, A. K. But, et al. Antioxidant properties of propofol and erythropoietin after closed head injury in rats. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatri.* 2005; 29: 922-7.
- 69- Ritter C, Andrades M, Frota ML, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med Springer-Verlag* 2003; 10: 1789-90.
- 70- Hamilton LC, Vojnovic I, Warner TD. A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1589-96.
- 71- Demirbilek S, Sizanli E, Karadag N, et al. The effects of methylene blue on lung injury in septic rats. *Eur Surg Res* 2006; 38: 35-41.
- 72- Karaman A, Turkmen E, Gursul C, et al. Prevention of renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats by leflunomide. *Int J Urol* 2006; 13: 1434-41.
- 73- Karaman A, Iraz M, Kirimlioglu H, et al. Hepatic damage in biliary-obstructed rats is ameliorated by leflunomide treatment. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 701-8.
- 74- O. Elkayam, I. Yaron, I. Shirazi, et al. Active leflunomide metabolite inhibits IL-1 β , tumour necrosis faktor- α , nitric oxide and metalloproteinase-3 production in activated human synovial tissue cultures. *Ann Rheum Disease* 2003; 62: 440-3.
- 75- Demirbilek S, Ersoy MO, Karaman A. Small-dose capsaicin reduces systemic inflammatory responses in septic rats. *Anesth Analg* 2004; 99: 1501-7.
- 76- Avontuur JAM, Stam TC. Effect of L-NAME, an inhibitör of nitric oxide synthesis, on plazma levels of IL-6, IL-8, TNF- α and nitrite/nitrate in human septic shock. *Intensive Care Med* 1998; 24: 673-79.
- 77- Kırkeboen K, Strand A. The role of nitric oxide in sepsis- an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 275-88.
- 78- Esin Koç Güncel *Pediatric* 2005; 3: 108-9.
- 79- Alvarez S, Evelson PA. Nitric oxide and oxygen metabolism in inflammatory conditions: sepsis and exposition to polluted ambients. *Front Biosci* 2007; 12: 964-74.
- 80- Trajkovic V. Modulation of inducible nitric oxide synthase activation by immunosuppressive drugs. *Curr Drug Metab* 2001; 2: 315-29.

- 81- Jankovic V, Samardzic T, Stosic GS, et al. Cell-specific inhibition of inducible nitric oxide synthase activation by leflunomide. *Cell Immunol* 2000; 199: 73-80.
- 82- Reddy SV, Wanchu A, Khullar M et al. Leflunomid reduces nitric oxide production in patients with active rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1085-90.
- 83- Roth E, Manhart N, Wesner B. Assesing the antioxidative status in critically ill patients. Lippincott Williams & Wilkins, Inc Volume 7(2) March 2004 pp 161-8.
- 84- Yao HW, Li J, Chen J, et al. Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 915-20.
- 85- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
- 86- Günaydın B, Çelebi H. Genel anesteziklerin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkileri. *Anestezi Dergisi* 2003; 11: 87-98.
- 87- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem* 1996; 271: 15504-9.
- 88- Dalle-Donne I, Adlini G, Carini M, et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Med* 2006; 10: 389-406.
- 89- Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J Lipid Res* 1997; 38: 612-22.
- 90- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709.