

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA ENDOTOKSİN İLE OLUŞTURULAN DİSSEMİNE
İNTRAVASKÜLER KOAGULASYON ÜZERİNE VİTAMİN E VE
PREDNİSOLON'UN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

138192

RAMAZAN ÇÖL

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
MILLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI

Danışman
Prof. Dr. Zafer DURGUN

KONYA-2003

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA ENDOTOKSİN İLE OLUŞTURULAN DİSSEMİNE
İNTRAVASKÜLER KOAGULASYON ÜZERİNE VİTAMİN E VE
PREDNİSOLON'UN ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

RAMAZAN ÇÖL

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından .../.../2003 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir
(SBE Yön. Karar tarih ve no.....)

Tez Jürisi:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Erkan Kestin
Danışman : Prof. Dr. Zafer DURGUN
Üye : Doç. Dr. Fıрузe KURTOĞLU
Üye : Doç. Dr. İlsin PİSKİN
Üye : Prof. Dr. Tufan KEÇECİ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1-2
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	3-43
2.1 DIC çerçevesinde bazı tanım ve açıklamalar.....	3-4
2.2 DIC 'e sebep olan bazı bozukluklar.....	4-6
2.3 DIC Oluşumunda Lipopolisakkarit, Sepsis ve Septik Şok'un Önemi..	6-8
2.4 DIC'te Sitokinlerin Mediyatör Etkisi.....	8-12
2.5 Endotoksemi ve DIC'de Koagulasyonun Aktivasyonu ve İnhibisyonu..	14-16
2.6 Endotoksemide Fibrinolizis Aktivasyonu ve İnhibisyonu.....	16-17
2.7 Koagulasyon ve Fibrinolizisdeki Lokal Farklılıklar.....	17-18
2.8 DIC'te Lökositlerin Rolü.....	19-23
2.9 DIC'te Plateletlerin Rolü.....	23-27
2.10 DIC'de Doğal Antikoagülatif Mekanizmanın Önemi.....	27-31
2.11 DIC'in Patogenezisinde Endotelyumun Rolü.....	31-34
2.12 DIC Üzerine Prednisolon'un Etkileri.....	34-36
2.13 DIC üzerine Vitamin E (α -tokoferol)'nin Etkileri.....	36-38
2.14 DIC'te Diyagnoz.....	39-42
2.15 DIC'te başlıca tedavi yaklaşımları	42-43
3. MATERYAL VE METOT.....	44-47
3.1 Materyal	44
3.2 Metot.....	44-47
3.2.1 Anestezi.....	44
3.2.2 Femoral arterin diseksiyonu.....	45
3.2.3 Deneysel endotokseminin oluşturulması.....	45
3.2.4 Kan örneklerinin alınması, işlenmesi ve depolanması.....	45
3.2.5 Hematolojik ve hemostatik analizler	45-47
3.2.5.1. Protrombin zamanı (PT)'nin belirlenmesi.....	45-46
3.2.5.2. Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT)'nin belirlenmesi..	46
3.2.5.3. Trombin zamanı (TT)'nin belirlenmesi.....	46
3.2.5.4. Fibrinojen düzeyinin belirlenmesi.....	46
3.2.5.5. D-dimer düzeyinin belirlenmesi.....	46

II

3.2.5.6. Trombosit sayımı.....	47
3.2.5.7. Lökosit sayımı.....	47
3.2.5.8. Lökosit formülü.....	47
3.2.6. İstatistiki analizler.....	47
4 BULGULAR.....	48-55
5 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56-67
6 ÖZET.....	68
7 SUMMARY.....	69
8 LİTERATÜR LİSTESİ.....	70-83
9 ÖZGEÇMİŞ.....	84
10 TEŞEKKÜR.....	85

III

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1	Araştırma gruplarına ait plazma APTT değerleri.....	53
Grafik 2	Araştırma gruplarına ait plazma PT değerleri.	53
Grafik 3	Araştırma gruplarına ait plazma TT değerleri.....	54
Grafik 4	Araştırma gruplarına ait plazma Fibrinojen değerleri.....	54
Grafik 5	Araştırma gruplarına ait plazma D-dimer değerleri.....	55
Grafik 6	Araştırma gruplarına ait kan trombosit sayıları	55
Grafik 7	Araştırma gruplarına ait kan lökosit sayıları.....	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 1	Endotoksin (K) , Vitamin E + Endotoksin (E) ve Prednisolon + Endotoksin (P) gruplarında belirlenen hemostatik parametreler.....	51
Tablo 2	Endotoksin (K) , Vitamin E + Endotoksin (E) ve Prednisolon + Endotoksin (P) gruplarında belirlenen hematolojik parametreler.....	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:	Koagulasyon Sistemi.....	9
Şekil 2:	DIC'te sitokinlerin rolü.....	13
Şekil 3:	Sepsiste dissemine intravasküler koagulasyon ve organ yetersizliği üzerine lökositlerin rolü.....	20
Şekil 4:	İnflamasyon-Koagulasyon otoamplifikasyonu.....	20

RESİM LİSTESİ

Resim 1	Kulak venine intraket uygulaması.....	86
Resim 2	Diseksiyon sonrasında femoral arterin görünümü.....	86
Resim 3	Anestezi altındaki tavşanda diseke edilen femoral arter bölgesinin görünümü.....	87
Resim 4	Femoral artere intraket uygulaması.....	87

KISALTMALAR

AMK: High-molecular weight kininogen, Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen

ATIII: Antithrombin III, Antitrombin III

BPI: Bactericidal/ permeability-increasing protein, bakterisidal/ permeabiliteyi artıran protein

C: Complement, Kompleman

DIC: Disseminated Intravascular Coagulation, Dissemine İntravasküler Koagulasyon

FDP: Fibrin Degradation Products, Fibrin yıkım ürünleri

FpA: Fibrinopeptide A, Fibrinopeptit A

G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor, Granülosit koloni stimüle edici faktör

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Granülosit- makrofaj koloni sitümüle edici faktör

ICAM-1: Intercellular adhesion molecules-1, İnterselüler adezyon molekülü-1

IL: Interleukin, İnterlöykin

LPS :Lipopolysaccharide, Lipopolisakkarit

MIP : Macrophage inflammatory protein, Makrofaj inflammatory protein

MODS: Multible organ dysfunction syndrome, Multipl organ disfonksiyon sendromu

MOF: Multible organ failure, Multipl Organ Yetmezliği

NE: Neutrophil elastase, Nötrofil elastaz

NfP: N-formyl peptide, N-formyl peptit

NF- γ B :Transkripsiyon faktör nükleer faktör

NO: Nitrik oksit

PAF: Platelet activating factor, Platelet aktive edici faktör

PAI-1: Plazminogen activator inhibitor type 1, Plazminojen aktivatör inhibitör tip 1

PAP: Plasmin- α_2 -antiplasmin complex, Plazmin- α_2 -antiplasmin kompleksi

PC: Protein C

PCA: Aktive Protein C, Aktif Protein C

PF₁₊₂ : Protrombin F₁₊₂

SIRS: Systemic inflammatory response syndrome, Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu

SOD: Superoxide dismutase, Süperoksit dismutaz

TAT: Thrombin-antithrombin complex, Trombin-antitrombin kompleksi

TBARS : Thiobarbitturic acid reactive substance, Tiabarbitürük asid reaktif yapıları

TF: Tissue factor, Doku Faktörü

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor, Doku Faktörü Yolu İnhibitörü

TNF: Tumor necrosis factor, Tümör nekrozis faktör

t-PA: Tissue- plasminogen activator, Doku plazminojen aktivatörü

T-TM: Thrombin-thrombomodulin complex, Trombin-trombomodülin kompleksi

vWF: von Willebrand factor, von Willebrand faktör

1. GİRİŞ

Sepsis prognozu yönüyle modern tıbbın en kompleks hastalıkları arasında gösterilmektedir. Virus ve parazit gibi etkenlerin yanında, daha çok gram negatif olmak üzere, genellikle bakteriler tarafından oluşturulmaktadır. Sepsisli bir hastanın prognozunun hızlı bir şekilde değişmesi ve kısa sürede hayatını kaybetmesi, bir çok bilim adamının araştırmalarını bu hastalık üzerinde yoğunlaştırmasına yol açmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda sepsiste rol oynayan biyolojik sürecin net olarak ortaya konulabilmesi halinde hızlı ve etkili tedavi yaklaşımları sağlanmış olacaktır.

Sepsisli hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, sepsiste vangersal mediyator (örneğin tümör nekrozis faktör, interlöykin-1) aktivasyonunun hızlı bir şekilde geliştiği gözlenmektedir. Ayrıca sepsis, çeşitli organ kapillerlerinde fibrin plakları oluşumuna yol açan koagulasyon mekanizması faktörlerinin aktivasyonuna sebep olarak, ölümcül komplikasyonların gelişmesine neden olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda koagulasyon inhibitörleri olarak adlandırılan bazı fizyolojik antikoagulan ajan (Doku Faktörü Yolu İnhibitörü, Antitrombin III, Protein C...) ve ilaçların (Antioksidanlar, Kortikosteroidler, Antibiyotikler...) sepsis üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çok çalışma gerçekleştirilmektedir.

Dissemine İnvasküler Koagulasyon (DIC, disseminated intravascular coagulation); sepsiste bazı tetikleyicilerle (bakteri, virus, lipopolisakkarit, stafilokokal α hemolizin vb.) invasküler koagulasyon mekanizmasının aktive edilmesiyle başlayan, özellikle kapiller damarlarda sistemik bir biçimde fibrin şekillenmesiyle sonuçlanan, koagulasyon faktörleri ve trombositlerin kullanılması yanında fibrin yıkılma ürünlerinin de kanda birikmesiyle karakterize olan edinsel bir sendromdur. Bu durumda söz konusu mikrophtılar nedeniyle gelişen hemodinamik ve metabolik düzensizlikle bağlantılı olarak organlara yeterince kan desteği sağlanamamakta ve doku işlemisi gelişerek multiple organ yetersizliği ile birlikte platelet ve koagulasyon proteinlerinin tüketimi sonucu şiddetli kanama komplikasyonları oluşmaktadır.

Hem koagulasyon hem de fibrinofizis mekanizmasının sistemik olarak aktive edildiği bir bozukluk olan DIC'de genellikle ilk klinik gösterge olan ve diffüz kanama eğilimi ile sonuçlanan süreç "Consumptive Coagulopathy" diye adlandırılmaktadır. Fizyolojik olarak phtılaşıma sisteminin aktivasyonu fibrinojenden fibrin şekillenmesi ile sonlanmakta, daha sonra ise fibrin ve mevcut fibrinojen proteolitik etkili plazminin aktivasyonu sonucu parçalanmaktadır (fibrinolizis). Sepsiste olduğu gibi fibrinolitik sistem phtılaşıma sisteminden

dağa az aktif olursa çözülmeyen fibrin mikrosirkülasyonda birikmektedir. Yaygın kanama ve yaygın fibrin birikmesinin birlikte gözleendiğı bu süreç ise “ Consumptive thrombohemoragic disorder” olarak adlandırılmaktadır. DIC’de pıhtılaşma sistemi sistemik olarak aktive edildiğinden inhibitör güçlerin (Antitrombin III, Protein C, Protein S, Doku Faktörü Yolu İnhibitörü) bu süreci bloke etmeye yönelmeleri sonucu plazma düzeylerindeki azalma hatta tükenme, daha yaygın pıhtı oluşumuna neden olarak (“ pozitif feedback” etki) nihayetinde hasta hayatını kaybedebilmektedir.

Önemli koagülasyon bozukluklarıyla karakterize olan DIC, özellikle bir çok gram negatif ve pozitif bakteri ile diğere enfeksiyöz mikroorganizmalar tarafından oluşturulan septisemi durumlarında yüksek oranda görülmekte, ayrıca bir çok faktör tarafından geliştirilerek ciddi ve hayatı tehdit eden komplikasyonlar doğurmaktadır. Bu nedenle araştırmada, son yıllarda üzerinde çalışmaların yoğunlaştırıldığı, klinik ve ekonomik açıdan önem taşıyan DIC sendromunun; oluşturduğu bozuklukların incelenmesi ile düzeltilmesi ya da baskılanmasında Vit E ve prednisolon uygulamasının olası etkilerinin belirlenerek elde edilen bulguların, gerek veteriner gerekse beşeri hekimlik alanına sunulmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. DIC çerçevesinde bazı tanım ve açıklamalar:

Sepsis: Çeşitli mikroorganizmalar ile bunların toksinlerinin kanda veya dokuda bulunmalarıdır. Daha geniş bir ifadeyle ise; mikroorganizmanın kendisine veya salgıladığı toksik maddeye karşı organizmanın verdiği sistemik bir yanıtın şeklinde tanımlanmaktadır (Erhan ve Yaşar 1997, Matot ve Sprung 2001). Sepsiste klinik belirtiler yanında sistemik yanıtı gösteren belirtiler olarak taşipne, taşikardi, hipotermi veya hipertermi ile hipotansiyon, laboratuvar bulgusu olarak ise bakteriyemi, lökositosis/nötropeni, laktik asidozis, böbrek ve karaciğer fonksiyon test sonuçlarında değişiklikler, trombositopeni/DIC ile prokalsitonin, sitokin ve C reaktif protein artışı sözkonusudur.

Bakteriyemi: Kanda canlı bakterinin bulunmasıdır. Yine virus, mantar, parazit ve diğer patojenlerin kanda bulunması da benzer şekillerde ifade edilmektedir (viremi, parazitemi, fungemi gibi). Teşhis için kan kültürlerinin yapılması yeterlidir (Erhan ve Yaşar 1997).

Endotoksemi: Sirkülasyonda endotoksin bulunduğunu belirtir. Sepsis ve septik şoklu hastalarda görülmekte, deneysel olarak ise laboratuvar hayvanlarına yüksek dozda endotoksin (lipopolisakkarit, LPS) infüzyonuyla indüklenmektedir (Bone ve ark 1989).

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS, Systemic inflammatory response syndrome); Taşikardi, hipertermi, hipotermi, taşipne ve organ perfüzyon bozukluğu ile karakterizedir. Gram negatif ve pozitif bakteriler, patojen viruslar, mantarlar ve riketsiyalar gibi enfeksiyöz etkenler ya da pankreatit, yanık, doku hasarı, hemorajik şok gibi nonenfeksiyöz nedenlerle oluşabilir. Sepsiste gerek enfeksiyöz gerekse nonenfeksiyöz nedenlerle yaygın bir enflamatuvar reaksiyon şekillenmektedir. Bu nedenle sepsis sendromu yerine sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) teriminin kullanılması önerilmektedir (Erhan ve Yaşar 1997).

Septik şok; Genellikle bakteriyemi ve fungeminin eşlik ettiği dolaşım yetmezliği ile karakterizedir. SIRS belirtilerine ek olarak sistolik kan basıncı çok düşüktür. Yeterli sıvı tedavisine rağmen hipotansiyon ile birlikte perfüzyon bozukluğu belirtileri (laktik asidoz, oligüri, akut mental değişiklikler...) devam etmektedir (Fink ve Heard 1990).

Multipl Organ Yetmezliği (MOF, Multiple organ failure): Organizmada sepsise yanıt olarak başlayan mekanizmaların kontrolden çıkması sonucu, endotel enflamasyonun yaygınlaşarak damar permeabilitesinin artması, koagülasyon ve fibrinolizis dengesinin bozulması, DIC gelişmesi, vasküler tonus regülasyonunun bozulması, direkt miyokardiyal supresyonun meydana gelmesi ile karakterizedir. Sonuç olarak, hemodinami ile hücre

oksijenasyonunun ileri derecede bozulmasıyla bir veya birkaç organda fonksiyon bozukluğu ortaya çıkmaktadır (Erhan ve Yaşar 1997).

2.2. DIC 'e sebep olan bazı bozukluklar;

Hem koagulasyon hem de fibrinolizis aktivasyonunun söz konusu olduğu DIC'in kronik (kompanse) formu; bakteriyel (gram negatif ve pozitif), viral (variola, rubella, arbovirus, enfeksiyöz kanin hepatitis, kanin herpes, kanin distemper, felin parvovirus, felin enfeksiyöz peritonitis, mavi dil, domuz kolerası vb), paraziter (malarya, kala-azar, babeziozis, tripanozomiazis, sarkositozis, leishmaniozis) ve hatta mikotik (histoplazma, c.albicans) etkenlerle başlatılabilmekte, ayrıca bir çok hastalıkta (malignantlar, allerjik reaksiyonlar, lökomi, obstetrik komplikasyonlar, siroz, vaskulitis, karaciğer hastalıkları, pankreatitis, gastrik dilatasyon, aflatoksikozis , çeşitli toksikozisler vb) şekillenebilmektedir. DIC'e sebep olan hastalığın şiddetine bağlı olarak koagulasyon faktörleri ve plateletlerin tüketimi, bunların sentez kapasitesini aşarsa DIC'in akut (dekompanse) formu şekillenmektedir. Bu durumda fizyolojik hemostaz sistemi bozulmakta, başlangıçta özellikle kapiller damarlarda yaygın fibrin birikmesi, daha sonraki dönemde ise diffüz kanama eğilimi ortaya çıkmakta ya da her iki bozukluk aynı anda şekillenebilmektedir (Mammen 1998, Müller-Berghaus ve ark 1999)

DIC'e sebep olan hastalık ve bozuklukların başlıcaları aşağıda belirtilmiştir:

a-Enfeksiyöz hastalıklar: Özellikle septisemi, DIC ile özdeşleştirilen en yaygın klinik bozukluktur. Hemen hemen bütün mikroorganizmalar (bakteri, virus, parazit ve mantarlar) DIC'e sebep olmakla birlikte söz konusu sendromun gelişmesinde en sık bakteriyel enfeksiyonlar rol oynamaktadır. Gram negatif bakterilerin sebep olduğu sepsis vakalarında hastaların %50'sinden fazlasında klinik olarak DIC gelişebilmektedir (Thijs ve ark 1993, Gando ve ark 1996, Levi ve ten Cate 1999). Bununla birlikte gram pozitif sepsiste de DIC oluşabilmektedir. Enfeksiyonlarda diffuz koagulasyon aktivasyonunun başlatıcısı, mikroorganizmaların hücre membranlarındaki spesifik komponentlerdir. Bunlar lipopolisakkarit yapısındaki endotoksin veya bakteriyel ekzotoksin (ör, stafilokokkal α hemolizin) olabilir. Söz konusu komponentler hastada sitokin sentezi aktivasyonu ile karakterize genel bir yangısal cevabı başlatmaktadır. Makrofaj ve lenfositlerden salınan Tümör nekrozis faktör (TNF, Tumor necrosis factor) ve diğer bazı sitokinler, monosit, makrofaj ve endotel hücrelerden Doku faktörü (TF, Tissue factor) salınımını artırarak ekstrinsik pıhtılaşma sisteminin aktivasyonuna neden olmaktadır (Pixley ve ark 1993, Dempfle ve ark 1995, Biomond ve ark 1995). DIC koagulasyon sisteminin alt üst olduğu hem koagulasyon sisteminin hem de fibrinolizisin birlikte aktive olduğu bir paradoks olarak kabul

edilmektedir. Koagülasyonun prokoagülanları ile antikoagülanları arasındaki dengenin sağlanması sepsiste mortaliteyi azaltabildiği bildirilmektedir (Hesseltvik ve ark 1989, Hack 1993, Levi ve ark 2001).

Sepsiste şekillenen değişikliklerden en önemlileri; lökosit, platelet ve hemostazis sisteminin aktivasyonu, kardiyovasküler bozukluklar, laktik asidozis, glukoz dishomeostazisi ile gastrointestinal, respiratör ve renal bozukluklar olarak sıralanabilir (van der Poll ve ark 1990, Wada ve ark 1993, Semrad 1993, Okajima ve ark 1996). Sepsis ve endotoksemi, gelişen DIC sebebiyle gerek insan gerekse hayvanlarda gelişme bozuklukları, multipl organ yetersizlikleri, şok veya ölüme yol açmakta, ayrıca hayvanlarda verim kayıplarına (süt verimi gibi) neden olarak önemli ekonomik zarara sebep olmaktadır. Örneğin; kolostrumla yeterli antibiyotik alamayan buzağular özellikle gram negatif endotoksemiye çok duyarlı olmakta ve bu hayvanlarda gelişen DIC ölümüyle sonuçlanmaktadır (Semrad 1993).

b-Şiddetli travma: Özellikle beyin travması ve çok odaklı şiddetli travmalarda gelişen DIC'te hemoliz ile endotelial hasar sonucu sistemik koagülasyon mekanizmasının aktive olduğu bildirilmektedir. Sepsiste olduğu gibi travmalı hastalarda da sitokinlerin sistemik aktivasyonu sözkonusudur. Şiddetli travmalarda DIC gelişim insidansı %50-70'dir (Levi ve ten Cate 1999).

c-Kanser: Hem katı tümörler hem de hematolojik kanserler DIC'i geliştirebilmektedir. Metastatik tümürlü ve akut lökositik hastaların yaklaşık %15'inde gelişen DIC'te koagülasyon sistemi aktivasyonu ile birlikte şiddetli hiperfibrinolitik durum sözkonusudur. Kanserli hastalarda koagülasyon sisteminin bozulma mekanizmasının tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan doku faktörünce başlatıldığı ileri sürülmektedir (Levi ve ten Cate 1999).

d-Obstetrik komplikasyonlar: Abruptiyon plasenta, amniyotik sıvı embolizmi, ölü fetus sendromu gibi doğumsal bozuklukların %50'sinden fazlasında DIC gelişmektedir. Plasenta orijinli tromboplastin benzeri proteinin ana kanına geçmesi muhtemel sebep olarak görülmektedir. Ayrıca preeklampside de DIC gelişebilmektedir (Rocha ve ark 1998, Levi ve ten Cate 1999).

e-Grant Hemangiomas (Kasabach-Meritt sendromu) ve Aortik aneurizma: Bu bozuklukta lokal olarak başlatılan koagülasyon aktivasyonu, aktif koagülasyon faktörleri ve plateletlerin tüketiminin yaygınlaşmasıyla sistemik bir hal almaktadır (Bick 1994).

f-Mikroanjyopatik hemolitik anemi: Bu bozukluk trombositopenik trombotik purpura, hemolitik-üremik sendrom, kemoterapi sonucu oluşan hemolitik anemi, malignant hipertansiyon ve HELLP sendromu (preeklampsıyla birlikte oluşan hemoliz, yüksek karaciğer

enzimi seviyesi ve düşük platelet sayısı ile karakterize) gibi bir grup hastalığı içermektedir. Mikroanjiyopatik hemolitik aneminin belirgin özelliği plateletlerin adezyon ve agregasyon özelliklerinin artması, trombin şekillenmesi ve fibrinoliz mekanizmasının bozulmasına sebep olan endotelyal zarardır. Başlıca bulgu; kan frotilerinde fragmanlı alyuvarların (Schistocytes) gözlenmesidir (Levi ve ark 1999).

g-Akut ve kronik bazı karaciğer hastalıkları: Şiddetli hepatik siroz, gebelik, yağlı karaciğer bozukluğu, viral hepatitis ile bazı ilaç, toksin veya enfeksiyonlara bağlı olarak gelişen akut karaciğer yetmezliği sonucu DIC oluşabilmektedir (Bick 1994).

h-Hemoliz: Hemoliz esnasında (örneğin hatalı kan transfüzyonları) alyuvarlardaki adenosin difosfat (ADP) veya alyuvar membran fosfolipoproteinleri prokoagulant sistemi aktive edebilmekte ve DIC gelişebilmektedir (Bick 1994).

ı-Renal hastalıklar: Glomerulonefritis, hemolitik üremik sendrom gibi bazı böbrek hastalıklarında ve özellikle hiperakut renal allograft rejeksiyonunda (antijen antikor reaksiyonu sonucu) böbrek arteriyol ve glomeruluslarında yoğun fibrin birikimi şekillenmekte, idrarda fibrinojen ve fibrin yıkım ürünleri (FDP, fibrin degradation products) görülmektedir. (Bick 1994).

j-Diğer hastalık veya bozukluklar; Endotelyal zarar oluşturduğu düşünülen asidozis, sebebi belli olmamakla birlikte alkalozis, polisitemi rubra vera, paroksizmal hemoglobinüri, allerjik vaskulitis, allerjik purpura, sarkoidozis, amiloidozis, AIDS, hiperproteinemik veya otoimmün hastalıklar ve yılan zehirleri de DIC oluşturabilmektedir. Ayrıca yoğun yanıklarda gelişen mikrohemolizler ile nekrotik yanık dokulardan sistemik sirkülasyona geçen doku materyali ve hücrel enzimler DIC’i başlatabilmektedir (Bick 1994).

DIC’e sebep olan ve yukarıda bazıları sıralanan hastalıkların etiyojileri farklı olmasına rağmen, bunların çoğunda koagülasyonun aktive edilmesindeki en önemli ortak faktör çeşitli sitokinlerin salınmasıdır (Wada ve ark 1993, Carey ve Rodgers 1998).

2.3. DIC Oluşumunda Lipopolisakkarit, Sepsis ve Septik Şok’un Önemi

Sepsis, septik şok ve organ yetmezliğine ilişkin klinik vakaların gerçek insidansı ülkemiz ve diğer ülkelerde bilinmemektedir. Bununla birlikte tüm dünyada septik şok insidansı özellikle son 20 senede gittikçe artmıştır. Son yıllarda antimikrobiyal tedavide çok önemli gelişmeler olmasına rağmen sepsis hala özellikle şok ve multiple organ yetersizliği durumunda ciddi hayati tehlike oluşturmaktadır (Hesselvik ve ark 1989, Hack 1993). ABD’de insanlarda septik şok nedeniyle şekillenen ölümler, 1980’de 94000, 1990’da 198000 ve günümüzde 300000 rakamlarına ulaşmıştır. Bu değerlerin gerek ekonomik önem taşıyan

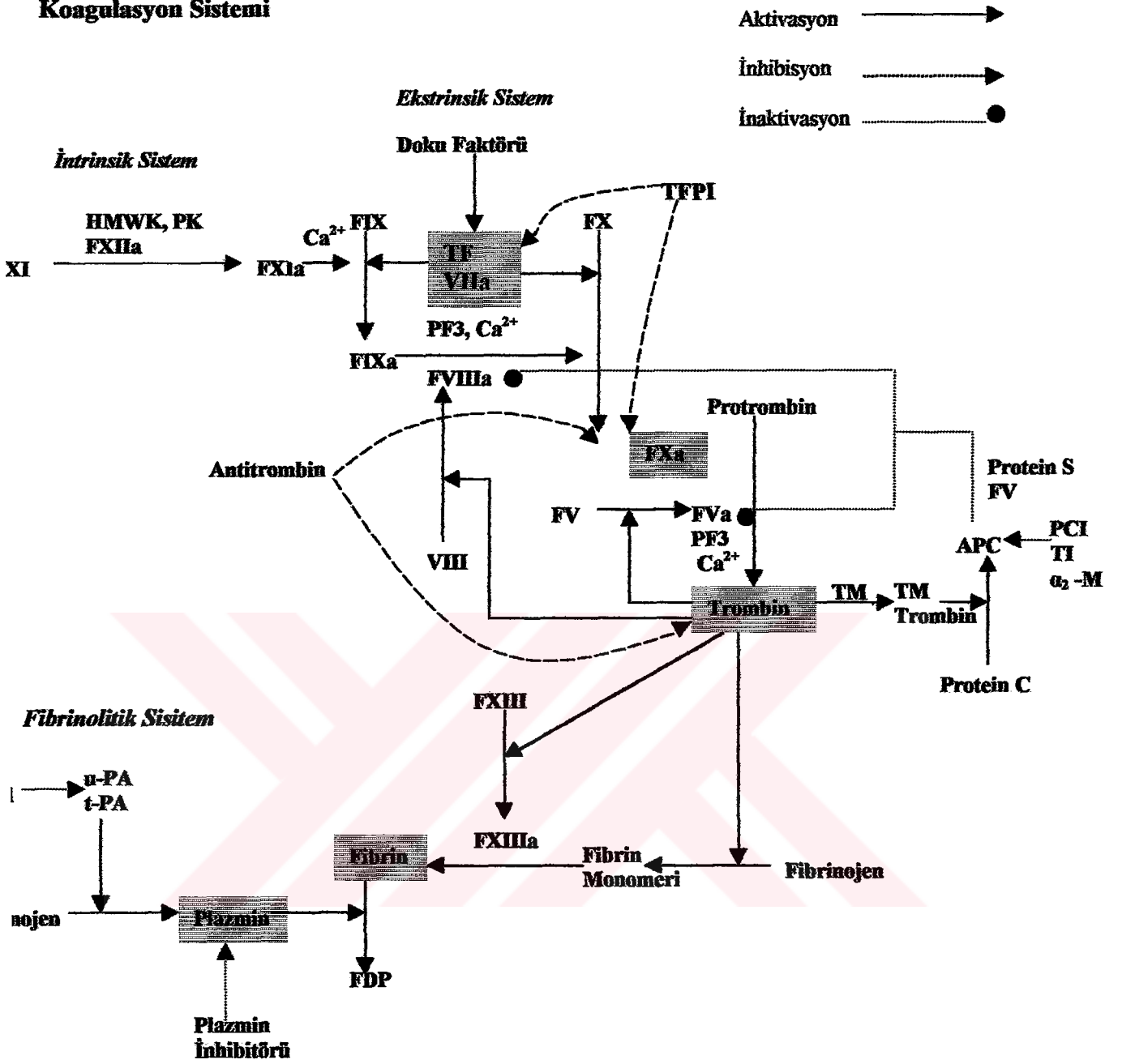
hayvanlarda ve gerekse pet hayvancılığında ne kadar olduğu kesin bilinmemesine rağmen septik şok sebebiyle her sene milyonlarca dolar kaybedildiği vurgulanmaktadır (Semrad 1993, DeLa Cadena ve Colman 1999).

Sepsisin etiyojisi ve patogenezi oldukça karmaşıktır. Gram negatif bakterilerde endotoksinin, gram pozitif bakterilerde teikoik asit/peptidoglikan kompleksinin, mantarlarda ise benzer yapıların başlattığı mikrobiyolojik ve metabolik olaylar septik şoka yol açmaktadırlar. Organizmanın yanıtı, mikroorganizmaların endo ve ekzotoksinlerine karşı mediyatörler salgılayarak ortaya çıkmakta ve DIC şekillenmektedir. Söz konusu mediyatörlerden en önemlileri interlökin-1 ve TNF sitokinleri olup bunların temel kaynağı daha çok monosit- makrofaj sistemidir (Erhan ve Yaşar 1997, Levi ve ten Cate 1999).

Sepsiste bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonun morbidite ve mortalitesi üzerinde bakterilerin (özellikle gram-negatif) membranlarındaki LPS yapısında olan endotoksinin önemli rolü olduğu bildirilmektedir. LPS üç bölge içermektedir; Lipit kısmı (Lipit A), Lipit A'ya bağlı olan oligosakkarit ile oligosakkarit polimeri (O antijen). Kanda LPS humoral ve sellüler etkiler oluşturmaktadır. Humoral seviyede LPS, kompleman sistemini aktive etmekte ve koagülasyon sisteminin farklı yollarını etkilemektedir. Doku faktörü ve FX'un aktivasyonu ile Antitrombin III'ün (ATIII) tüketimi sonucu fibrin şekillenmesini hızlandırarak ve plazminojen aktivatör inhibitör tip-1'in (PAI-1, Plazminogen activator inhibitor type 1) plazma seviyesini yükseltmesiyle de fibrin taşınmasını azaltarak DIC oluşumuna sebep olmaktadır. Hücresel seviyede ise LPS bir çok hücreyi stimüle ederek bazı aktif moleküllerin sekresyonuna yol açmaktadır. LPS ile etkileşimden sonra B lenfositler poliklonal olarak aktifleşmekte ve immunglobulinleri sekrete etmekte, mast hücreleri ve bazofiller kemotaktik faktör, histamin ve serotonin üretmekte, plateletler ise büyüme ve koagülasyon faktörlerini sekrete etmektedirler. Nötrofiller serbest oksijen radikalleri salarlarken monosit, makrofaj ve endotel hücreleri önemli ölçüde yangısal sitokinler üretmektedirler (Levi ve ark 1997, Hardaway 2000, Levi ve ark 2000).

Endotoksinin nanogram düzeyindeki miktarı bile hayvanlara enjekte edildiğinde deneysel septik şok şekillendirebilmektedir (Hardaway 2000). Alyuvar ve doku hücrelerinin membran bütünlükleri; travma, sıcak, soğuk, anoksi, virus, plazmodyumlar vb. tarafından, benzer şekilde bakteri hücre duvarları; antibiyotikler, antibadiler ve ısı tarafından bozulabilmektedir. Feola ve ark (1988), membran bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan aminofosfolipitlerin çok küçük miktarlarının bile intravasküler koagülasyona ayrıca trombositopeni, lökopeni, fibrinolizis ve kompleman sistem ile kinin sistemi

Koagulasyon Sistemi



Şekil 1: Koagulasyon Sistemi; Koagulasyon faktörleri romen rakamlarıyla gösterilmektedir (a = aktif). HMWK: Ağır molekül ağırlıklı kininojen, PK: Prekallikrein, TF: Doku Faktörü, TFPI: Doku Faktörü Yolu İnhibitörü, PF3: Fosfolipit, TM: Trombomodülin, PC: Protein C, APC: Aktif Protein C, PCI: Protein C İnhibitörü, TI: Tripsin İnhibitörü, α_2 -M: α_2 Makroglobulin, FDP: Fibrin Yıkım Ürünleri, PA: plazminojen aktivatörü (Carey ve Rodgers 1999).

aktivasyonuna neden olduğunu bildirmektedirler. LPS ile stimüle edilen hücrelerden salınan sitokinler farklı doku ve organların hücrelerini (lökositler, beyin, böbrek, karaciğer) aktive ederek sonuçta bazı metabolik, hormonal ve nöroendokrin değişikliklere yol açmaktadırlar. Bu nedenle sitokinler, hormon ve nörotransmitterler ile birlikte endotoksemiden sonra meydana gelen olaylar zincirinde primer mediyatörler olarak kabul edilmektedir. Güçlü lokal fonksiyonlarından dolayı mikrovasküleritede önemli anahtar rol oynayan ve nötrofillerden salınan prostaglandin ve lökotriyenler ile büyük ölçüde monosit ve makrofajlar tarafından salınan nitrik oksit gibi maddeler ise sekonder mediyatörlerdir (Levi ve ark 1997).

DIC'in patojenik mekanizmasının daha iyi ortaya konulabilmesi için deneysel modeller oluşturulmuştur. Deneysel bakteriyemi veya endotoksemi modeli in vitro ve in vivo olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmektedir. İn vitro model hücre kültür sistemini içermektedir. Örneğin, insan endotel hücre kültürleri bakteriyel endotoksine maruz bırakılmaktadır. Sonuçta endotel hücre yüzeyinde meydana gelen moleküler değişimin önemi üzerine bilgi edinilebilmektedir. Buna karşın elde edilen sonuçların canlıya yansıtılmasındaki bazı eksik nokta ve zorluklar nedeniyle rat ve tavşan gibi küçük hayvanlar ile baboon ve şempanze gibi maymunlar üzerinde in vivo çalışmalar tercih edilmektedir (Ten Cate ve ark 1993, Levi ve ark 1994, Levi ve ark 1997). İn vivo model birkaç şekilde oluşturulabilmektedir; bakteri ile oluşturulan model, bakterinin donmuş olarak depo edilmesi, kullanılmadan 18-24 saat önce kültürde çoğaltılması, yıkama işlemine tabi tutulması, bakteri kolonilerinin belirlenip sayılması gibi işlemlerden dolayı uzun zaman gerektirmektedir. Diğer bir sepsis modeli sekal ligasyon ve perforasyon modelidir ki buda uygulama zorluğu nedeniyle pek tercih edilmemektedir. Deneysel modeli LPS ile oluşturmanın ise bazı avantajları bulunmaktadır; LPS'nin stabil ve saf bir bileşik olması, kullanılabildiği kadar liyofilize formda depo edilebilmesi deneysel model oluşturmayı kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle model oluşturmada daha çok LPS kullanılmaktadır (Fink ve Heard 1990).

2.4. DIC'te Sitokinlerin Mediyatör Etkisi

İmmun sistemin uyarana karşı oluşan yanıtında, bir çok farklı mediyatör molekülün sentez ve aktivasyonu söz konusu olmaktadır. Bu mediyatör moleküllerin büyük bir bölümünü çeşitli hücrelerce sentezlenen sitokinler oluşturmaktadır. Sitokinler immün yanıtta, yangıda, koagulyasyonda, hematopoezde, sistemler ve hücreler arasındaki biyolojik ilişkilerde ve temelde organizmanın zararlıya karşı savunulmasında çok önemli görevlere sahiptirler. Sitokinler, bazı fizyolojik fonksiyonları yanında, immün yanıtın tipini, başlamasını, süresini ve efektör mekanizmalarını da regüle etmektedir. Buna karşın aşırı sentezlendikleri takdirde,

patogenezisi de indükleyebilmektedirler. Belli bir hücre tipi, birbirine sinerjik ya da antagonist davranabilen bir çok sitokin molekülünü sentezleyebilmektedir. Farklı sitokinler aynı hücrede değişik etkiye sahip olabildikleri gibi, bir sitokin değişik hücrelerde farklı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin; IL-1 hepatositlerde akut faz proteinleri, endotelde adezyon molekülleri, makrofajlarda ise NO sentezini indüklemektedir. Sitokinlerin katıldığı tüm immun yanıtların optimizasyonu çoğu kez yarar ile zarar arasındaki dar bir aralığa sıkışmış bulunmaktadır (Erhan ve Yaşar 1997).

Endotoksinin toksik etkisinin sitokinlerce ayarlandığını gösteren birçok laboratuvar ve klinik kanıt bulunmaktadır. Septik hastalarda belirlenen bu sitokinlerden en önemlileri TNF-I, IL-1 ve IL-6 dır. Deneysel endotoksemide birçok sitokinin serum düzeyinde geçici bir artış şekillendiği ve septik sendromun gelişiminde bu proteinlerin önemli rolü olduğu bildirilmektedir (Michie ve ark 1988, Van Devender ve ark 1990, Levi ve ark 1997). Endotoksin infüzyonunu izleyen 90. dakikada serum TNF düzeyi artarak pik yapmakta daha sonra kademeli olarak azalmakta, 120. dakikada ise IL-6 ve IL-8 en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Ayrıca baboonlarda yapılan deneysel sepsis modelinde IL-1 seviyesinin de yüksek bulunduğu kaydedilmektedir (Jansen ve ark 1995).

Günümüzde sepsiste koagulasyon ve fibrinolizisin patogenezisi üzerinde yapılan bir çok çalışma, sitokinlerin rolü üzerinde odaklanmaktadır (Michie ve ark 1988, Van Devender ve ark 1990, Jansen ve ark 1995, Levi ve ark 1997). Bakteri veya endotoksin infüzyonundan sonra sirkülasyonda belirlenen ilk sitokinin TNF olması ve bunun güçlü bir prokoagulant etkiye sahip olması koagulasyon aktivasyonunun TNF tarafından başlatıldığı kanısını uyandırmıştır. TNF- α 17 kD moleküler ağırlıkta güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. TNF'nin başlıca hücresel kaynağı monositler ve doku makrofajları olmasına rağmen bu sitokin birçok hücre tipi tarafından da sentezlenebilmektedir (Vassali 1992). İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinde yapılan in vitro çalışmalarda TNF'nin doku faktörü oluşumunu sitümüle ederek koagulasyon aktivasyonunu sağladığı ve endotel hücrelerde trombomodulin oluşumunu engelleyerek özellikle Protein C/S sistemini içeren antikoagülan mekanizmayı inhibe ettiği bildirilmektedir (Nawroth ve Stern 1986, Conway ve Rosenberg 1988, Gregory ve ark 1989).

TNF doku faktörü oluşumunu artırarak ekstrinsik koagulasyon mekanizmasını başlatabilmektedir (Nawroth ve Stern 1986, Aderka 1991, Müller-Berghaus ve ark 1999). Ayrıca TNF ile stimüle edildiklerinde endotel hücreleri büyük miktarlarda platelet aktive edici faktör (PAF, Platelet activating factor) oluşturmaktadır (Levi ve ark 1997). PAF, plateletlerin kemotaksizi, agregasyonu ve degranülasyonundan sorumludur. Ayrıca süperoksit radikalleri

oluşturmak için direkt olarak polimorfnükleer lökositleri de (PMNL) stimüle etmektedir. PAF, pıhtı oluşumunda predispoze kabul edilen elastazın endotelial hasar oluşturmasını da kolaylaştırmaktadır (Weiss 1989). PAF'ın deneysel gram-negatif sepsisteki olumsuz etkisinin PAF reseptör antagonistleri ile düzeltilebildiği kaydedilmektedir (Han ve ark 1999). TNF prokoagulan aktiviteyi artırırken aynı zamanda antikoagulan mekanizmayı inhibe etmektedir. TNF'nin trombomodulin yıkılımını artırdığı ve hücre yüzeyindeki trombomodulin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Sonuçta trombomoduline bağımlı olan protein C aktivasyonu önlenmektedir. Protein C'nin yokluğunda ise aktif pıhtılaşma faktörlerinden Va ve VIIIa nötralize edilememektedir. Buna ilaveten yine protein C yokluğunun bir sonucu olarak, PAI nötralize edilememekte, ayrıca TNF'nin de direkt etkisiyle PAI oluşumu artmakta aynı zamanda doku plazminojen aktivatörü (t-PA, Tissue- plasminogen activator) oluşumu da azalmaktadır (Nawroth ve Stern 1986, Rocha ve ark 1998).

TNF'nin koagülasyon aktivasyonunu başlatmada önemli bir rol oynadığı; purifiye rekombinant TNF enjekte edilen kanser hastaları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarla teyid edilmiştir (Bauer ve ark 1989, van der Poll ve ark 1990). Monositlerin gen aktivasyonunu baskılayan ve bir ksantin oksidaz inhibitörü olan Pentoksifilin koagülasyon aktivasyonunu önleyebilmesi, bakteriyemi veya endotoksemiye bağlı gelişen prokoagulant cevapta TNF'nin başlıca düzenleyici rolünün göstergesi olarak yorumlanmıştır (Levi ve ark 1994). Buna karşın endotoksin uygulamasıyla plazma düzeyi yükselen TNF' yi nötralize eden monoklonal antibadilerle yapılan çalışmalarda koagülasyon aktivasyonunun değişmediği izlenmiştir (Levi ve ark 1997). Yine benzer şekilde letal dozda E.coli infüze edilen baboonlarda anti-TNF antibadisi uygulamasının koagülasyon aktivasyonunu etkilemediği anlaşılmıştır (Hinshaw ve ark 1990). Söz konusu çalışmalarda elde edilen bu son bulgular; koagülasyonun endotoksin ile aktive edilmesinden sorumlu başlıca mediyatörün TNF olmadığını ortaya koymuştur. Pentoksifilin yukarıda bahsedilen koagülasyonu önleyici etkisinin ise daha ziyade IL-6 veya direkt doku faktörü üzerine olan inhibitör etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmüş (Levi ve ark 1994) ve daha sonra gerçekleştirilen çalışmalar IL-6 üzerinde yoğunlaşmıştır. IL-6'nın 23-30 kD moleküler ağırlıkta bir glikoprotein olduğu ve septik hastaların kanında yüksek düzeyde bulunduğu bildirilmektedir. Şempanzelerde monoklonal anti-IL-6 antibadisi infüzyonu uygulamasının endotoksin ile aktive edilen koagülasyonu tamamen durdurduğu kaydedilmektedir (van der Poll ve ark 1994). Ayrıca rekombinant IL-6 alan kanser hastaları üzerinde yapılan son çalışmalarda trombin oluşumunun hızlandığı gözlenmiştir (Levi ve ark 1997). Bu sonuçlar; sepsiste TNF'nin koagülasyon aktivasyonunu başlatabildiğini, fakat esas prokoagulan cevap oluşumunda IL-6 mediyatörünün rol oynadığını göstermektedir.

TNF'nin koagulasyondan ziyade fibrinolizisten sorumlu başlıca mediyatör olduğu da düşünülmektedir. Örneğin; insanlarda yapılan bir çalışmada TNF infüzyonu sonucunun; bakteriyemi veya endotoksemideki gibi önce plazmin oluşumu başlangıç aktivasyonu ve sonra da inhibisyonu safhalarından oluşan fibrinolitik cevapla aynı olduğu bildirilmektedir (van der Poll ve ark 1991). TNF'nin monoklonal antibadilerce bloke edildiği hayvanlarda endotoksin uygulaması fibrinolitik aksiyonu tamamen ortadan kaldırmaktadır. Buna karşın IL-6 aktivitesinin bloke edilmesi sonrası endotoksin uygulamasının fibrinoliz aktivasyonu ve inhibisyonu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Biomond ve ark 1995, van der Poll ve ark 1994). Sonuç olarak; TNF fibrinolizis üzerine etkili başlıca mediyatör olmakla birlikte in vivo etki mekanizması net olarak ortaya konulmamıştır (Müller-Berghaus ve ark 1999).

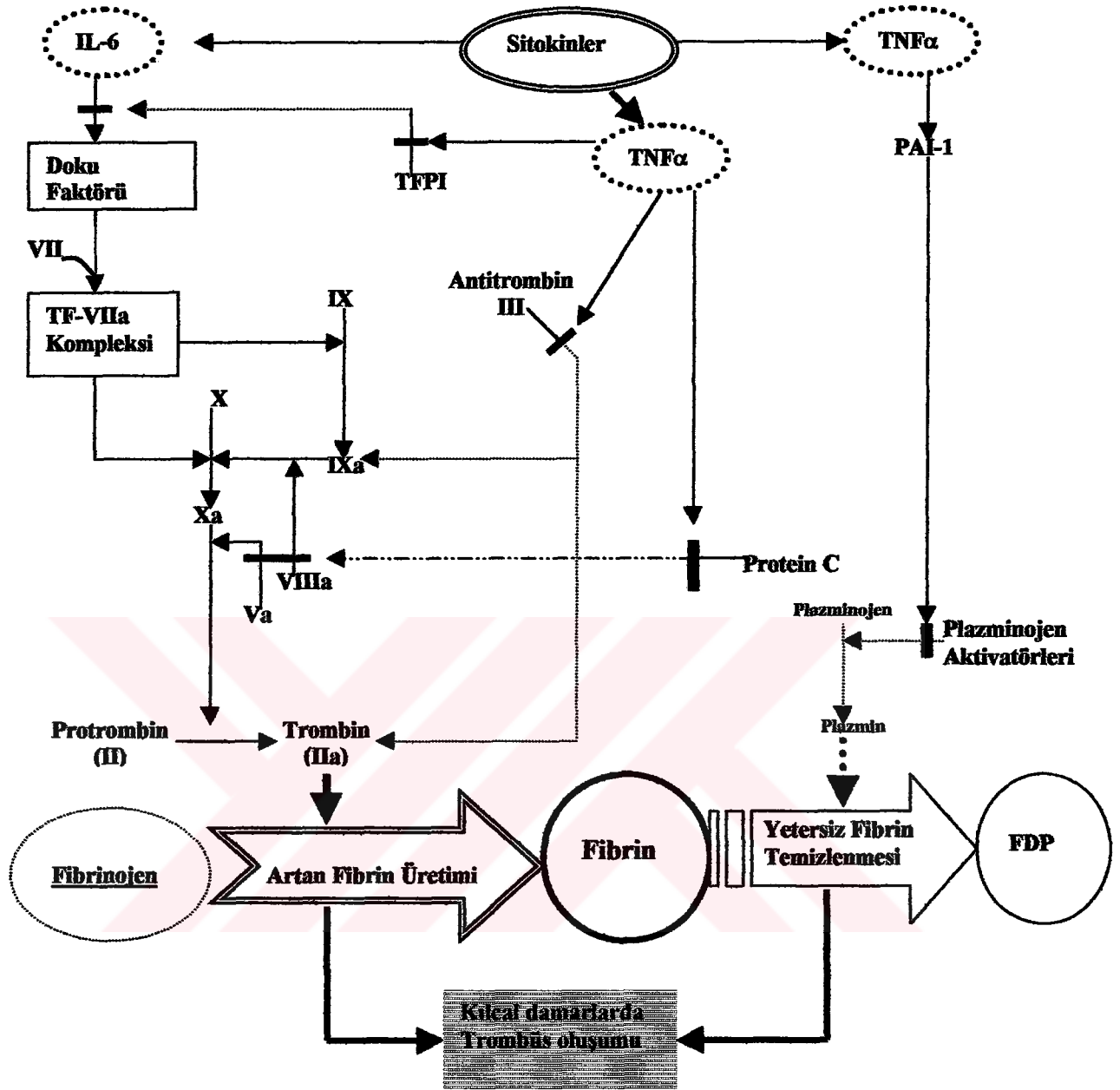
Endotoksemide koagulasyon ve fibrinolitik cevabın başlatılmasında TNF ve IL-6'ya oranla IL-1 ve IL-8'in rolünün daha az olduğu bildirilmektedir. Şempanzelerde yapılan bir çalışmada, spesifik monoklonal antibadisiyle IL-8'in bloke edilmesinin koagulasyon ve fibrinolizis üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüş, buna karşın IL-1 ile yapılan in vivo çalışmada bu sitokinin önemli bir prokoagülan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Bevilacqua ve ark 1984, Levi ve ark 1997). Baboon sepsis modelinde, rekombinant IL-1 reseptör antagonisti uygulanmasıyla in vivo IL-1 aktivitesinin bloke edilmesinin, plazma trombin-antitrombin kompleksi (TAT, Thrombin-antithrombin complex) ve Plazmin-antiplazmin kompleksi (PAP, Plasmin- α_2 -antiplasmin complex) konsantrasyonları ile t-PA ve PAI-1 düzeylerini azaltarak koagulasyon anormalliklerini düzelttiği görülmüştür (Levi ve ark 1997). Anti-enflamatuvar sitokin olarak adlandırılan IL-10 ise koagulasyon aktivasyonunu düzenleyen faydalı bir sitokindir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada rekombinant IL-10 infüzyonunun, endotoksinle oluşturulan koagulasyon ve fibrinolizis ile ilgili bozuklukları tamamen ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. DIC'in patojenezisinde bu sitokinin düzenleyici rolü üzerinde yapılacak çalışmaların gerekli olduğu düşünülmektedir (Levi ve ark 1994, Levi ve ark 1997).

Sonuç olarak; DIC'te koagulasyon ve fibrinolizis mekanizmalarının bozulmasında sitokinlerin önemli rol oynadığı, koagulasyon aktivasyonunda özellikle IL-6, antikoagülan mekanizma ve fibrinolizisin bozulmasında ise başlıca TNF'nin etkin olduğu anlaşılmaktadır (Levi ve ark 1997, Weiss ve Rashid 1998).

Doku Faktörünce düzenlenen
Trombin oluşumu

Antikoagulant Sistemin
Bozulması

Fibrinolizisin
Basklanması



Şekil 2: DIC'te sitokinlerin rolü; başlıca İnterlökin-1 (IL-1) ve Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınması ile DIC'te trombus oluşumu başlatılmaktadır. IL-6 ve diğer sitokinler tarafından stimüle edilen aktif mononükleer hücreler ve endotel hücrelerin yüzeyi üzerinde Doku Faktörü (TF) şekillenmektedir. Doku Faktörü , TF-FVIIa kompleksini oluşturmak için FVII'ye bağlanmaktadır. Bu kompleks FX'u direkt olarak veya FIXa ve VIIIa aracılığıyla indirekt olarak aktifleştirmektedir. FXa'nın FVa ile oluşturdukları kombinasyon Protrombini Trombine dönüştürmektedir. Vücudun başlıca üç fizyolojik antikoagulant sisteminin (ATIII, Protein C ve TFPI) bozulması da yine TNF- α 'nın salınımıyla başlatılmaktadır. Özellikle TNF- α 'nın etkilemesi sonucu plazma düzeyi yükselen PAI-1 ile fibrinolizis basklandığı için intravasküler fibrin oluşumu ve oluşan fibrinin yeterli bir şekilde temizlenmesi arasındaki denge bozulmaktadır. Artan PAI-1 plazmin oluşum derecesini azaltarak plazminojen aktivatör aktivitesini inhibe etmektedir. Sonuç olarak mikrovasküleritede fibrin birikimi oluşmakta ve perfüzyon engellenmektedir (Levi ve ten Cate, 1999).

2.5. Endotoksemi ve DIC'de Koagülasyonun Aktivasyonu ve İnhibisyonu

Yaşamsal önemi büyük olan kan pıhtılaşması, organizmanın en önemli fizyolojik reaksiyonlardan biridir (Deniz 2000).

İnsanlar ve evcil hayvanlarda pıhtılaşma, çoğu karaciğerde sentez edilen ve glikoproteinlerden oluşan pıhtılaşma faktörlerinin bir takım sistemler tarafından aktive edilmesi sonucu gelişmekte ve antikoagülatif sistemler aracılığı ile de (antitrombin III, protein C ve S) dengede tutulmaktadır (Green 1989, Deniz 2000).

Kanın pıhtılaşması endojen (intrinsik) ve eksojen (ekstrinsik) olmak üzere iki temel sistemin aktive edilmesiyle gerçekleşmektedir. Bu yollar protrombinin trombine aktivasyonunu ve fibrin pıhtısı teşkil etmek üzere fibrinojenin trombin tarafından katalizlenen parçalanmasını kapsayan bir ortak sonda birleşmektedir (Feldman 1992).

Intrinsik pıhtılaşma mekanizması FXII, XI, IX, VIII ve X ile prekallikrein, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (AMK, high-molecular weight kininogen), Ca^{++} ve trombosit fosfolipitlerini kapsamakta, FXa'nın oluşumu ile de sonuçlanmaktadır. Kanın yabancı bir yüzey (lam, lamel, cam tüp gibi ıslanabilir yüzeyler), fosfolipitler (trombosit F-3), kollajen, bentonit, kaolin gibi bazı maddelerle, uzun zincirli doymuş yağ asitleri ya da zedelenen damarda endotelaltı doku ve kollajenle deği durumuna gelmesi sonucunda FXII aktif duruma (FXIIa) geçerek intrinsik pıhtılaşma mekanizmasını başlatmaktadır. FXIIa prekallikreini kallikreine dönüştürmektedir. Kallikrein geri bildirimle tekrar FXII'yi aktif hale dönüştürdüğü gibi kininojeni kinine çevirerek de kemotaksi uyarısının oluşmasını sağlamaktadır. Kallikrein ayrıca FVII'yi de etkinleştirerek intrinsik ve ekstrinsik mekanizma arasında bir bağ oluşumunu sağlamaktadır. İntrinsik sistem, sırasıyla; FXIIa'nın FXI'i, FXIa'nın kalsiyumun varlığında FIX'u, FIXa'nın FVIII'i, FVIIIa'nın ise Ca^{++} ve fosfolipitler eşliğinde FX'u aktif şekle (FXa) dönüştürmesi sonucunda, ekstrinsik sistem ile birleşmektedir (Feldman 1992, Yılmaz 2000).

Protrombin aktivatörü oluşumunu başlatan ekstrinsik mekanizma; damar duvarı veya ekstravasküler dokuların zedelenmesi ya da endotoksin gibi intravasküler ajanlarla endotelial zarar oluşması sonucu açığa çıkan doku tromboplastininin (FIII) FVII'yi aktive etmesi ile başlamaktadır. Doku tromboplastini, FVIIa ve Ca^{++} iyonları ile birlikte FX'u aktifleştirmekte ve oluşan FXa ya doku fosfolipitleriyle ya da trombositlerden salınan fosfolipitlerle birlikte FV ile birleşerek protrombin aktivatörü denen kompleksi oluşturmaktadır. Birkaç saniye içinde bu kompleks protrombini trombine dönüştürmektedir. Trombinin etkisi ile fibrinojen molekülünden düşük molekül ağırlıklı peptitler ayrılmaktadır. Geride kalan kesim fibrin monomeridir. Bundan sonra fibrin monomerleri hidrojen bağları ile polimerize olarak fibrin

polimeri oluşmaktadır. Trombin ile aktif duruma getirilmiş olan FXIIIa ise kalsiyum ya da magnezyumlu ortamda, fibrin polimerinin dayanıklı fibrin pıhtısına dönüşmesini sağlamaktadır (Yılmaz 2000, Deniz 2000).

Pıhtılaşma mekanizmasında kullanılan Ca^{++} iyonları özellikle protrombin aktivatör kompleksi oluşumunda etkindir. Ca^{++} eksikliğinde teorikte pıhtılaşma olmaz. Ancak vücutta Ca^{++} düzeyi sıkı bir kontrol içindedir ve hiçbir zaman kanın pıhtılaşma kinetiğini etkileyecek düzeylere düşmemektedir (Guyton ve Hall 1996).

Sepsiste şekillenen hematolojik değişikliklerden bazıları; lökositlerin, plateletlerin ve hemostazis sisteminin aktivasyonu olarak sıralanabilir. Gram-negatif sepsis en iyi bilinen şekli olmasına rağmen gram pozitif bakteriler, endotoksinler ve viruslar gibi başlıca enfeksiyon etkenleriyle de DIC başlatılmaktadır. Endotoksinin insan ve primatlara intravenöz uygulanmasından yaklaşık 3-5 saat sonra plazma protrombin fragment F1+2, trombin-antitrombin kompleksi (TAT) ve fibrinopeptit A (FpA, fibrinopeptide A) düzeylerinin pik yapmasıyla karakterize koagulant bir cevap şekillenmektedir (Taylor ve ark 1987, Van Devender ve ark 1990, Levi ve ark 1994, Levi ve ark 1997). Septik durumlarda DIC'in gelişimi üzerinde önemli etkilerinin bulunacağı varsayılarak koagülasyonun ekstrinsik olarak mı yoksa intrinsik yolla mı başladığına yönelik bazı araştırmalar yapılmıştır. Önceleri DIC'in gelişim mekanizmasında FXII'nin direkt aktivasyonunun söz konusu olduğu (intrinsic sistem aktivasyonu) ayrıca prokoagülan salınımı, plateletlerin aktivasyonu, endotoksinlerin endotelial zarar oluşturması ve granülosit prokoagülan materyal salınımı (özellikle elastaz) gibi gelişim aşamalarının bulunduğu kabul edilmekteydi. Son yıllarda ise septik hastalarda DIC gelişiminin başlıca doku faktörünün salınımından yani pıhtılaşmanın ekstrinsik sisteminin aktivasyonundan (doku faktörü/FVIIa) dolayı gerçekleştiği bildirilmektedir (Dempfle ve ark 1995). Nitekim insanlarda oluşturulan deneysel endotoksemi veya endotoksemi esnasında şekillenen bir mediyatör olan proinflamatory sitokin tümör nekrozis faktör (TNF)'ün insanlara infüze edilmesiyle kontakt sistemin hiç etkilenmediği görülmüştür (van der Poll ve ark 1990, Levi ve ark 1997). Ayrıca bakteriyemik baboonlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada monoklonal antitrombinlerin FXIIa'yı bloke ve kontakt sistemi inhibe etmelerinin koagülasyonun aktive olmasını engellemediği belirtilmektedir (van der Poll ve ark 1990, Pixley ve ark 1993, Levi ve ark 2000). Yine yapılan bazı araştırmalarda spesifik olarak oluşturulan monoklonal antitrombinlerle doku faktörü/FVIIa yolunun inhibe edilmesinin, endotoksin uygulanan şempanzelerde trombin oluşumunu tamamen durdurduğu, E.coli infüze edilen baboonlarda ise DIC oluşumunu ve mortaliteyi engellediği bildirilmektedir (Taylor ve ark 1991b, Levi ve ark 1994, Levi ve ten Cate 1999). Yine Wada ve ark (1996) DIC'li

hastaların plazmasında doku faktörü antijeninin varlığını ortaya koyarak yaptıkları çalışmada koagülasyon aktivasyonunun doku faktöründen köken aldığını kaydetmektedirler.

Koagülasyonun başlamasında kontakt sistemin direkt bir rolü bulunmamakla birlikte söz konusu sistemin diğer yangısal cevaplarda önemli bir yerinin olduğu ortaya konmuştur (Levi ve ark 1994). Septik hastalarda FXII ve prekallikreinin plazma düzeyleri düşük bulunurken, kallikrein ile FXII'nin C1 inhibitörü ile yaptıkları komplekslerin plazma seviyeleri yüksek belirlenmiştir (Levi ve ten Cate 1999). Bu bulgular da septik hastalarda kontakt sistemin, koagülasyon aktivasyonuna karışmamasına rağmen, aktive edildiğini göstermektedir. FXIIa'nın dolayısıyla kontakt sistemin nötralize edici antibadilerle bloke edilmesi, E.coli ile oluşturulan letal hipotansiyonun oluşma oranında azalma ile sonuçlanmıştır. Bu bilgiler; septik hastaların hemodinamik düzensizliğinde kontakt sistem aktivasyonunun önemli bir yeri bulunduğunu ve söz konusu aktivasyonun bradikinin gibi kininler aracılığıyla ayarlandığını düşündürmektedir (Nuijens ve ark 1988).

Kinin sisteminin aktivasyonu, DIC'in klinikal sonucunu ciddi olarak etkileyen önemli bir patofizyolojik gelişmedir. DIC'te FXIIa'nın oluşması ile prekallikrein kallikreine dönüşmekte ve daha sonra yüksek moleküler ağırlıklı kininojen kinine dönüşmektedir. Sonuçta vasküler permeabilite artmakta, hipotansiyon ve şok gözlenmektedir (Bick 1994).

DIC'te olduğu gibi plazmin sistemik olarak sirkülasyonda bulunduğunda, hem kompleman 1'i (C-1, complement 1) hem de C-3'ü aktive etmekte, sonuçta C-8 ve C9'un aktivasyonu gerçekleşmekte, nihayetinde alyuvar ve platelet liyzişi şekillenmektedir. Alyuvarların lize olması sonucu salınan alyuvar ADP ve membran fosfolipitleri prokoagulant role sahiptirler. Ayrıca plateletlerin liyzişi sonucunda da prokoagulant materyal artmakta ve trombositopeni oluşumu hızlanmaktadır. Kompleman sistemin aktivasyonu vasküler permeabiliteyi artırmakta ve sonuçta yine hipotansiyon ile şoka sebep olmaktadır (Bick 1994).

2.6. Endotoksemide Fibrinolizis Aktivasyonu ve İnhibisyonu

Sepsis ile fibrinolitik sistem arasındaki ilişki uzun süreden beri bilinmektedir. Endotoksemide fibrinolitik sistemin etkilendiği ilk önce Suffredini ve ark (1989) tarafından ve daha sonra diğer bazı araştırmacılar (Biomond ve ark 1995, Masters ve ark 1996 b) tarafından gösterilmiştir. Endotoksemide kanda doku tipi ve ürekinaz tipi plazminojen aktivatörleri düzeylerinde hızlı bir artış şekillenmektedir (Spero ve ark 1980). Söz konusu artış plazmin oluşumunu artırmakta, sonuç olarak da plazmin- α_2 -antiplazmin (PAP) kompleksinin plazma

düzeıı yükselmektedir. Deneysel bakteriyemi ve endotoksemide; endotel hücrelerden plazminojen aktivatörlerinin salınımından dolayı fibrinolitik aktivasyon hızlanmakta (Voss ve ark 1990), plazminojen aktivatörlerindeki artıştan yaklaşık 1saat sonra ise PAI-1'nin plazma seviyesindeki yükselişten dolayı baskılanmaktadır (Biomond ve ark 1995). Bu durum mikrosirkülasyonda fibrin birikmesine dolayısıyla doku işemisine ve sonuçta da organ yetersizliğine neden olmaktadır (Müller-Berghaus ve ark 1999). Endotoksemik hastalarda PAI-1; zarara uğramış endotel hücrelerden, lökositlerden, plateletlerden ve hepatositlerden salınmaktadır (Levi ve ark 1999). PAI-1 salınımına ise endotoksin, IL-1 ve 6 ile TNF- α ve trombinin neden olduğu düşünölmektedir (Okajima 1999). Fibrinolizis inhibisyonunda trombin etkisiyle ve feed back aktivasyon yoluyla şekillenen FXI'in de rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca söz konusu inhibisyonunda yine trombin tarafından ürekinaz plazminojen aktivatörlerinin inaktivasyonu yanında FXIII'ün aktivasyonu da etkili olmaktadır (Meijers ve Bouma 1999).

DIC'te fibrinolizis aktivasyonu üst düzeyde olup sirkülasyonda serbest plazmin seviyesi oldukça yüksektir. Serbest plazminin fibrinojen ve fibrini parçalamasıyla şekillenen fibrin yıkım ürünleri (FDP) ise platelet agregasyonu, fibrin polimerizasyonu ve trombin aktivitesini engellemekte ve sonuçta kanama süresinin uzamasına neden olmaktadır (Bick 1994).

Deneysel endotoksemide çok ilginç bir şekilde ; anti-doku faktörüyle veya anti-VIIa monoklonal antibadilerce ya da spesifik trombin inhibitörü olan hirudin (Levi ve ten Cate 1999) ile koagulant cevabın inhibe edilmesinin fibrinolitik sistemin aktivasyonu veya inhibisyonunu etkilemediğı görölmüştür. Bu gözlemlerden de koagülasyon ve fibrinolizis üzerine endotoksin ile oluşturulan etkinin birbirinden bağımsız bir şekilde regüle edildiğı sonucu çıkarılmaktadır.

Koagülasyonun maksimal aktivasyonunda fibrinolitik sistemin genellikle devre dışı kaldığı deneysel olarak gösterilmiştir (Taylor ve ark 1987). Septik hastalarda kanda PAI-1 konsantrasyonunun (> 5 U/mL) yükselmesi ölümlle sonuçlanabilmektedir (Masters ve ark 1996 b).

2.7. Koagülasyon ve Fibrinolizisdeki Lokal Farklılıklar

DIC'in oluşum ve gelişimini kapsayan mevcut bilgilerin çoğı deneysel modellerin ve bunlardan elde edilen plazmaların incelenmesine dayanmaktadır. Endotoksemik hayvanlarda yapılan çalışmalarda, değışik organlarda koagölan, antikoagölan ve fibrinolitik faktörlere

ilişkin bir çok farklılık gözlenmekte olup her organın DIC gelişimine kendine özgü bir cevap verdiği belirtilmektedir. Örneğin; böbrek ve adrenlerdeki; fibrin birikiminin, kanda ürekinaz tipi plazminojen aktivatörleri düzeyindeki düşüştü, bronkoalveoler fibrin oluşumunun ise PAI-2'nin düzeyinin yükselmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Nitekim PAI-1 geni olmayan transgenik bir fareye endotoksin verildiğinde böbrekte fibrin birikimi oluşmamış ve fibrin birikiminde plazminojen aktivatör sisteminin önemli bir rolü olduğu kanısına varılmıştır (Peetre ve ark 1988).

Vücutta vasküler sistemde de bazı hemostatik faktörler farklılık arz etmektedir. Örneğin; farede von Willebrand faktör (vWF, von willebrand factor) oluşumu akciğer ve beyinde yüksek iken böbrek ve karaciğerde düşüktür. Bu organlar için söz konusu olmak üzere vWF oluşumu arteriyel endotelyuma göre venöz sistemde daha yüksektir (Gross ve Aird 2000). tPA oluşumu beyinde en yüksek iken bunu sırasıyla adipoz doku, kalp, böbrek, testis ve akciğer izlemektedir. PAI-1 (mRNA) seviyesi aortta en yüksek seviyededir. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü (TFPI, Tissue factor pathway inhibitor) mikrovasküler endotelyumda, trombomodulin ise beyin haricinde bütün vasküler sistemde önemli düzeyde oluşmaktadır. Endotoksinin sistemik yayılımı kalp ve böbrek hariç çoğu organda vWF'nin düşüşü ile sonuçlanmaktadır. Benzer şekilde endotoksine cevap olarak PAI-1 oluşumu, organdan organa farklılık arz etmekte ve karaciğerde yüksek seviyede oluşurken beyinde belirlenmemektedir. Yine endotelial adeziv proteinler için de vasküler farklılıklar sözkonusudur. Örneğin LPS uygulamasından sonra P-selektin (platelet yüzeyindeki glikoprotein reseptör) zamana bağlı olarak en fazla kalp ve midede histamin uygulamasından sonra ise hızlı bir şekilde mezenter ve akciğerde oluşmaktadır. LPS uygulamasından sonra akciğer ve ince barsaklarda maksimum düzeyde E-selektin (endotelial glikoprotein reseptör) oluşumu da indüklenmektedir. Yalnız başına TNF- α uygulaması hayvanların renal arterinde E-selektin ve ICAM-1 (intersellüler adezyon molekülü-1) oluşumunu başlatırken TNF- α ile birlikte IL-1 uygulaması akciğer mikrosirkülasyonunda adezyon moleküllerinin oluşumunda rol almaktadır. Damar duvarı tonusunu ayarlama önemli rolleri olan NO, prostasiklin, PAF ve endotelin-1 gibi maddelerin endotel hücrelerce salınma miktarlarının organdan organa farklılık göstermesi ise hemostazisin lokal regülasyonunda öneme sahiptir (Gross ve Aird 2000).

2.8. DIC'te Lökositlerin Rolü

Lökositler enfeksiyöz ve yangısal hastalıklarda vücudun savunmasında çok önemli role sahiptirler. Buna karşın söz konusu hücreler sistemik yangısal cevap sendromuna (SIRS) katılmakta ve doku hasarının oluşumuna da neden olmaktadır. Enfeksiyonlar, işemi, yanık ve travma gibi ağır klinik şartlar sistemik yangısal reaksiyonlar doğurmaktadır. Bu reaksiyonlarda lökositler serbest oksijen radikalleri ve nötrofilik enzimler salarak doku hasarıyla sonuçlanan bir dizi karışık mekanizmada yer almakta ve bunun sonucunda DIC' in patogenezinin oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (Gaviria ve ark 1998).

Polimorfmononükleer (PMN) lökositler normal olarak sadece kanda ve kemik iliğinde bulunurlar. Mikroorganizma herhangi bir dokuya girdiğinde makrofajlar bir taraftan mikroorganizmayı fagosite ederken, diğer taraftan da kimyasal sinyaller salarak (chemoattractant) sirkülasyondaki PMNL lökositlerin yangısal alana migrasyonu ile sonuçlanan (kemotaksis-marjinasyon-diapedezis) bir dizi mekanizmayı başlatmaktadırlar. PMN lökositler yangısal alanda, lizozomal enzimleri ve serbest radikal türlerini salarak, mikroorganizmaları ve yangısal atıkları fagosite etmektedirler. Ayrıca yangısal alana gelen PMN lökositler lökositozis ile sonuçlanan şemokinlerin salınımını da başlatmaktadırlar. Bu şemokinler (chemokin) N-formyl peptitler (NfP), kompleman C5a, lökotrien B₄, interlöykin-8, platelet aktive edici faktör (PAF), makrofaj inflammatory protein 1 α (MIP 1 α) ve makrofaj inflammatory protein 1 β (MIP 1 β)'dan oluşmakta ve yangısal alana ilave poli ve mononükleer hücrelerin gelmesini ve bunların aktivasyonunu sağlamaktadırlar (Bokoch 1995, Nussler ve ark 1999). Kemik iliğinden granülositlerin salınması, bu hücrelerin apoptozislerinin (programlı hücre ölümü) düzenlenmesi, spesifik adezyon moleküllerinin oluşumu, granülositlerin yangısal olaylarda rol alma derecesi ve lökositozis oluşması; granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve granülosit- makrofaj koloni sitümüle edici faktör (GM-CSF) (hemapoetik büyüme faktörleri) tarafından ayarlanmaktadır (Young ve Linch 1993). Sepsiste oluşan organ hasarı ve sepsisin tedavisi üzerinde G-CSF ve GM-CSF 'in rolü üzerinde yapılan çalışmalarda; protein yapısındaki bu faktörlerin, lökositlerin vasküler endoteliuma adezyonunu, kemotaksisi, fagositozisi, süperoksit üretimini ve mikroorganizmaları öldürücü etkileri ile mononükleer hücrelerden proenflamatuvar sitokin üretimini artırdığı ve enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte şiddetli sepsisin patogenezinde söz konusu faktörlerin zararlı rollerinin de olduğu vurgulanmaktadır (Sissons ve Dinarello 1988).

Monosit ve nötrofiller üzerindeki en önemli endotoksin (LPS) reseptörü olan CD14 endotoksine karşı PMN lökosit aktivasyonundan sorumludur. Nötrofiller, bakteri ve LPS gibi bakteriyel membran fragmentlerini sindirebilme özelliğine sahiptir. Nötrofil ve makrofajlar ayrıca toksik bakteriyel LPS'yi nontoksik hale getirebilen "de-O-acylat" ve "defosforilat" gibi enzimler içermektedirler (Schade ve ark 1987). Nötrofil primer granülleri LPS ile etkileşime girebilen katyonik proteinler de taşımaktadırlar. Bunlardan bakterisidal/permeabiliteyi artıran protein (BPI, bactericidal/permeability-increasing protein) membranlarını bozarak ve LPS 'yi bağlayarak bakterileri öldürmektedir. İnsanlarda gerçekleştirilen deneysel endotoksemide BPI ayrıca bakteriler tarafından TNF salınımını da inhibe edebilmektedir (Spitznagel 1990). BPI'nın rekombinant amino terminal fragmentinin endotoksinin biyolojik etkisini nötralize edebildiği bildirilmektedir (Von Der Mohlen ve ark 1995, Gaviria ve ark 1998).

Diyapedezis amacıyla endotel iç yüzeyine yapışan aktif PMNL'ler oksijen radikalleri üretmekte ve salmaktadır. Bu radikallerin aktif PMNL elastazını aktifleştirmeleri sonucunda hemostazis için önem taşıyan endotelyumda hasar oluşabilmektedir. Nötrofil elastaz (NE, Neutrophil elastase) daha önce bahsedilen LPS, IL-6 gibi ajanlar ve özellikle TNF- α ile stimüle edilen nötrofiller tarafından salınarak DIC oluşumuna önemli katkı sağlamaktadır. NE'nin antitrombini inaktive etme özelliği vardır (Okajima 1999). İn vitro insan umbilikal ven endotel hücrelerinde yapılan çalışmalarda, NE' nin trombomodulini de inaktive ettiği bildirilmektedir. NE ayrıca endotel hücrelerdeki heparin benzeri glikozaminoglikanların düzeyini de düşürmektedir (Abe ve ark 1994).

Endotel hücreler tarafından sentezlenen prostasiklin (PGI_2) güçlü bir anti-platelet aktiviteye sahiptir. PGI_2 ve analogları monosit ve endotel hücrelerden doku faktörü oluşumunu inhibe ederek IL-1'in endotel hücrelerdeki trombomodulin oluşumunu önlemesini engellemektedir (Crutchley ve ark 1993). Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada PGI_2 verilmesinin endotoksin ile oluşturulan DIC'in şiddetini azalttığı bildirilmektedir (Yoshikawa ve ark 1986). NE ise intrasellüler kalsiyum artışını inhibe ederek, endotel hücreler tarafından trombinle indüklenen PGI_2 üretimini inhibe etmekte ve sepsiste görülen mikrotrombüs oluşumuna katkı sağlamaktadır. NE ayrıca vasküler permeabiliteyi de artırmaktadır (Okajima 1999).

Nötrofillerin aktivasyonu, serbest radikallerin oluşumundan sorumlu bir enzim olan NADPH oksidazın aktivasyonuna sebep olmaktadır. Aktifleşen enzimin varlığında meydana gelen reaksiyon sonucu oluşan süperoksit anyonu (O_2^-) hızla mikroorganizmalara ve çevre dokuya zarar veren ve vasküler permeabiliteyi artıran hidrojen peroksid (H_2O_2) ile diğer

toksik maddelere dönüşmektedir (Weiss 1989). Ayrıca doku hasarından sorumlu olan diğer bir sitotoksik oksidant da miyeloperoksidaz (MPO) varlığında H_2O_2 'nin oluşturduğu hipoklorous asittir (HOCl). O_2 ayrıca demir ve laktoferrin mevcudiyetinde H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikallerini (-OH) şekillendirmektedir. Bu oksidant α_1 -antitripsini inaktive ederek NE'nin serbest kalmasını sağlamaktadır. Söz konusu serbest radikaller PMNL'lerden salınan kolajenaz ve jelatinazı direkt olarak aktive ederek bu proteazlar da NE'nin oluşturduğu endotelial hasarı artırmaktadır (Weiss 1989, Aderka 1991). Diğer bir serbest radikal olan ve başlıca nötrofillerden, vasküler endoteliumdan ve kupffer hücrelerinden salınan nitrik oksit (NO), NO sentaz (NOS) tarafından L-arjinden oluşturulmakta ve enfeksiyon sürecinde önemli fizyolojik ve patofizyolojik etkilere yol açmaktadır. NO'nun septik şok ve multipl organ disfonksiyon sendromunda (MODS, multiple organ dysfunction syndrome) patolojik vazodilatasyon şekillenmesinde ve doku hasarı oluşumunda önemli rolü bulunmaktadır (Gomez-Jimenez ve ark 1995). İn vitro gerçekleştirilen araştırmalarda serbest radikallerin endotel hücrelerde trombomodulini direkt olarak inaktive ettiği ayrıca nötrofil elastaz tarafından oluşturulan trombomodulinin inaktivasyonuna sinerjik olarak önemli katkı sağladıkları kaydedilmektedir (Okajima 1999, Abe ve ark 1994).

Deneysel endotoksemi ile akut bakteriyel ve fungal enfeksiyonlarda kısa bir nötropeni periyodunu müteakip nötrofil oluşması septik hastaların yaygın özelliklerinden biridir. Nötropeni oluşumunun nedeni; NfP, endotoksin, TNF- α , IL-1 ve PAF gibi maddelerle aktive edilen adezyon molekülleri ile endotel reseptörlerinin interaksiyonunun artmasına ve sonuçta karaciğer, akciğer, dalak gibi bir çok organda nötrofillerin birikmesine bağlanmaktadır. Bu süreçte plateletlerin aktivasyonu da söz konusu olduğundan kapiller damarlarda mikropıhtı ve trombüs oluşumu hızlanmaktadır (Gaviria ve ark 1998). Nötropeni periyodunu izleyen birkaç saat içinde ise kan nötrofillerinde düzenli bir artış gözlenmektedir. Endotoksemi, bakteriyemi veya akut doku hasarı direkt olarak sitokinlerin (G-CSF, GM-CSF, TNF- α ...) salınımı ve kompleman C3e vasıtasıyla kemik iliği rezervlerinden nötrofillerin salınımını stimüle etmektedir (Dale ve ark 1995, Gaviria ve ark 1998). Nitekim olgun nötrofillerin kemik iliğinden salınımında en önemli uyaran olan G-CSF enjeksiyonunun kan nötrofil düzeyini artırdığı bildirilmektedir (Dale ve ark 1995).

Septisemi ve deneysel endotoksemide intrinsik koagülasyon yolunun aktivasyonu ile şekillenen FXIIa ve plazma kallikreini, mikrotrombüs oluşumuna katkı sağlamamakla birlikte; nötrofil degranülasyonu ve agregasyonuna neden olmaktadır (Okajima 1999). Pixley ve ark (1993) baboonlarda gerçekleştirdikleri çalışmada; FXII monoklonal antiserininin

E.coli infüzyonuyla oluşturulan DIC'i engellemediğini, fakat hemodinamik değişiklikleri baskıladığını belirtmektedirler. Yine başka bir çalışmada (Uchiba ve ark 1997 a)deneysel olarak endotoksin uygulanan ratlarda plazma kallikrein inhibisyonunun, koagulasyon anormalliklerini etkilemediği fakat aktif nötrofiller tarafından oluşturulan endotelial hasarı azalttığı belirtilmektedir.

Son yıllarda koagulasyon mekanizmasında önemli bir serin proteaz inhibitörü olan antitrombinin (AT) İV enjeksiyonunun hücre yüzeyindeki heparin benzeri glikozaminoglikanlarla etkileşime girerek PGI₂'nin endotelial salınımını arttırdığı, lökosit aktivasyonunu inhibe ettiği ve endotoksin ile oluşturulan pulmoner vasküler hasarı azalttığı belirtilmektedir (Uchiba ve ark 1992). AT hem koagulasyon sisteminin regülasyonunu sağlamasıyla hem de lökosit aktivasyonunu önleyerek DIC'in patogeneziinde önemli fonksiyonlar üstlenmektedir.

2.9. DIC'te Plateletlerin Rolü

Plateletlerin hemostazisde önemli fizyolojik fonksiyonları mevcut olup bunlardan birincisi; damar bütünlüğünün bozulduğu kısımda platelet plağını şekillendirmektir. Eğer damardaki yırtılma küçükse oluşan trombosit tıkaçı kan kaybını durdurabilmekte, fakat büyükse kanamayı durdurmak için söz konusu tıkaçın oluşumuna ek olarak kanın pıhtılaşması da gerekmektedir. Trombosit tıkaçı oluşum mekanizması, gün içinde yüzlercesi gerçekleşen çok küçük damarlardaki yırtıkların kapatılması için son derece önemli olup böylece trombositler endotel hücreleriyle adeta kaynaşarak hücre membranı oluşmasını sağlamaktadır. Trombosit sayısı çok az olan kişilerde, deri altı ve tüm internal dokularda normal kişilerde izlenmeyen, yüzlerce küçük hemorajik odak gelişebilmektedir (Guyton ve Hall 1996).

Plateletlerin ikinci fonksiyonunu; aktive olmalarıyla birlikte yüzeylerinde negatif yüklü fosfolipit (platelet faktör 3, Pf-3) şekillenmesi ve böylece koagulasyonu hızlandırması oluşturmaktadır. Pf-3 olmaksızın koagulasyon işlemi çok yavaş gelişmektedir (Deniz 2000). Aktivasyon esnasında plateletlerde ayrıca spesifik pıhtılaşma faktörleri için (özellikle FVa ve FVIIIa) reseptörler şekillenmektedir. Bu reseptörler platelet üzerindeki fosfolipitler ile birlikte FIXa ve Xa için bir bağlanma alanı olarak görev yapmakta ve böylece gerek FX'un platelet üzerinde FXa'ya çevrilmesi gerekse FXa tarafından protrombinin trombine çevrilmesi için etkili bir katalitik çevre oluşturulmaktadır (DeLa Cadena ve ark 1994).

Üçüncü fonksiyonları ise; endoteli koruma özellikleridir. Nitekim, düşük platelet sayısı olan hayvanlarda vasküler endotelium bozulma eğilimi göstermektedir. Deneysel

olarak oluşturulan trombositopenide damar endotelyumunun incilmesi, aşırı gözenekleşmesi ve plateletler tarafından açığa çıkarılan serotonin ve norepinefrin düzeylerinin azalması sonucu endotelyumun bariyer oluşturma fonksiyonu aksamaktadır. Bu durum, özellikle postkapiller venüler interendotelyal kanal boyunca eritrositlerin damar dışına çıkmasına ve peteşilere neden olmaktadır (Colman ve ark 1994).

Damar duvarının yaralanması veya yabancı bir yüzeyle teması sonrası plateletlerde hızlıca adezyon, şekil değiştirme, sekresyon ve plak gelişimi gibi bir seri mekanizma gerçekleşmektedir (Yılmaz 2000). Plateletler birkaç sınıf granül içermektedir. Bunlardan “dense bodies” yani yoğun bölge diye adlandırılan granüllerde; serotonin, ATP, ADP, pirofosfat ve kalsiyum, α -granüllerde; fibrinojen, vWF, FV, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen, fibronektin, α -antitripsin, β -tromboglobulin, platelet F3 ve 4 ile platelet kökenli büyüme faktörü, lizozomlarda ise; çeşitli asit hidrolazlar bulunmaktadır (Saussy ve ark 1986). Trombosit aktivasyonunun gerçekleşebilmesi için öncelikle hücrenin uyarılması gerekir. Uyarının algılanması ise her hücrede olduğu gibi membran reseptörleriyle sağlanmaktadır. Trombosit aktivatörleri arasında; ADP, ATP gibi adenin nükleotitler, büyüme faktörleri, adrenalin, vazopressin gibi hormonlar, serotonin ve noradrenalin gibi nörotransmitterler ile trombosit aktive edici faktör (PAF) ve Tromboksan A_2 gibi özgün yapılar sayılabilir (Saussy ve ark 1986). Bu maddelerin pek çoğu hücreyi özel reseptörleriyle (PAF, PGE gibi) uyarırken hücre içi adenilat siklaz enzimini de inhibe ederler. Enzimin baskılanması, hücre fonksiyonlarının hızlanması demektir (Weiss ve Rashid 1998, DeLa Cadena ve Colman 1999). Böylece hücre içi fosfolipaz C'nin aktivasyonu sağlanarak fosfatidilinozitol biofosfat (PIP₂) parçalanmakta ve inozitol trifosfat (IP₃) ile diasilgliserol (DAG, diacylglycerol) şekillenmektedir. Oluşan IP₃ ise yoğun tubuler sistem (kas hücresindeki sarkoplazmik retikulumun analogu) olarak bilinen kalsiyum depo organellerindeki reseptörler ile reaksiyona girmekte ve iyonize kalsiyumun mobilizasyonu sonucu kalsiyumun sitoplazmik konsantrasyonu artmaktadır (Colman ve ark 1994). Bu artış ilk önce kalmoduline bağlı fosfokinazı aktive etmekte ve böylece miyozin hafif zincirinin fosforilasyonu şekillenmektedir ki, bu yol plateletin şekil değiştirmesi için önemlidir. Ayrıca fosfolipaz A₂ enzimince membran fosfolipitlerinden araşidonik asidin serbest bırakılmasında kalsiyuma ihtiyaç vardır. Araşidonik asit ise siklooksijenaz enzimince prostaglandin endoperoksidaza ve sonunda güçlü platelet agonisti olan tromboksan A₂'ye dönüştürülmektedir. Aynı zamanda güçlü bir vazokonstriktör etkiye sahip bulunan tromboksan A₂ hemostaz olayını hızlandırmaktadır. Aspirin ve diğer nonsteroid antiinflamatuvarlar siklooksijenazı ve

dolayısıyla da tromboksan A₂ oluşumunu bloke ederek antiplatelet etki gösterirler (Colman ve ark 1994).

Fosfolipaz C'nin aktivasyonu sonucu şekillenen DAG ise plateletlerdeki protein kinaz C'nin aktivasyonunu sağlayarak P-47 proteinini fosforile eder ki, bu olay platelet sekresyonu için önemlidir (Berridge 1984).

Platelet membranında adeziv plazma proteinlerinin bağlandığı integrin adı verilen reseptörler mevcuttur. Bunlar heterodimer olup hem kan hücrelerinde hem de endotel hücrelerde bulunmaktadır. Normalde plateletler damar endotelyumuna yapışmazlar, fakat endotelial bozulmanın olduğu yerde subendotelial matrikste bulunan adeziv proteinlerden vWF; platelet glikoprotein Ib/IXa reseptörüne, fibronektin ile fibrinojen ise platelet integrin reseptörüne bağlanmaktadır (Hynes 1987). Bu adeziv proteinler, plateletler ile subendotelial konnektif doku arasında bir köprü görevi yaparak adezyona yardımcı olmaktadır. VWF, subendotelial komponentlerle (örneğin, kollajen) etkileşime girdiği zaman platelet reseptörlerine bağlanma alanları oluşturmak için konformasyonel değişikliğe uğramaktadır. Plazma vWF'yi başlıca endotelial hücre sentezi ve salınımının bir ürünü olmasına karşın platelet α -granül vWF'si bir megakaryosit ürünüdür. Koagülasyon mekanizmasında, adezyonda çok önemli olan bu faktörün eksikliği kanama eğilimine neden olmaktadır. Faktörün etkinliği plazmada bulunan pıhtılaşma faktörlerinden F-VIII ile sağlanmaktadır. Platelet üzerinde mevcut olan platelet GPIV reseptörü ve integrin Ia/IIa reseptörü de kollajenle bağlanarak bir diğer adezyon şeklini oluşturmakta ve söz konusu reseptörlerin anormalliklerinde kanama bozuklukları görülmektedir (Bennett 1990, Colman ve ark 1994).

Agregasyon esnasında platelet yüzey membranında bulunan glikoprotein yapısındaki GPIIb/IIIa reseptörü yapısal değişikliğe uğramakta ve vWF, fibronektin, vitronektin ile fibrinojen bu reseptöre bağlanma yeteneği kazanmaktadır. Agregasyon için özellikle fibrinojen gerekli olup divalent yapıdaki simetrik fibrinojen moleküllerinin bitişik platelet üzerindeki reseptöre bağlanmasıyla agregasyon şekillenmektedir (Bennett 1990, DeLa Cadena ve ark 1994) . Fibrinojen agregasyon reaksiyonlarına kofaktör olarak etkimektedir. vWF, fibronektin ve vitronektin moleküllerinin fibrinojenle birlikte trombositlere bağlanması adezyon ve agregasyon olaylarını kuvvetlendirmekte ve trombosit tıkaçı oluşumunu kolaylaştırmaktadır. vWF ve kollajen normal plateletler ile etkileşim kurabilirlerken fibrinojen sadece aktive olmuş platelet üzerindeki integrin GPIIb/IIIa reseptörüne bağlanmaktadır. Platelet membranında bulunan GP reseptörleri ile fibronektin ve thrombospondinin etkileşiminin platelet agregasyonu için önemli olduğu ve agregasyonu stabilize ettiği düşünülmektedir (Colman ve ark 1994, DeLa Cadena ve Colman 1999) .

Normal endotel hücreler plateletlerdeki siklik adenzin monofosfatı artıran PGI₂ ve nitrik oksit üretmeyle platelet adezyon ve agregasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ederler. Nitrik oksit; plateletlerde kalsiyum mobilizasyonunu ve fosfolipaz C'nin aktivasyonunu inhibe eden intraselüler siklik guanozin monofosfatı artırmaktadır. Endotel hücreler ayrıca başlıca platelet aktive edici ajan olan ADP'yi AMP'ye hidrolize eden ADPaz üretmektedir. Yangı veya herhangi bir sebeple hasar gören endotel hücreler plateletlerin adezyon ve aktivasyonunu artıran platelet-endotelyal adezyon molekülleri üretmektedir (Weiss ve Rashid 1998).

Sepsis esnasında platelet sayısının azalması, yangısal alana toplanma, platelet hiperaggregabilitesi, aktif plateletlerden salınan maddelerin plazmada varlığı ve sirkülasyonda platelet-platelet ve platelet-lökosit agregatlarının görülmesi söz konusu hücrelerin aktifleştiğini gösteren başlıca kanıtlar olarak kabul edilmektedir (Weiss ve Rashid 1998, DeLa Cadena ve Colman 1999).

Sepsis esnasında platelet aktivasyonunun başlıca mediyatörleri trombin ve PAF'dır. PAF, TNF ile stimüle edilen endotel hücreler, aktif nötrofil, makrofaj ve plateletlerce üretilmektedir. PAF; plateletlerin endotel hücreler, nötrofiller ve monositlerle olan adezyonunu stimüle etmektedir. At plateletlerinin PAF ile aktivasyonunun köpek, rat, tavşan, koyun ve domuzlarınkine göre daha hızlı olduğu belirtilmektedir. Nitekim Foster ve ark (1992)'nin atlara 10-30µg dozunda İV PAF uygulayarak yaptıkları çalışmada platelet sayısının 30-60 saniyede %70 oranında azaldığı bildirilmektedir.

Monosit ve nötrofil gibi yangısal hücrelerle plateletlerin etkileşiminde, aktif plateletlerin yüzeyinde şekillenen glikoproteinler (P-selektin gibi) rol oynamaktadır. Nitekim multipl organ yetersizliğinin geliştiği septik hastalarda; P-selektinin platelet yüzey ekspresyonunun belirlendiği kaydedilmektedir (Weiss ve Rashid 1998, DeLa Cadena ve Colman 1999).

Plateletlerin DIC ve organ yetersizliği patogenezisinde önemli rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Marcus 1994, Munoz ve ark 1999, Montes ve ark 2000, Asakura ve ark 2001a). Mikrosirkülasyondaki fibrin birikiminde plateletler tutulmakta ve trombositopeni meydana gelmektedir (Marcus 1994).

Kanda aktif plateletlerin, platelet-platelet ve platelet-lökosit agregatlarının varlığı trombozis ve DIC için yüksek bir risk faktörüdür. Septik hastalarda plateletlerdeki fibrinojen reseptörlerinin aktivitelerindeki artış hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olmaktadır (Weiss ve Rashid 1998). Sepsiste platelet sayısında azalma, platelet granüllerinde depo halde bulunan ve aktivasyonunun bir göstergesi olan β-tromboglobulin düzeyinde ise artma gözlenmektedir.

Bunun nedeni ise platelet sekresyonu, platelet agregasyonu ve adezyonuna bağlanmaktadır (DeLa Cadena ve Colman 1999).

Endotoksinin de plateletler üzerinde önemli direkt etkileri bulunmaktadır. Endotoksin plateletlere bağlanarak platelet protein kinaz C'yi aktive ederek, plateletlerdeki fibrinojen bağlanma alanlarının (GPIIb/IIIa) konformasyonel değişikliğine sebep olmakta ve platelet yüzeyinde P-selektin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Salat ve ark 1999). Ayrıca endotoksin doza bağımlı olarak ADP, kollajen ve arasıdonik asit gibi platelet agregasyonunu gerçekleştiren agonistlerin etkisini güçlendirmektedir. Endotoksin ile aktive olan lökositlerden salınan elastaz platelet GPIb, GPV ve fibrinojen reseptörlerine etki ederek platelet agregasyonunu artırmaktadır. Lökosit kaynaklı PAF platelet agregasyonunda önemli rol oynarken platelet aktivitesini sağlayan diğer agonistlerin etkisini de güçlendirmektedir (Salat ve ark 1999). Plateletler ile mononükleer hücrelerin etkileşimi IL-1 üretimini artırmakta, IL-1 ise plateletlerde tromboksan A2 sentezinde rol üstlenmektedir (DeLa Cadena ve Colman 1999).

Aspirin, asetaminopen, ibuprofen, glikoprotein IIb/IIIa antagonistleri, platelet adezyon inhibitörleri (glikoprotein Ib'yi bağlayan peptitler), tiklopidin ve PAF inhibitörleri gibi antiplatelet ajanlar sepsisli hastalarda koagülopatinin tedavisi için kullanılabilir (Weiss ve Rashid 1998).

2.10. DIC'de Doğal Antikoagülatif Mekanizmanın Önemi

Antitrombin III (ATIII), karaciğerde sentezlenen 58 kD moleküler ağırlığında bir α -globulindir. Koagülasyon sisteminin intrinsik, ekstrinsik ve ortak yolunu etkileyebilen geniş spektrumlu bir antikoagülan etkiye sahiptir. Fonksiyonel olarak başlıca trombin inhibitörü olmasının yanında diğer bazı pıhtılaşma faktörlerini (F VIIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa) kallikreini ve plazmini inhibe etmektedir. ATIII; platelet ve endotel hücrelerin yüzeyleri ile plazmada optimum düzeyde bulunmaktadır (Mammen 1995, Opal ve Thijs 1999). Ayrıca doku faktörüne bağlandığında FVIIa'yı da inhibe edebilmektedir. ATIII aktif alanında heparin ve serin bağlayan (proteaz) kısımlar içermektedir. Endotel hücre yüzeyindeki heparin sülfat gibi heparin ve diğer glikozaminoglikanların ATIII'ü allosterik aktivasyon ile aktive etmeleri sonucu AT-III'ün etkin rolü ortaya çıkmaktadır. Heparin molekülünün tek başına antikoagülan etkinliği çok azdır veya hiç yoktur. Fakat ATIII ile birleştiğinde ATIII'ün etkinliği yüz ile bin kat kadar artmaktadır (Levi ve ark 2001).

Son yıllarda DIC'in tedavisinde ATIII uygulamasına yönelik önemli çalışmalar yapılmakta olup bunların temelini; ATIII'ün pıhtılaşma sisteminin anahtar düzenleyicilerinden birisi olması, heparinin ATIII'ün antikoagülan etkisini artırması ve dolaşımdaki ATIII konsantrasyonunun DIC esnasında azalması oluşturmaktadır.

ATIII endotel yüzeyine bağlanarak söz konusu hücreleri stimüle etmekte ve prostasiklin sentez ve salınımını artırmaktadır. ATIII, antikoagülan etki yanında ayrıca antienflamatuvar özelliklere de sahiptir (Yamauchi ve ark 1989). Platelet agregasyonunun güçlü bir inhibitörü olan prostasiklin, cAMP yolu ile proenflamatuvar sitokin sentezini inhibe ederken, nötrofillerden salınan elastaz ve toksik oksijen radikallerinin salınımını azaltmakta böylece endotelyumu korumaktadır (Uchiba ve ark 1992, Levi ve ark 2001).

ATIII'ün sepsisteki koagulasyon bozukluğunu hafifletmekte önemli bir yeri bulunmaktadır. Bununla birlikte şiddetli koagulasyonda söz konusu fonksiyonu yeterli olamamaktadır. Bunun sebebi ise sepsiste plazma düzeyleri yükselen trombin ve diğer aktif proteazların AT ile kompleksler oluşturması, aktif nötrofillerden salınan elastaz tarafından sindirilmesi, karaciğer yetersizliğinden dolayı sentezinin aksaması, ayrıca ekstrasvasküler sızıntıya uğramasıdır (Levi ve ark 2001). Nitekim septik hastalarda AT düzeyinin %30 azaldığı gösterilmiştir (Masters ve ark 1996 a). Yine septik hastalarda düşük AT seviyesinin yüksek mortalite ile paralellik gösterdiği (Fourrier ve ark 1993), deneysel olarak gerçekleştirilen DIC'te AT düzeyini yükseltmenin, koagulasyonun sistemik aktivasyonunu bloke edebildiği ve organ yetersizlikleri ile mortalitede önemli ölçüde azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (Wilson ve ark 1989, Mammen 1998, Levi ve ark 2001).

Protein C karaciğerde vitamin K'nın mevcudiyetinde sentezlenmekte olup dolaşımda inaktif olarak bulunmaktadır. Trombinin, endotel hücre yüzeyinde ve az olarak da monositlerde bulunan ve kendisi için bir reseptör görevi yapan trombomodüle bağlanmasıyla oluşan trombin-trombomodülün kompleksi (T-TM, Thrombin-thrombomodulin complex) bir yandan trombinin prokoagülan özelliğini bloke ederken diğer yandan da protein C'yi aktive etmektedir. Aktif protein C (APC) ise protein S'in kofaktörlüğünde FVa 'yı ve VIIIa'yı inaktive ederek koagulasyonu önlemektedir. APC ayrıca doku plazminojen aktivatörü (tPA) inhibitörlerini bağlayarak endotel hücrelerden salınan tPA düzeyinin yükselmesine ve plazminojenin plazmine dönüşümünü hızlandırarak fibrinolizise katkıda bulunmaktadır (Esmon 1999). APC'nin inaktivasyonu bir akut faz protein olan α 1-antitripsin, protein C inhibitörü ve α 2-makroglobülin tarafından ayarlanmaktadır. Protein S ise kendi aktivitesini engelleyen C4b ile kompleks kurarak kontrol edilmektedir (Levi ve ark 2001).

Sepsiste protein C'nin dolaşımdaki düzeyi oldukça azalmaktadır. Bunun nedenleri ise; tüketiminin artması, karaciğerdeki sentezinin azalması ve vasküler sızıntının artması olarak sıralanmaktadır. Bütün bunlara ilaveten sepsiste TNF α gibi sitokinlerin aktivasyonu sonucu endotel hücrelerdeki trombomodülin ve protein C reseptörleri zarar görmekte ve yeterli protein C aktivasyonu da gerçekleşmemektedir (Nawroth ve Stern 1986, Uchiba ve ark 1997 b). Ayrıca, sepsiste protein S'de etkilenmektedir. Plazmada protein S'in %60'ı kompleman düzenleyici protein olarak adlandırılan C4b bağlayan proteinle (C4bBP) kompleks halinde bulunmaktadır. Protein C'nin antikoagülan kapasitesi protein S'in serbest fraksiyonu tarafından artırılmaktadır. Sepsise cevap olarak oluşan akut faz reaksiyonun bir sonucu olarak C4bBP'nin plazma düzeyinde artış şekillenmektedir. Söz konusu artış relatif bir protein S eksikliğine sebep olarak antikoagülan kapasiteyi azaltmaktadır (Levi ve ark 2001). Baboonlara subletal E.coli ile kombine C4bBP infüze edildiği bir çalışmada DIC'in daha da şiddetlenmesi ve meydana gelen şiddetli organ zararlarının ölümle sonuçlanması bu mekanizmanın doğruluğunu ortaya koymaktadır (Taylor ve ark 1991a). Yine babonlara letal doz E.coli verilerek oluşturulan deneysel sepsiste aktif protein C verilmesinin DIC'i önemli derecede düzeltmesi ve hayatta kalma oranını yükseltmesi Protein C sisteminin oynadığı rolün önemini göstermektedir (Taylor ve ark 1987). Jalbert ve ark (1998) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada; protein C geninin deneysel olarak çıkartılarak (transgenik) heterozigot protein C yetersizliği oluşturulan farelerde endotoksin verilen normal farelere oranla çok daha şiddetli düzeyde endotoksik DIC oluştuğu gözlenmiştir. Deneme grubu söz konusu farelerde platelet sayısında büyük ölçüde azalma, fibrinojen düzeyinde de önemli düşüş belirlenmiştir. T-AT kompleksi düzeyinin ise kontrol grubununkinden 3-4 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Histolojik incelemede heterozigot protein C eksikliği olan farelerde akciğer ve böbrekte daha fazla fibrin biriktiği gözlenmiştir. Sonuç olarak proenflamatuvar sitokin TNF α , IL-6 ve IL1 β düzeylerinin önemli derecede yüksek bulunduğu belirtilerek protein C sisteminin antienflamatuvar yanıtındaki önemi vurgulanmıştır. Yine benzer bir çalışmada (Fisher ve Yan 2000), protein C'nin koagülasyon ve yangı olaylarında önemli bir rol üstlendiği ve protein C seviyesinin düşmesinin DIC'in patogenezisinde önemli derecede olumsuz etkiye sahip olduğu belirtilmektedir.

Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI), endotel hücrelerce üretilen bir proteindir (Creasey ve Reinhart 2001). Lipide bağlı koagülasyon inhibitörü (LACI) veya ekstrinsik yol inhibitörü (EPI) olarak da adlandırılmaktadır. TFPI; FXa'yı direkt bir şekilde ve FVIIa/TF katalitik kompleksini ise F Xa mevcudiyetinde inhibe eden bir serin proteaz inhibitörüdür. Doku faktörü (TF), plazmada mevcut olan FVII veya FVIIa'ya bağlandığında koagülasyon

aktivasyonu meydana gelmektedir. FVIIa/TF kompleksi FX ve FIX'u aktive etmektedir. FXa'nın oluşmasıyla birlikte TFPI'nin inhibitör etkisi ortaya çıkmaktadır (Creasey 1999).

DIC'te TFPI'nin plazma seviyesi hafifce azalmakta ya da konsantrasyonunda artış gözlenmektedir (Creasey ve Reinhart 2001). Babonlara subletal dozda E.coli verilmesi TFPI'nin plazma düzeyinde 1.2, letal dozda ise 2 kat artışa sebep olmaktadır (Sabharwal ve ark 1995). Tavşan beyin tromboplastini veya endotoksin verilerek oluşturulan DIC'te yüksek doz TFPI uygulamasının hayvanlarda koagulasyon aktivitesini büyük ölçüde engellediği bildirilmektedir (Levi ve ark 2001). Septik babonlarda yapılan bir çalışmada ise deneysel E.coli bakteriyemisini müteakip gelişen koagulasyon aktivasyonunu yine TFPI'nin önlediği ve mortaliteyi azalttığı belirtilmektedir (Creasey ve ark 1993).

Deneysel sepsiste TFPI verilmesi ise IL-6 oluşumunu düzenlemektedir (Levi ve ark 2001). Yine TF/FVIIa da makrofajlarda reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile MHC klass II ve adezyon moleküllerinin indüksiyonu gibi çeşitli proinflatuvar yanıtları oluşturmaktadır (Randolph ve ark 1998).

Yukarıda bahsedilen fizyolojik antikoagülan mekanizmaların bozulmasının DIC'in patogenezinde çok önemli rol oynadıkları göz önünde bulundurulduğunda, bu mekanizmaların işler hale getirilmesi şiddetli sepsisli vakaların tedavisinde en mantıklı yaklaşım olarak görülmektedir.

Antitrombin yolunun düzenlenmesinde DIC'li hastalara son yıllarda AT verilmesinin faydalı olabileceği üzerinde durulmaktadır (Fourrier ve ark 1993, Carey ve Rodgers 1998, Levi ve ark 1999). Fourrier ve ark (1993) da yüksek dozda ATIII uygulamasının DIC'in prognozunu ve organ fonksiyonlarını düzelttiğini bildirmektedirler.

Rekombinant aktif protein C uygulamasıyla sepsisli hastalarda bozulan protein C yolunun desteklenmesi son yıllarda klinikte başvurulan bir diğer tedavi yaklaşımıdır. Nitekim babonlarda yapılan bir çalışmada protein C'nin, E.coli infüzyonunun koagülopatik ve letal etkisini engellediği belirtilmektedir (Taylor ve ark 1987). Yine APC uygulamasının tavşanlarda tromboplastin ile oluşturulan DIC modelinde çok etkili olduğu (Katsuura ve ark 1994), sepsisli insanlarda başarılı sonuç verdiği, doku nekrozlarını ise hafiflettiği belirtilmektedir (Rintala ve ark 2000).

Sepsis ve DIC'li hastalarda, endojen doku faktörü yolu inhibitörünün (TFPI) nisbi yetersizliği, rekombinant TFPI'nin farmakolojik dozda uygulanmasıyla giderilebilmektedir. Ratlarda oluşturulan DIC modelinde, endotoksin verilmesinden hemen sonra gerçekleştirilen rekombinant TFPI infüzyonu sonucunda; koagulasyon faktörleri ve platelet tüketilmesi

önemli derecede inhibe edilmiş, karaciğer, akciğer, böbrek ve dalakta şekillenen fibrin trombilerin miktarında önemli azalmalar şekillenmiştir (Elsayed ve ark 1996).

Tüm bu gelişmeler yanında söz konusu fizyolojik antikoagülanlar üzerindeki araştırmaların yetersiz olduğu ve bu konu üzerinde yoğunlaşılması gerektiği vurgulanmaktadır (Levi ve ark 2001).

2.11. DIC'in Patogenezinde Endotelyumun Rolü

Damar endotel hücreleri çeşitli adeziv proteinler, kollajen, fibronektin ve vWF gibi hemostaziste önemli olan ekstrasellüler proteinleri üretmektedir. Ayrıca membranları üzerlerinde yer alan protein yapısındaki trombomodülin ve heparan sülfatı salgılayarak kan pıhtılaşmasını inhibe etmektedirler. Doku plazminojen aktivatörü ve plazminojen aktivatör inhibitörlerini sentezleyerek fibrinolizisi düzenlemektedirler. Ayrıca prostasiklin (PGI₂) ve nitrik oksit (NO) salarak platelet agregasyonunu inhibe etmekte ve vazokonstriktör endotelinler (endotelin 1, 2 ve 3) ile bazı vazodilatatörleri (PGI₂, NO) sentezleyerek de damar duvarı tonusunu ayarlamaktadırlar (Colman ve ark 1994).

Damarsal fonksiyonlardaki bazı bozukluklar kanamaya sebep olmaktadır. Örneğin; endotelyum geçirgenliğini artıran faktörlerin mevcudiyetinde yada damar duvarı veya damar dışı destekleyici dokuların yapısal anormalliklerinden dolayı vazokonstriktör cevabın bozulduğu durumlarda kanama şekillenebilmektedir (Wagner ve ark 1984). Yangısal durumlarda lökositlerden salınan proteolitik enzimler; endotelial hücreleri bozabilmekte, konnektif doku proteinlerini değiştirerek kanama eğilimi doğurmakta ve damarsal bozukluklarda şekillenen peteşiyel kanamalara katkıda bulunmaktadır (Okajima 1999).

Endotel hücreler trombin gibi enzimlerle, interleukin-1, TNF ve interferon gibi sitokinlerle, sentetik hormonlar ve endotoksinlerle uyarıldıklarında nontrombojenik özelliklerini yitirmektedirler. Örneğin, sepsiste endotel hücreler sitokinler ve bazı mediatörlerle uyarıldıklarında nötrofilleri endotelyuma yapıştırmak için E-selektin düzeyini, doku faktörü sentezini artırmakta (Okajima ve ark 1997) ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ile vWF'nin sentez ve salınımını gerçekleştirmekte (Rodgers 1988), membran trombomodülin konsantrasyonunu ise azaltmaktadırlar. Endotel hücreleri uyaran faktörlerden en önemlisi olan TNF'nin özellikle sepsisli durumlarda endotelial zarar oluşturma, doku faktörü salınımını sağlama, platelet aktivasyonu oluşturma, pıhtılaşmanın ekstrinsik ve intrinsik yolunu etkileme ve yaygın damar içi pıhtılaşma oluşturma gibi önemli rolleri bulunmaktadır (Okajima ve ark 1996).

Plazminojen aktivatörleri, oluşan trombozise karşı bir endotel hücre cevabı olarak da sentezlenebilmektedir. Septik hastalarda fibrinolitik sistemi tetikleyen endotel kaynaklı doku tipi plazminojen aktivatörünün salınımı artmakta ve başlangıç safhasında fibrinolitik sistem aktive olmaktadır (Voss ve ark 1990, Masters ve ark 1996 b). Fakat söz konusu aktivasyon daha sonra özellikle endotel hücrelerden PAI-1'in salınımıyla inhibe edilmektedir.

Endotelyumun antitrombotik özelliğine ilave olarak eksi yüklü yüzeyi, damar yaralanması sonucu başlatılan hemostatik cevabın intravasküler genişlemesini sınırlamada önemli rol oynamaktadır (Hack ve Zeerleder 2001). Hemostatik plağın şekillendiği yerde, endotel hücrelerden sentezlenen ve salınan PGI₂, intravasküler platelet agregasyonunu inhibe etmekte ve endotel yüzeye bağlı olan trombin inhibitörlerinin (trombomodülin ve heparan sülfat) katkılarıyla da, fibrinin intravasküler yayılımı sınırlandırılmaktadır (Marcus ve ark 1978). Endotel hücrelerce sentez edilen ve bir glikozaminoglikan olan heparan sülfat, AT-III'ü aktive etmekte ve böylece trombin ve FXa'nın inhibisyonu gerçekleşmektedir. Trombomodülin ise trombinin bağladığından trombinin plateletleri, FVa ve VIIIa'yı aktive etme yeteneği inhibe edilmiş, ayrıca protein C'nin aktivasyonu sağlanmış olmaktadır (Esmon 1999). Protein C; FVa ve VIIIa'yı inaktive etmekte, plazminojen aktivatör inhibitörlerini bağlamakta ve böylece fibrinolizisde rol oynamaktadır (Nawroth ve Stern 1986, Esmon 1999). Böylece endotel hücre yüzeyinde bulunan trombomodüline trombinin bağlanması, trombogenezis inhibisyonunun kuvvetlendirmektedir (Esmon 1999).

Endotel hücreler trombin, epinefrin ve travma gibi stimülantlarla uyarıldıklarında, adenilat siklaz ve cAMP yoluyla PGI₂ sentezlenmektedir. PGI₂ endotel hücrelerince prostasiklin sentetaz, tromboksan A2 ise trombositler tarafından siklooksijenaz yolu aracılığıyla ortak öncül maddeleri olan araşidonik asitten üretilmektedir (Weiss ve Turitto 1979). Tromboksan A2 trombosit kümelenmesi ve damar büzülmesini gerçekleştirirken, PGI₂ trombosit kümelenmesini önlemekte ve vazodilatasyona neden olmaktadır. Tromboksan A2 ve PGI₂ arasındaki denge yerel trombosit kümelenmesi ve sonuçta pıhtı oluşmasını artırırken, pıhtının aşırı yayılmasını önlemekte ve pıhtı çevresindeki kan akımının devam etmesini sağlamaktadır. Endotel hücreler histamin, ATP ve asetilkolin gibi diğer agonistlerle uyarıldıklarında ise guanilat siklaz stimülasyonu ve hücre içi siklik guanozin monofosfat (GMP) artışı meydana gelmektedir. Sonuçta; NO sentez edilip salınarak, vazodilatasyon ve platelet inhibisyonu oluşmaktadır (Radomski ve ark 1990).

Endotel hücreleri IL-1 α , IL-1 β ve TNF- α gibi çeşitli sitokinlerle stimüle edildikten ve aktifleşen kompleman gibi yangısal mediyatörlerle etkileşimden sonra antikoagülan özelliğini yitirerek adezyon moleküllerini oluşturmakta, yangısal mediyatörler ve vazoaktif bileşikler

üretmek prokoagulan bir yüzey haline almaktadır. Endotelial aktivasyon, uyarının süresine, özelliğine ve miktarına göre sınırlı ya da tüm endoteliumda gerçekleşebilmektedir. Bunun yanında endoteliumun yangısal uyarıcıya verdiği yanıtın şekli vücudun değişik bölgelerinde farklılık arzdebilmektedir (Muller ve Griesmacher 2000, Hack ve Zeerleder 2001, Vallet ve Wiel 2001).

Endotel hücreleri TNF- α , IL-1 veya endotoksin gibi stimulantlar ile uyarıldıktan sonra trombomodulin ve heparan sülfatını kaybederek birkaç saat içinde doku faktörü sentezlemeye başlanmaktadır (Hack ve Zeerleder 2001). Bunun sonucu olarak endotel hücreler artık protein C aktivasyonunu gerçekleştirememekte, pıhtılaşma inhibitörleri olan TFPI ile ATIII' ü kaybetmekte ve FVII ile TF'ün etkileşimi sonucu koagülasyon sisteminin ekstrinsik yolu aktifleşmemektedir. Ekstrinsik sistemin aktifleşmesiyle şekillenen FVIIa, Xa ve trombin, endotel hücreleri aktifleştirerek sitokin ve şemokinler gibi yangısal mediyatörlerin ve değişik adezyon moleküllerinin üretilmesini sağlamakta, böylece yangıyı daha da şiddetlendirmektedirler (Hack ve Zeerleder 2001).

Düşük doz endotoksinle başlatılan DIC'de fibrinolizisin bir göstergesi olan plazmin-antiplazmin kompleks düzeyi artmaktadır (Suffredini ve ark 1989). Ancak bu artış geçici olup endotoksin uygulanmasından itibaren yaklaşık 3 saat kadar sürmektedir. Daha sonra tPA ve ürekinaz tipi plazminojen aktivatörünün başlıca inhibitörü olan PAI-1 düzeyinin gittikçe yükselmesiyle inhibe edilmektedir. Nitekim in vivo TNF infüzyonu yapılan bir çalışmada; endoteliumdan plazminojen aktivasyonunu başlatan tPA'nın salınımının arttığı, TNF ile stimülasyondan sonraki birkaç saat içinde endoteliumun tPA'yı nötralize eden PAI-1'in salınımını gerçekleştirdiği ve fibrinolitik sistemin inhibe edilerek prokoagulan özelliğın baskın kılındığı belirtilmektedir. Sepsiste PAI-1'in plazma düzeyinin artmış olması, hastalığın şiddetinin ve muhtemel mortalite oranının yüksek olduğunun bir göstergesi sayılmaktadır (Hack ve Zeerleder 2001).

Endotelium fizyolojik şartlarda çok az miktarda adezyon molekülü oluşturmasına karşılık sitokinler gibi çeşitli agonistlerle uyarıldığında önemli düzeyde P-selektin, E-selektin, intersellüler ve vasküler adezyon molekül-1 gibi adezyon moleküllerini meydana getirmektedir. Sepsiste söz konusu moleküllerin plazma düzeylerinin belirlenmesiyle de endotelial aktivasyon derecesi hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Zimmerman ve ark 1992).

Çeşitli agonistler tarafından uyarılan endotel hücrelerce salınan endotelinler de vazospazma neden olmaktadır. Bu etkileriyle de endotelinler; vazodilatatör ajanların etkisini kompanse etmekte, organ disfonksiyonuna sebep olan intravasküler mikrotrombilerin

oluşmasını kolaylaştırmakta ve DIC'i daha da şiddetlendirmektedirler (Schmeck ve ark 1999, Titheradge 1999, Wanecek ve ark 2000).

Aktive olan endotelyum bahsedilen bileşikler yanında PAF, prostaglandinler, IL-6 gibi sitokinler, şemokinler ve kompleman faktörler gibi birçok yangısal mediyatörleri de üretmektedir. Deneysel endotoksemide, TNF infüzyonundan sonra ve septik hastalarda, endotel aktivasyonunun bir diğer göstergesi de kan vWF düzeyinin yüksek olarak belirlenmesidir (Hack ve Zeerleder 2001).

2.12. DIC Üzerine Prednisolon'un Etkileri :

Glukokortikoidler çok güçlü anti-enflamatuvar ve immunosupressif etkiye sahip olup sitokinlerin ve yangısal cevabın oluşması için ihtiyaç duyulan birçok hücre yüzey molekülünün sentezini inhibe etmektedirler (Han ve ark 1999). Sağlıklı bir organizmada glikokortikoid etkinliğinin %95'ini ise kortizol sağlamaktadır. Bununla birlikte prednison, prednisolon, betametason, deksametason gibi sentetik glikokortikoidler de mevcuttur.

Sepsiste; koagülasyon, fibrinolizis, kompleman ve kallikrein gibi proteolitik enzim sistemleri aktifleşerek DIC ile birlikte, kinin formasyonu ve hücre hasarı oluşmaktadır. Glukokortikoidler ise plazmin ve plazminojenin etkinleşmesi ile bradikininin inaktivasyonundan sorumlu olan kininazların aktivasyonunu sağlamaktadır (Putterman 1989, Houck ve Gladner 1970). Ayrıca endotoksin, kompleman ve sitokinlerle meydana getirilen prokoagülan doku faktörü oluşumunu da inhibe etmektedir (Latour 1983, Putterman 1989). Endotoksinin kompleman sistemi aktifleştirmesi sonucu özellikle C₅A, granülosit membranlarını etkilemekte ve granülosit agregasyonuna yol açmaktadır. Granülosit agregasyonu sepsisin patofizyolojisinde çok önemlidir. Çünkü bu agregatlar kapillar endotelyuma yapışmakta ve toksik maddeler salmaktadırlar. Glukokortikoidler ise hücre reseptörleri ile aktif kompleman arasındaki iletişimi azaltarak agregasyonu inhibe etmekte, nötrofillerin endotelyal yüzeye yapışma eğilimini azaltmakta ve endotelyumu serbest radikal zararından korumaktadırlar (Skubitz ve ark 1981, Munck ve ark 1984, Putterman 1989, Spijkstra ve Girbes 2000).

Sepsis ve septik şokun etiyo-patojenik sürecinde serbest radikaller, lizozomal enzimler ve çeşitli vazoaktif ajanlar önemli rol oynamaktadırlar. Glukokortikoidler hücreleri ve özellikle lizozomal enzimleri stabilize etmekte ve bir çok mediyatör salınımını (serbest radikaller gibi) engellemektedir (Clermont ve ark 1974). Glukokortikoidlerin deneysel septik

şokta mortalite oranını düşürdüğü, yalnız veya antibiyotiklerle birlikte verilmesinin faydalı olduğu savunulmaktadır (Putterman 1989).

Adrenalektomi gerçekleştirilmiş hayvanların deneysel enfeksiyonunda gözlenen yüksek ölüm oranının glukokortikoid uygulamasıyla azaldığı kaydedilmektedir (Spijkstra ve Girbes 2000). Yine benzer şekilde adrenal korteksin çeşitli ilaçlarla baskılanmasıyla mortalitenin önemli düzeyde arttığı, endojen glukokortikoidlerin sadece septik şokta değil aynı zamanda genel enfeksiyonlarda da olumlu rol oynadıkları savunulmaktadır (Hinshaw ve ark 1985). Herhangi bir enfeksiyon sonucunda immun sistem uyarılmaktadır. Bu durum normalde avantajlı olmasına karşın stimülasyonun yoğun ve kontrol edilemez derecede olması organizma için tehlikelidir. Septik şokta immun sistem genelde yoğun bir şekilde aktifleşmekte, glukokortikoidler ise immun cevabı baskılamaktadır. Hinshaw ve ark (1985) E. coli infüzyonuyla köpeklerde oluşturdukları septik şokta %100 mortalite gözlendiğini ve daha sonra sadece antibiyotik uygulanan grubunkine oranla antibiyotiğe ilaveten glukokortikoid uygulanan grupta ölüm oranının önemli düzeyde azaldığını belirtmektedirler. Yine glukokortikoidlerin olabildiğince erken dönemde uygulanması gerektiği, bununla birlikte bakteriyemiden 4 saat sonra bile uygulanmasının yararlı olduğu kaydedilmektedir (Spijkstra ve Girbes 2000).

Glukokortikoidler dakika kalp atım hacmini artırarak bölgesel ve koroner kan akımı üzerine olumlu etki sağlamaktadır. Ayrıca nitrik oksit sentezini bloke ederek de kan basıncını düzenlemede rol oynamaktadırlar (Spijkstra ve Girbes 2000).

Endotoksin kompleman sistemin alternatif yolunu ve FXII'yi aktifleştirmektedir. FXII, C₁'in aktifleştirilmesinde ve prekallikrein proenziminden kallikrein oluşturulmasında rol almaktadır. Kompleman sistemi ise doku ve kan damarlarında hasar oluşturmakta, koagülasyon sistemini ve plateletleri aktifleştirmektedir. Endotoksemide görülen trombositopeni, aktif kompleman sisteminin plateletlere zarar vermesinden dolayı da meydana gelmektedir. Glukokortikoid uygulamasının ise hem kompleman aktivasyonunu hem de trombositopeniyi engellediği belirtilmektedir (Latour 1983). Glukokortikoidlerin endotoksemide gelişen lökopeniyi engellediği de bildirilmektedir (Latour 1983). Glukokortikoidler, endotoksin verilen farelerde doku faktörü oluşumunu baskılamaktadır. Yine benzer şekilde deneysel endotoksemi oluşturulan ratlarda deksamethason, Faktör XII'nin aktivasyonunu engellerken, deksamethason verilmeyen hayvanlarda FXIIa'nin sirkülasyon düzeyi 2 saat sonunda pik seviyeye ulaşmaktadır. Glukokortikoidlerin bu etkisi sonucu ratlarda koagülasyon ve fibrinolitik sistem ile plateletlerin aktifleşemediği, ayrıca kinin oluşumunun da baskılandığı kaydedilmektedir. (Putterman 1989). Endotoksin

verilmeden önce tek doz steroid uygulamasının da koagülasyon aktivasyonunu engellediği belirtilmektedir (Latour 1983, Yamazaki ve ark 1999).

Glukokortikoidler DIC’te önemli fonksiyon üstlenen Fosfolipaz A2’yi inhibe ederek lipoksijenaz yolundan köken alan yangısal bileşiklerin ve lökötrienlerin üretimini engellemekte, ayrıca güçlü bir vazokonstriktör ve platelet agregantı olan tromboksan A2’nin sentezini azaltmaktadırlar (Latour 1983). Yüksek konsantrasyonda glukokortikoid uygulamasının endotoksemi esnasında plateletlerdeki serotonin kaybını, FIII oluşumunu, plateletlerin agregasyonunu ve trombositopeniyi engellediği kaydedilmektedir (Latour ve Leger 1975, Latour 1983).

Glukokortikoidlerin antiinflamatuvar fonksiyonları son yıllarda yeni bir yaklaşımla değerlendirilmektedir: Transkripsiyon faktör nükleer faktör (NF)- γ B normalde sitoplazmada I γ B olarak bilinen bir inhibitör protein ile inaktif kompleks halinde bulunmaktadır. Yangısal uyarıda I γ B’nin fosforilasyonu, bu kompleksin yıkılığını başlatmakta ve NF- γ B’nin nükleusa geçişi gerçekleşmektedir. NF- γ B nükleusta çeşitli pro-inflamatuvar genlerin oluşumunu indüklemektedir (Han ve ark 1999). Son yıllarda glukokortikoidlerin I γ Ba’nın transkripsiyonunu düzenleyerek (up-regülasyon) NF- γ B’nin nükleusa geçişini engellediği bildirilmektedir (Scheinman ve ark 1995). Ayrıca Glukokortikoidler (NF)- γ B’nin direk inhibisyonunu da sağlamaktadırlar.

Platelet aktive edici faktör (PAF) yangısal reaksiyonlara karışan çeşitli hücrelerce üretilen güçlü bir otokoid mediyatördür. PAF septik şok, allerjik reaksiyonlar, hematolojik anormallikler ve DIC gibi çeşitli yangısal durumlarda önemli patolojik role sahiptir. PAF endotoksine cevap olarak salınmakta ve (NF)- γ B’nin aktivasyonuna da sebep olmaktadır. Bu nedenle PAF yangısal reaksiyonların başlıca mediyatörü olarak kabul edilmektedir. PAF antagonistleri ile ön uygulama yapılması LPS ile indüklenen (NF)- γ B aktivasyonunu ve TNF- α oluşumunu önemli ölçüde azaltmaktadır. Sentetik bir glukokortikoid olan deksametazon da PAF antoagonisti olarak fonksiyon yapmakta dolayısıyla anafilaktik şok ve DIC semptomlarının oluşumunu engellemektedir (Han ve ark 1999). Nitekim Han ve ark (1999), deksametazon’un hemakonsantrasyon, trombositopeni, PT’nin uzaması, renal medulladaki hemoraji gibi DIC semptomlarının oluşumunu önlediğini bildirmektedirler.

2.13. DIC üzerine Vitamin E (α -tokoferol)’nin Etkileri:

Tokoferoller açık sarı renkte, yapışkan kıvamda, lipit ve birçok organik eritkenlerde eriyen, suda erimeyen maddelerdir. Vitamin E aktivitesi gösteren bileşikler tokol veya

tokotriol çekirdeğine sahiptirler. Sentetik dl- α - tokoferil asetat'ın 1 mg'ının aktivitesi 1 Uluslar arası Birim Vitamin E olarak kabul edilmiştir (Dündar ve Aslan 2000).

Biyolojik membranlardaki oksidatif bozulmanın söz konusu olduğu madde fosfolipid bileşikleridir. Fosfolipidlerdeki yapısal değişiklikler membran ve hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır. Membranların lipid peroksidasyondan fazla etkilenmeleri, fosfolipit bileşiklerinin çoklu doymamış yağ asidi taşımalarından kaynaklanmaktadır. Peroksidasyon düzeyi, fosfolipitlerde bulunan yağ asitlerindeki çift bağların sayısı ile doğrudan ilgilidir. Özellikle α -tokoferol çok kolay oksitlenebilme yeteneğine sahiptir. Vitamin E'nin biyolojik ortamlarda gerçekleştirdiği işlev büyük oranda bu özelliğine dayanmaktadır. Antioksidan karakteri nedeniyle vitamin E, serbest radikallerle reaksiyona girerek oksidasyona duyarlı moleküler yapıların istenmeyen oksidasyonlarının önlenmesi ya da azaltılmasında etkili olmaktadır. Antioksidanların sağladığı direncin kırılması oksidatif strese yol açmaktadır (Takeda ve ark 1986, Dündar ve Aslan 2000).

Antioksidan maddelerin başlıca etki şekilleri şunlardır: oluşan serbest radikalleri bağlamak veya kararlı hale getirmek; serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurmak; baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltmak; onarıcı etki ile lipid, protein ve DNA gibi yapılardaki biyolojik moleküler hasarı rejenere etmek; hücre kinaz kayıplarını önleyerek oksidasyon reaksiyonlarını durdurmak ve; organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırmak. Günümüzde Vitamin E'nin de söz konusu mekanizmaların çoğunun gerçekleşmesinde etkili olduğu, çok hızlı ve geniş bir antioksidan etki kapasitesine sahip bulunduğu bildirilmektedir (McKechnie ve ark 1986, Sugimoto ve ark 1991, Dündar ve Aslan 2000,).

Oksijen radikalleri, membranlarda proteinleri yıkıma uğratan ve sülfidril enzimlerini inaktive eden peroksidize lipitleri oluşturmak için poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girmektedir (Takeda ve ark 1986, Basu ve Eriksson 2000). Dolayısıyla membran yapısı değişmekte ve nihayetinde hücre ölümleri ile organ disfonksiyonları meydana gelmektedir. Lipid peroksidleri tiobarbitürik asit ile reaksiyona girerek tiobarbitürik asit reaktif yapılarını (TBARS= thiobarbituric acid reactive substance) şekillendirmektedir. Klinik ve deneysel septik hayvanlarda karaciğer, akciğer, böbrek, beyin ve plazmada TBARS düzeyindeki artış spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir (Takeda ve ark 1986). Endotoksemi ve DIC'de meydana gelen doku hasarının başlıca sebebinin oksijen serbest radikalleri olduğu belirtilmektedir (McKechnie ve ark 1986). Endotoksin, kompleman sisteminde özellikle C5'i aktive etmekte ve bu da PMNL'nin aktifleşmesine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda PMNL'ler araşidonik asit derivatları ile lizozomal enzimler salmakta ve oksijen serbest

radikalleri oluşturmaktadır (McKechnie ve ark 1986, Okajima 1999). PMNL tarafından oluşturulan serbest radikal, süperoksit anyon radikali (O_2^-) olup bu radikal süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlenen bir reaksiyon ile hidrojen peroksidi (H_2O_2) oluşturmaktadır. H_2O_2 düzeyi fazlaysa daha sonra da yüksek reaktif bir serbest radikal olan hidroksil radikali ($.OH$) oluşturulmaktadır. Hidroksil radikallerinin yüksek düzeyde oluşumuna karşı fizyolojik bir savunma mekanizması bulunmamaktadır. Bu nedenle H_2O_2 'nin normal olarak katalaz veya glutasyon peroksidazın etkisinin ayrıştırılması önem arz etmektedir (McKechnie ve ark 1986).

Oksijen serbest radikalleri gram negatif septik şokun patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Fagositler yanıt olarak süperoksit ve hidroksil radikalleri meydana getirmektedir (Broner ve ark 1989, Nussler ve ark 1999). Bu radikaller lipit peroksidasyonuna, paraneşimal hücre hasarına ve membran permeabilitesinde artışa sebep olarak DIC gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar (Broner ve ark 1989).

Endotoksinin, farelerde karaciğer SOD ve glutasyon peroksidaz düzeyini azalttığı, plazma ve karaciğer α -tokoferol konsantrasyonunu düşürdüğü bildirilmektedir. Deneysel endotoksemiden önce α -tokoferol uygulaması halinde ise SOD aktivitesi ve plazma α -tokoferol konsantrasyonunun azalmadığı belirtilmektedir (Sakaguchi ve ark 1981).

Vitamin E'nin, serbest radikal yakalama özelliği sayesinde, septik şoklu domuzlarda mortalite oranını azalttığı belirtilmektedir (Basu ve Eriksson 2000). Yine α -tokoferol uygulaması sonucu endotoksemik hale getirilen ratlarda, mortalitede önemli düzeyde azalma ve DIC'de düzelme gözlenmiştir (Yoshikawa ve ark 1982). Bunların yanında α -tokoferol hem endotoksinle oluşturulan membran hasarının hem de lipit peroksidasyonundaki artışa engellemektedir (McKechnie ve ark 1986).

Vitamin E intermittant klaudikasyon, serebral arterioskleroz ve koroner arter hastalıkları gibi bazı trombotik bozuklukların insidensini azaltmada etkili olabilmektedir (Yoshikawa ve ark 1982). Vitamin E antitrombotik özelliğinden dolayı tromboembolizmde kullanılmakta ve DIC oluşumunu önemli düzeyde engellemektedir (Yoshikawa ve ark 1982). Yoshikawa ve ark (1984), ratlarda endotoksin ile oluşturulan DIC'te, plateletlerin hidrojen peroksit ile agregasyonunun başlatıldığını, vitamin E'nin ise platelet agregasyonunun inhibe etme ve lipit peroksidasyonunu engelleme fonksiyonlarından dolayı DIC'i önemli oranda baskıladığını kaydetmektedirler. Yine Yoshikawa ve ark (1983), ratlarda yapmış oldukları diğer bir çalışmada SOD ve katalaz gibi antioksidanların da endotoksin ile oluşturulan DIC'in gelişimini engellediğini bildirmekte ve platelet aktivasyonu ile trombüs oluşumunda reaktif oksijen türlerinin önemli rolü olduğunu vurgulamaktadırlar.

2.14. DIC'te Diyagnoz

DIC oluşumunun engellenmesi; sepsisin erken döneminde teşhis edilebilmesine ve radikal bir tedavi uygulanmasına bağlıdır. Bununla birlikte gerek teşhis gerekse tedavide bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır (Müller-Berghaus ve ark 1999).

DIC'i tam olarak tanımlayabilecek tek bir test yoktur. Buna rağmen bazı laboratuvar test sonuçları ile klinik belirtilerin kombine yorumu DIC teşhisine yardımcı olmaktadır. Günümüzde DIC'in diyagnozunda başta "solubl fibrin testi" olmak üzere platelet sayısı, APTT, PT, ATIII , bazı pıhtılaşma faktörleri ve FDP gibi parametrelerin belirlenmesi amacıyla diğer testlerden yararlanılmaktadır (Levi ve ten Cate 1999). Solubl fibrin testi DIC'te kesin diyagnoz aracı olmasına rağmen bu test rutin kullanımda bulunmamaktadır (Okajima ve ark 1996, Müller-Berghaus ve ark 1999). Platelet sayısındaki düşme DIC'de çok sık gözlenen bir belirtidir. APTT ve PT'nin uzaması ise, çeşitli koagulasyon faktörlerinin kullanıldığının ve sonuçta azaldığının bir göstergesidir. Ayrıca bazı koagulasyon faktörleri düzeylerinin belirlenmesi de teşhisi destekleyebilmektedir. Özellikle trombinin en önemli inhibitörü olan ATIII düzeyinin ölçümünün yararlı hatta gerekli olduğu savunulmaktadır. Fibrinojen düzeyi ölçülebilmekle birlikte, DIC'in diyagnozunda tam belirleyici olmaktan uzaktır. Zira fibrinojen bir akut faz reaktant olarak hareket etmekte ve tüketimine rağmen plazmada uzun bir süre fizyolojik sınırlarda kalabilmektedir. Bununla birlikte şiddetli durumlarda genellikle hipofibrinojenemi görülmektedir. FDP'nin belirlenmesi diğer testlerle birlikte DIC'in ayırıcı tanısına yardımcı olabilmektedir. DIC'de bazı parametrelerin (örneğin, Protrombin F₁₊₂ veya Trombin-antitrombin kompleksi) plazma düzeylerinin yüksek belirlenmesi de koagulasyon aktivasyonunu akla getirmektedir. Söz konusu parametrelerle birlikte fibrinopeptit A (FPA) düzeyindeki artış da DIC'in indikatörü olarak kabul edilebilmekte, fakat değerlendirmede diğer test sonuçlarının da dikkate alınması gerekmektedir (Müller-Berghaus ve ark 1999).

Protrombinin trombine dönüşmesi koagulasyonda anahtar rol oynamaktadır. Trombin ise ya fibrinojeni proteolize ederek FPA'nın serbest bırakılmasını sağlamakta ya da antagonisti olan ATIII ile stabil inaktif enzim-inhibitör kompleksini (trombin-antitrombin, TAT) şekillendirmektedir. Sirkülasyondaki yoğun FXa ve trombin oluşumunun kanıtı olarak, PF₁₊₂ ve TAT testlerinden yararlanılmaktadır (Bick 1994). FPA'nın plazma düzeyi DIC'te yüksek bulunmakta ve hemostazis aktivasyonunun göstergesi olarak kabul edilebilmektedir. FPA'nın mevcudiyeti fibrinojen üzerine etki eden trombinin varlığını göstermesi yönüyle diyagnostik önem taşımaktadır. Ayrıca TAT kompleksinin plazma düzeyinin yüksek belirlenmesi, prokoagulant aktivasyon ve inhibitör tüketiminin direkt bir

kanıtını oluşturmaktadır (Carey ve Rodgers 1998, Bick 1994). FPA ve PF₁₊₂ gibi aktivasyon parametrelerinin ölçülmesiyle DIC teşhisi konulabilirse de bu testler rutin kullanımda mevcut değildir. Ayrıca pnemoni ve peritonitis gibi bazı durumlarda da FPA ve F₁₊₂ düzeyleri yükselbileceği için DIC'in diyagnozunda bu durumun göz önüne alınması gerekmektedir. (Müller-Berghaus ve ark 1999).

DIC'te fibrinolitik sistem klinik laboratuvarlarda değerlendirilebilmektedir. DIC'te tipik olarak plazminojen düzeyi düşmekte ve sirkülasyonda plazmin bulunmaktadır. Bununla birlikte plazmin alfa2-antiplazmin (alfa2-PI) ve alfa2-makroglobulin ile kompleks oluşturarak hızlıca inaktive edilmektedir. Bu iki fibrinolitik sistem inhibitörünün plazmada yüksek seviyede bulunması; fibrin monomerlerinin artması ve fibrin birikimine, sonuçta da vasküler trombozise yol açmaktadır. Plazmin ile alfa2-PI kompleksi (PAP) varlığı fibrinolitik sistem hakkında bilgi vermekte ve in vivo plazmin oluşumunun direkt bir indikatörü olarak kabul edilmektedir. DIC'te düşük alfa2-PI düzeyi fibrinolitik aktivasyonun ve inhibitör tüketimi için indirekt bir gösterge, yüksek PAP kompleksi düzeyi ise hem fibrinolitik aktivasyon hem de inhibitör tüketiminin direkt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Bick 1994, Marder ve ark 1994).

Pıhtılaşma sistemlerinin kontrolü "screening tests" adı verilen; PT, APTT ve TT gibi pıhtılaşma sistemlerini ayrı ayrı inceleyen bir takım izleme testleri ile yapılmaktadır (Deniz 1999).

PT testi ile eksojen pıhtılaşma sistemi, dolayısıyla plazma FVII, X, V ve II aktiviteyi ile fibrinojen konsantrasyonu kontrol edilmektedir (Gentry ve Cooper 1979, Rocha ve ark 1998, Deniz 2000). Şiddetli DIC vakalarında meydana gelen hipofibrinojenemi durumu ve FDP oluşumunun; fibrin monomer polimerizasyonunu engellemesi sonucu PT uzamaktadır. Ayrıca plazmin tarafından FV ve IX'un lize edilmesi de PT süresinin uzamasına neden olmaktadır. DIC'li hastaların yaklaşık %25 inde ise PT süresi normal veya kısalmış olarak bulunmaktadır. Bunun sebebi ise; sirkülasyondaki trombin ve FXa gibi aktif pıhtılaşma faktörlerinin mevcut olmasının fibrin formasyonunu hızlandırmasına bağlanmaktadır (Bick 1994).

Endojen pıhtılaşma sistemini kontrol eden APTT testiyle FXII, XI, IX, VIII:C yanında, FX, V ve II aktiviteyi ile fibrinojen, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (AMK) ve prekallikrein düzeylerindeki değişimler belirlenmektedir (Bick 1994, Rocha ve ark 1998, Deniz 2000). Özellikle şiddetli DIC durumlarında pıhtılaşma faktörlerinin kullanılarak tüketilmesi ve plazmin tarafından FV, VIII:C, IX ve XI'in sindirilmesi ile fibrinojen düzeyinin azalması sonucu APTT uzamaktadır (Bick 1994).

TT testi ile fibrinojenin fibrin monomerlerine dönüşüm süresi kontrol edilmektedir. DIC'te olduğu gibi plazma fibrinojen konsantrasyonunun azaldığı, fibrin ve fibrinojen parçalanma ürünlerinin arttığı durumda TT patolojik olarak uzamaktadır. Bu durum fibrinojenin fibrine dönüşümünün aksadığının dolayısıyla pıhtılaşma bozukluğunun göstergesidir (Bick 1994, Rocha ve ark 1998).

Plazmin fibrinojenin karboksi terminal grubunu parçalayarak fibrinojen yıkım ürünleri olarak adlandırılan FDP oluşumuna sebep olmaktadır. FDP sirkülasyondaki fibrin monomerleri ile kombinasyon kurarak onları çözünebilir bir forma sokmakta ve FDP ile fibrin monomerlerinin oluşturduğu bu kompleks "soluble fibrin monomer" olarak adlandırılmaktadır. Soluble fibrin monomerlerinin mevcudiyeti prokoagülan reaksiyonun varlığını ortaya koymakta ve DIC'in diyagnozisinde önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Sirkülasyondaki FDP, fibrin monomer polimerizasyonunu engellemekte ve hemostazisi bozarak hemorajilere sebep olmaktadır (Bick 1994, Rocha ve ark 1998, Levi ve ten Cate 1999). Daha sonra şekillenen fragmentler (D ve E) plateletlerde önemli fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır. FDP söz konusu diğer parametrelerle birlikte yorumlandığında diyagnoz için önemli bir parametredir (Lane ve ark 1978). Son yıllarda uygulamaya sokulan D-Dimer testinin DIC'in diyagnozunda FDP ölçümünden daha sensitiv olduğu ve D-Dimer düzeyinin intravasküler fibrin yıkılımının önemli bir göstergesi olduğu belirtilmektedir (Bick 1994, Müller-Berghaus ve ark 1999). FDP oluşumu ile X, Y, D ve E fragmentlerinin meydana gelmesi, fibrinojen ve fibrinin proteolitik olarak plazmin tarafından parçalandığını, sonuçta fibrinolitik aktivitenin yükseldiğini göstermektedir. D-Dimer testi ise sadece yıkılım ürünleri için spesifiktir. Bu nedenle DIC'de faydalanılan en güvenilir test olarak kabul edilmektedir. Proteolitik bir enzim olan plazmin fibrinojen ve fibrine eşit affinite göstermektedir. Plazmin çapraz bağlı fibrinleri sindirdiği için sirkülasyonda spesifik FDP'ler açığa çıkmaktadır. Bunlardan birisi de D-Dimer neoantijenidir (Lane ve ark 1978, Bick ve Baker 1992). Plazmin ayrıca FV, VIII:C, IX ve XI'i de parçalamaktadır (Bick 1994).

DIC oluşumu üç fazda incelenebilmektedir.

FAZ- I (Hemostatik sistemin kompanse aktivasyonu): Bu fazda klinik bir bulgu gözlenmemektedir. Fakat DIC'e sebep olma ihtimali olan bir hastalık söz konusuysa koagülasyon aktivasyon derecesini gösteren testler yapılmalıdır. Bu fazda genelde F₁₊₂ ve TAT düzeylerinde yükselme, AT'de hafif düşme, solubl fibrin düzeyinde ise bazen artma görülmekte, diğer parametrelerde herhangi bir değişiklik olmamaktadır (Müller-Berghaus ve ark 1999, Levi ve ten Cate 1999),

FAZ-II (Hemostatik sistemin Dekompense aktivasyonu); PT ve APTT uzarken, TT normal kalabilmektedir. Fibrinojen seviyesi normal, FDP seviyesi ise hafif düzeyde yüksektir. Bu fazda platelet sayısı, fibrinojen konsantrasyonu ve özellikle FV aktivitesinde sürekli bir düşüş görülebilmektedir. Söz konusu fazda koagülasyon parametreleri düzeyleri sık aralıklarla belirlenmelidir (Bick 1994, Müller-Berghaus ve ark 1999).

FAZ-III (Full-Blown DIC); Bu faz PT, APTT ve TT de önemli derecede uzama ve platelet sayısında aşırı düşme ile karakterizedir. Koagülasyon faktörleri aktivasyonu %50 artmıştır. Screening test sonuçlarına ilave olarak inhibitörlerin aktivasyonunun %50 azaldığı belirlenirse bu durum DIC olarak yorumlanmaktadır. DIC'te frotilerde parçalanmış alyuvarların (şistiyosit) gözlenmesi mikropıhtı oluşumunun göstergesidir. Bu fazda AT aktivitesi, protein C seviyesi, plazminojen aktivitesi, PAP kompleksi ve PAI-1 aktivitesi gibi bazı hemostatik parametreler de değerlendirilmelidir (Marder ve ark 1994, Mammen 1998, Rocha ve ark 1998, Müller-Berghaus ve ark 1999).

DIC'in diyagnozunda genelde kabul edilen kriterler şunlardır; 1- Prokoagülan aktivasyon; Protrombin F₁₊₂, Fibrinopeptit A ve B , Trombin-antitrombin (TAT) kompleksi ve soluble fibrin düzeylerinin artışı 2- Fibrinolitik aktivasyon; D-Dimer, FDP, Plazmin- α 2antiplazmin (PAP) kompleks düzeylerinin artışı 3-İnhibitör tüketimi; ATIII ve α 2 antiplazmin düzeylerinin düşüşü 4- MOF oluşumu; Serum laktik dehidrogenaz ve kreatinin seviyelerinin artışı ile kan pH ve pCO₂ seviyelerinin düşüşü (Bick 1994, Faulkner 1995, Carey ve Rodgers 1998). Ayrıca TF'nin plazma antijen seviyesi de DIC'in gelişimi hakkında bilgi vermektedir (Asakura ve ark 1995, Carey ve Rodgers 1998).

DIC'de gelişen önemli düzeydeki trombositopeni, bazı hastalıklarda görülen ve kemik iliği kaynaklı trombositopeni ile karıştırılmamalıdır. Glikokalsin, platelet membran glikoproteini (GP)Ib α 'nın plazmince yıkımından sonra salınmaktadır. DIC'li hastalarda artan platelet yıkımı nedeniyle, plazmada yüksek seviyede glikokalsin konsantrasyonu belirlenmekte ve bundan DIC ile aplastik trombositopeninin ayırıcı teşhisinde yararlanılmaktadır (Carey ve Rodgers 1998).

Septik DIC'li hastalarda, plazma PAF konsantrasyonu da yüksek düzeyde bulunmaktadır (Carey ve Rodgers 1998, Han ve ark 1999).

2.15. DIC'te başlıca tedavi yaklaşımları:

Gerek kompanse gerekse dekompanse DIC olgusunun tedavisinde 3 unsura dikkat edilmesi gerekmektedir;

1- DIC'i başlatan ve gelişimine sebep olan hastalıkların elimine edilmesi

2- İnvasküler pıhtılaşma sürecinin durdurulması

3- Koagülasyon komponentlerinin kana ilave edilmesi

Bunlardan birincisi çok önemlidir; Çünkü DIC'e sebep olan hastalık hızlı bir şekilde elimine edilmediği takdirde tedavi sonuç vermeyecek ve DIC devam edecektir. DIC oluşumunun nedenleri çok farklı olduğundan nedene yönelik spesifik tedavi yapılması gerekmektedir. Örneğin, Abruptio placentae oluşumu ile şekillenen DIC'de uterusun çıkarılması, gram-negatif enfeksiyonlarda şekillenen DIC'de ise antibiyotik uygulaması en uygun tedavi şekli olmaktadır.

Tedavide ikinci yaklaşım invasküler pıhtılaşma sürecinin durdurulması olmalıdır. Nitelikli çeşitli proteaz inhibitörlerinin (Gabexate, aprotinin vs.) DIC'in düzeltilmesi yönünde olumlu etkilerinin bulunduğu belirtilmektedir. Yine rekombinant α 1-antitripsinin, trombin ve bazı kontakt koagülasyon faktörlerinin (XIa, kallikrein, XIIa) güçlü bir inhibitörü olduğu bildirilmektedir (Carey ve Rodgers 1998). Sepsiste DIC'i başlatmada TF aktivitesinin öneminden dolayı TF'ye karşı antiproteinazların etkinliğinin araştırıldığı çalışmada; rekombinant TFPI'nın IL-6 düzeyi yanında mortaliteyi de azalttığı belirtilmektedir (Creasy ve Reinhart 2001). Yine bobonlara letal doz E.coli uygulanması sonrası, aktif Protein C (APC) infüzyonunun DIC'i ve öldürücü organ zararını engelleyebildiği belirtilmektedir (Taylor ve ark 1987). Koagülasyonun en önemli fizyolojik inhibitörü olan ATIII'ün sepsisteki koagülasyon bozukluğunu hafifletmekte önemli bir rolü bulunmaktadır (Levi ve ark 2001). Akut dekompanse DIC'li hastalara tedavi amaçlı düşük dozda heparin uygulaması yapılabilmekle birlikte, heparinin kullanımı bugün henüz tartışmalıdır (Marder ve ark 1994, Mammen 1998). Heparin tedavisinin en iyi sonucu malignant kronik DIC'li hastalarda görülmektedir. Akut lökemi ve özellikle promiyelotik lökemide gelişen DIC' de heparin tedavisi tavsiye edilmektedir (Carey ve Rodgers 1998).

DIC tedavisindeki son yaklaşım ise ; azalan fibrinojen düzeyi için taze plazma, trombositopeni için platelet ve oksijen taşıma kapasitesinin artırılması için de eritrosit ilavesi yapılmasıdır. Akut dekompanse DIC'de gözlenen diffüz hemoraji; pıhtılaşma faktörlerinin düşük konsantrasyonu ve trombositopeniden dolayı olmaktadır. DIC olgularında, özellikle II. ve III.fazda söz konusu komponentlerin plazma konsantrasyonlarının fizyolojik düzeye yükseltilmesi gerekmektedir. Konsantre platelet ve taze plazma hemostazis için ihtiyaç duyulan birçok prokoagulan faktörü içermektedir. Bununla birlikte bu tür uygulama ile ilgili bilimsel araştırmalar sınırlı olup söz konusu maddelerin ilavesinin mantıksal bir yaklaşım olduğu bildirilmektedir (Levi ve ark 1999).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada Adana Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen sağlıklı ve canlı ağırlıkları 1.5-2.5 kg civarında olan 30 adet erkek Yeni Zelanda ırkı tavşandan yararlanıldı. Hayvanlar deneme süresi boyunca, S.Ü. Veteriner Fakültesi Deneme Hayvanları Ünitesi'ndeki padoklarda barındırıldı. Araştırmaya başlamadan önce hayvanlar bir hafta süre ile çalışma ortamında tutuldu ve araştırma süresi boyunca barınakların ısısı ortalama 20°C dolayındaydı. Hayvanlar standart tavşan yemi ile *ad libitum* beslenirken önlerinde sürekli temiz su bulunduruldu.

Çalışmaya başlamadan önce hayvanlar gerekli sağlık kontrolünden geçirilerek canlı ağırlıkları belirlendi ve ortalama canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde üç eşit gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol (K) olarak kullanılırken, hayvanlara 6 saat boyunca 100 µg/kg/saat dozunda endotoksin (*Esherichia Coli* lipopolisakariti, 0.111:B4 serotip, Sigma SIL4130) infüzyon tarzında uygulandı. İkinci grubu oluşturan hayvanlara ise yine aynı süre ve dozdaki endotoksin infüzyonundan önceki 4 gün 10 mg/kg/gün İP Vitamin E (E) (DL-alpha tocopherol acetat, Evigen ® amp, Aksu Farma, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu yapılarak son enjeksiyonu takiben 10. dakikadan itibaren endotoksin infüzyonuna başlandı. Üçüncü gruptaki (prednizolon, P) hayvanlara aynı süre ve dozdaki endotoksin infüzyonundan 30 dakika önce 10mg/kg SK prednisolon (Prednisolon ® amp, Fako, İstanbul, Türkiye) verildi. Her üç gruptaki hayvanların arteria femoralislerinden anestezi altında ve sırasıyla kan alındıktan sonra (0.saat) hayvanların marjinal kulak venlerine serum fizyolojikte dilue edilmiş endotoksin infüzyonuna başlandı. İnfüzyonu izleyen 2., 4. ve 6. saatlerde tekrar aynı sırayla kan örnekleri alındı. Alınan örneklerde; plazma APTT, PT, TT, fibrinojen ve D-Dimer düzeyleri ile kan platelet sayısı, lökosit sayısı ve lökosit yüzdeleri belirlendi.

3.2. Metot

3.2.1. Anestezi: Hayvanlar anesteziye alınmadan önceki 12 saat boyunca aç bırakıldıktan sonra intramusküler olarak 2×10^{-3} mg/kg ksilazin hidroklorür ve 30mg/kg ketamin hidroklorür uygulaması ile anesteziye alındı ve anestezi, çalışma süresince intramusküler olarak ketamin hidroklorür'ün idame dozu (15mg/kg) ile sürdürüldü (Hermida ve ark 1999, Munoz ve ark 1999).

3.2.2. Femoral arterin diseksiyonu: Operasyon masasına sırt üstü yatırılan hayvanların ekstremiteleri orta gerginlikte bağlanarak muhtemel hareketleri kısıtlandı. Arteria femoralis bölgesi traş edildikten sonra gerekli şirürjikal prosedüre uyularak arteria femoralis bölgesine yaklaşık 2 cm uzunluğunda bir ensizyon yapıldı ve deri açıldıktan sonra deri altı dokular ve fasialar kaldırıldı. Daha sonra küt diseksiyonla arteria femoralis bulunarak kan almak üzere steril intraketler yerleştirildi (Hermida ve ark 1999, Montes ve ark 2000).

3.2.3. Deneysel endotokseminin oluşturulması: Bu amaçla her hayvan için 600µg/kg canlı ağırlık miktarındaki endotoksin (Esheria Coli lipopolisakkarit, 0.111:B4 serotip, Sigma SIL4130) 60 ml serum fizyolojik içerisinde çözündürüldükten sonra infüzyon uygulamasına kadar -20°C’de muhafaza edildi. Uygulanacağında endotoksin 37°C’lik su banyosunda çözündürüldükten sonra; daha önce tavşanların marjinal kulak venine basit dikişlerle sabitlenen steril intraket aracılığıyla saatte 10ml hızla ve 6 saat süresince infüze edildi. (Hermida ve ark 1999, Munoz ve ark 1999, Montes ve ark 2000).

3.2.4. Kan örneklerinin alınması, işlenmesi ve depolanması: Kan örnekleri endotoksin infüzyonundan hemen önce (0.saat) ve infüzyondan sonraki 2., 4. ve 6.saatlerde femoral artere yerleştirilen intraket yardımıyla alındı. Alınan kanlar, içerisinde %3.8’lik sodyum sitrat bulunan tüplere 1/9 oranında yavaşça boşaltıldıktan sonra kan ile antikoagülantın iyice karışması sağlandı. Kan örnekleri en fazla 2 saat içerisinde santrifüj edilmek şartıyla buz içinde muhafaza edildi. PT, APTT, TT, Fibrinojen ve D-Dimer düzeylerinin belirlenmesi amacıyla 3000 devirde +4°C’ de 20 dakika boyunca santrifüj edilen (Hettich zentrifugen, universal 30RF) kan örneklerinden elde edilen plazmalar analiz edilene kadar -70°C’de depo edildi (Warr ve ark 1990, Hermida ve ark 1999, Munoz ve ark 1999, Montes ve ark 2000). Ayrıca trombosit ve lökosit sayımı ile lökosit formülünün belirlenmesi amacıyla EDTA’lı tüplere yeterince kan alındı (1.2mg EDTA/ml kan).

3.2.5. Hematolojik ve hemostatik analizler:

3.2.5.1. Protrombin zamanı (PT)’nın belirlenmesi: Bu amaçla 100µl sitratlı plazma (1/9 v/v) 37°C’de dijital koagulometrede (Option 2 Plus coagulometer, bioMerieux, 1668, Behnk Electronic, Germany) 2 dakika inkübe edildikten sonra, içerisine yine 37°C’de 15 dakika ısıtılmış 200µl kalsiyum tromboplastin reaktifi (HEMOLAB Isımat 1, standartize insan kalsiyum tromboplastini ve çözücü olarak NaN₃ 0.5 g/L (0.05%), bioMerieux Sa, 95743,

Fransa) ilave edilerek pıhtılaşma başlatıldı. Sonuçta oluşan ilk pıhtı ile birlikte koagulometredeki duran dijital saatten PT saniye olarak okundu.

3.2.5.2. Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT)'nın belirlenmesi: 100µl sitratlı plazma ve 100µl HEMOLAB Silimat karışımı (sefalin ve mikronize silika'nın tampon süspansiyonu, çözücü olarak NaN_3 1g/L, yüzey aktivatörü olan APTT reaktifi, bioMerieux Sa 95708, Fransa) 37°C'de dijital koagulometrede (Option 2 Plus coagulometer, bioMerieux, 1668, Behnk Electronic, Germany) 3 dakika inkübe edildikten sonra, 100 µl CaCl_2 çözeltisi (0.025mol/L, 37°C) bu karışıma ilave edilerek pıhtılaşma başlatıldı. İlk pıhtı oluşumu ile birlikte koagulometredeki duran dijital saatten APTT saniye olarak okundu.

3.2.5.3. Trombin zamanı (TT)'nin belirlenmesi: Bunun için 37°C'de 2 dakika ısıtılan 200 µl sitratlı plazma içerisine yine 37°C'de 2 dakika ısıtılan 200 µl "Thromboquik" (bovine thrombin, calcium chloride, 35515, organon teknika corporation, USA) ilave edilerek pıhtılaşma başlatıldı. Oluşan ilk fibrin monomeri ile birlikte koagulometredeki (Option 2 Plus coagulometer, bioMerieux, 1668, Behnk Electronic, Germany) duran dijital saatten TT saniye olarak okundu.

3.2.5.4. Fibrinojen düzeyinin belirlenmesi; 950 µl "HEMOLAB Fibrinomat Diluent" ve 50 µl sitratlı plazma karışımından 200 µl alınarak 37°C'de koagulometrede (Option 2 Plus coagulometer, bioMerieux, 1668, Behnk Electronic, Germany) 4-6 dakika inkübe edildikten sonra, 100 µl fibrinojen reaktifi (HEMOSTAT FİBRİNOGEN, Human Gasellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Germany) bu karışıma ilave edilerek ve pıhtılaşma başlatıldı. Koagulometrenin dijital saatinin durmasıyla gram cinsinden fibrinojen miktarı okundu.

3.2.5.5. D-Dimer Düzeyinin belirlenmesi: Bu amaç için sitratlı plazma (1/9 v/v), otomatik koagulometre (Amex-190) ve "AUTO D-Dimer" kitinden (Sigma diagnostics, procedure No.CRS126) yararlanılmıştır. Bu amaçla; 30 µl sitratlı plazmaya (1/9 v/v) 50 µl "AUTO D-Dimer Reaction Buffer" reaktifi (pH 7.0, Sodium azide 0.095%, catalog No. A4717) ilave edilerek koagulometrede (Amex-190) 20 saniye inkübe edildi. Daha sonra bu karışıma 70 µl "AUTO D-Dimer reagent"ı (Buffer solution, mause monoclonal antibody MA-803 directed against D-dimer, 0.095% sodium azide, catalog No.A4592) ilave edilerek 300 saniye sonra koagulometreden değer µg/ml cinsinden okundu.

3.2.5.6. Trombosit sayımı: EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri (1.2 mg EDTA/ ml kan), alyuvar sulandırma pipetlerinde Rees-Ecker eriyiği ile 100 kat sulandırıldıktan sonra ışık mikroskobunda (olympus optical co. LTD, Japan) 40'luk objektifle ve Thoma lamı yardımıyla incelenerek hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. (Konuk 1981).

3.2.5.7. Lökosit sayımı: Kan örneklerinin lökosit sulandırma pipetinde Türk eriyiği ile 10 kat sulandırılmasından sonra klasik sayma yöntemiyle ışık mikroskobunda (olympus optical co. LTD, Japan) ve Thoma lamı kullanılarak incelenmesiyle hücrelerin sayısı belirlendi (Konuk 1981).

3.2.5.8. Lökosit formülü: Lökosit tiplerinin yüzde oranları May Grünwald-Giemsa boyama yöntemi ile boyanan sürme kan frotilerinde hücrelerin ışık mikroskobunun immersiyon objektifinde identifikasyonu yoluyla belirlendi (Konuk 1981).

3.2.6. İstatistiki Analizler:

Araştırmada incelenen parametrelerin gruplar arası ve grup içi farklılıklarının istatistiksel analizinde SPSS 10.0 programından tukey testi kullanılmıştır (SPSS, 1998).

4. BULGULAR

Çalışmada K (Kontrol, Endotoksin), E (Vit. E+ Endotoksin) ve P (Prednisolon + Endotoksin) gruplarında endotoksin infüzyonu öncesi (0.saat) ile uygulamayı izleyen 2.,4.,ve 6.saatlerde belirlenen ortalama aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT), protrombin zamanı (PT), trombin zamanı (TT) ile fibrinojen ve D-Dimer düzeyleri Tablo 1’de, ortalama trombosit ve lökosit sayısı ile lökosit yüzdeleri ise Tablo 2’de sunuldu.

Endojen sistem aktivasyonunu belirleyici parametrelerinden birisi olan APTT ortalama değeri; K grubunda 0.saate (65.71sn) göre infüzyondan sonraki 2.saatte (73.39sn) istatistiki yönden önemsiz, 4.ve 6.saatlerde ise (sırasıyla; 105.67 ve 129.13sn) önemli derecede ($P<0.05$) yüksekti. Bununla birlikte K grubunda 2, 4 ve 6.saatler arası farklılıkta önemliydi ($P<0.05$). E ve P gruplarında da APTT’nin 0.saate göre sonraki örnekleme zamanlarında gittikçe uzadığı, E grubunda belirlenen 6.saat değerinin daha önceki tüm örnekleme zamanı değerlerine, P grubunda 6.saatte belirlenenin ise sadece 0.saatekine göre istatistiki önemde yüksek olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Söz konusu parametre açısından 0.ve 2.saatlerde gruplar arası önemli bir fark bulunmamasına rağmen 4.ve 6.saatlerde E ve P grubu değerleri, kendi aralarında yine istatistiki önemde farklılık arzetmezken, K grubununkinden önemli derecede düşük bulundu ($P<0.05$) (Tablo 1 ve Grafik 1)

Çalışmada belirlenen PT; K grubunda bütün örnekleme zamanları arasında önemli farklılık taşımaktaydı ($P<0.05$). Bununla birlikte E grubunda 0.saat ile 4. ve 6.saat, 4.saat ile 6.saat ve 2.saat ile 6.saat arası farklılıklar önemliyken P grubunda ise söz konusu parametrenin 6. saatte önemli olarak uzadığı görüldü ($P<0.05$). Söz konusu parametre 0.saatte gruplar arası önemli bir farklılık göstermemesine rağmen 2.,4. ve 6.saatlerde E ve P gruplarında K grubununkine göre önemli derecede kısalmış olarak belirlendi ($P<0.05$) (Tablo 1 ve Grafik 2).

Fibrin oluşum sürecini belirleyici özelliği olan TT, K grubunda 4.ve 6.saatlerde hem kendi aralarında hem de önceki örnekleme zamanlarına göre önemli derecede uzama gösterdi ($P<0.05$). Aynı parametrenin özellikle 6.saatte; E grubunda 0.ve 2.saate göre, P grubunda ise diğer örnekleme zamanlarına göre önemli derecede uzadığı gözlemlendi ($P<0.05$). Söz konusu parametre açısından 0.ve 2.saatlerde gruplar arasında önemli bir fark belirlenememesine rağmen 4. ve 6. saatlerde K grubu değeri diğer gruplarınkinden önemli derecede yüksekti ($P<0.05$) (Tablo 1 ve Grafik 3).

Araştırmada fibrinojen düzeyi, bütün gruplarda bir önceki örnekleme göre devamlı düşüş göstermiş olup bu düşüş; K grubunda tüm örnekleme zamanları, E grubunda 0.ile 4.ve 6., 2.ile 6.saatler, P grubunda ise 0. ve 2.saatler ile 6.saat arasında önemli bulundu ($P<0.05$).

Söz konusu parametre yönünden 0.ve 2.saatlerde gruplar arası bir farklılık gözlenmezken, 4 ve 6.saatlerde K grubu değeri E ve P gruplarından önemli düzeyde düşük belirlendi ($P<0.05$) (Tablo 1 ve Grafik 4).

Çalışmada belirlenen ortalama D-Dimer düzeyi; tüm gruplarda ve bütün örnekleme zamanlarında (2., 4.ve 6.saat) 0.saate göre sürekli yükselme eğilimindeydi. Bu artış, K grubunda özellikle 6.saatte, E ve P gruplarında ise 4.ve 6.saatlerde daha önceki örnekleme saatlerinkine göre önemli düzeydeydi ($P<0.05$). Söz konusu parametre gruplar arası farklılık yönünden 0.ve 2.saatlerde önemsizken, 4.saatte P grubu değerinin K grubunununkinden, 6.saatte ise E ve P grubu değerlerinin yine K grubunununkinden önemli derecede düşük olduğu gözlemlendi ($P<0.05$), (Tablo 1 ve Grafik 5).

Trombosit sayısı, bütün gruplarda deneme süresince sürekli azalma gösterdi. Bu azalma; K ve E grubunda tüm örnekleme zamanları, P grubunda ise 0.saat ile diğer saatler ve 2. saat ile de 6.saat arasında önemliydi ($P<0.05$). İlk örnekleme zamanında gruplar arası bir farklılık gözlenmezken, 2.saatte K grubu ile E ve P grupları, 4.ve 6.saatlerde ise tüm gruplar arasında istatistiksel farklılık belirlendi ($P<0.05$). Tüm örnekleme zamanlarında trombosit sayısındaki azalma en fazla K grubunda olmak üzere sırasıyla E ve P gruplarında gerçekleşti (Tablo 2 ve Grafik 6).

Çalışmada belirlenen mm^3 kandaki ortalama lökosit sayısının tüm gruplarda başlangıç (0.saat) değerlerine göre 2., 4.ve 6.saatlerde önemli ölçüde düşük olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Ayrıca söz konusu parametre K ve P gruplarında 6.saatte, 2.ve 4.saatlere göre istatistiksel önemde yüksek bulundu ($P<0.05$). Lökosit sayısı, 0.saatte gruplar arası farklılık göstermezken, P grubunda 2.saatte K grubunununkine, 4 ve 6.saatlerde ise K ve E gruplarına göre önemli derecede yüksek bulundu (Tablo 2 ve Grafik 7).

Araştırmada kan heterofil yüzde oranının; K grubunda, 2.örneklemede önemli olmak üzere 4.örneklemeye kadar düştüğü ve son örneklemede de başlangıç değerinden düşük olmakla birlikte önemli oranda yükseldiği belirlendi ($P<0.05$). Aynı parametrenin E grubunda da yine 2.örneklemede başlangıç değerine göre önemli düzeyde düştüğü ($P<0.05$) ve 2.saate göre, 4.saatteki yükselmenin 6.saatte önemli bir düzeye vararak başlangıç değerine ulaştığı kaydedildi. P grubunda ise söz konusu parametrenin; başlangıç değerine göre 2.saate önemli oranda düştüğü, bunu 4.saatte önemli bir yükselme izleyerek başlangıç değerine yaklaştığı ve bu yükselmeyi de 6.saatte başlangıç değerine göre de önemli bir artışın takip ettiği görüldü ($P<0.05$). Söz konusu parametrenin gruplar arası farklılık yönünden 0.saate önem arz etmediği, P grubunda 2.,4.ve 6.saatlerde K ve E gruplarına göre önemli düzeyde yüksek

olduğu görüldü. Dördüncü ve 6.saatlerde gruplar arası farklılıkların hepsi önemliydi ($P<0.05$), (Tablo 2).

Çalışmada kan lenfosit yüzde oranı K grubunda 2.örneklemede önemli yükselme göstermiş ($P<0.05$) yükselme 4.saate kadar devam etmiş, 6.saatte önemli düzeyde düşmekle birlikte 0.saat değerine göre önemli oranda yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Söz konusu parametre açısından E grubunda 2.saatte belirlenen önemli düzeydeki yükseliş daha sonraki örnekleme zamanlarında yerini düşüşe bırakmakla birlikte 0.saat değerine göre önemli oranda yüksek olarak belirlendi. Bununla birlikte bu düşüş 4.saatte önemsiz, 6.saatte ise anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Aynı parametrenin P grubunda 2.saatte yükseldiği 4.ve 6.saatlerde ise azalarak 6.saatte en düşük değerde olduğu gözlendi ($P<0.05$). Lenfosit yüzde oranları açısından, 2. saatte K ve P grupları, 4.ve 6.saatlerde ise gruplar arası farklılıkların tümü anlamlıydı ($P<0.05$), (Tablo 2).

Monosit yüzde oranları örnekleme zamanlarına göre K ve E gruplarında önemli bir farklılık göstermezken, P grubunda 2.örneklemede önemli düzeyde düşmüş ($P<0.05$) ve sözkonusu düşüş sonraki örnekleme zamanlarında da devam etmiştir. Deneme grupları arasında monosit yüzdesi P grubunda 2.saatte E grubununkine, 4.saatte her iki grubununkine, 6.saatte ise K grubununkine göre düşük bulunmuştur ($P<0.05$)(Tablo 2).

Araştırmada Eozinofil yüzde oranları, K ve P gruplarında ilk örnekleme zamanına göre 2., 4.ve 6.saatlerde düşerken ($P<0.05$), E grubunda gözlenen düşme sadece 6.saatte önemliydi ($P<0.05$). Söz konusu parametre açısından gruplar arası farklılık anlamlı değildi (Tablo 2).

Çalışmada bazofil yüzde değerleri yönünden sadece P grubunda 0.saate göre daha sonraki örnekleme saatlerinde önemli düzeyde düşme ($P<0.05$) belirlenirken, gerek diğer gruplarda örnekleme zamanları arasında gerekse aynı saatlerde gruplar arası bir farklılık gözlenmedi. Bununla birlikte tüm gruplarda en yüksek bazofil yüzde oranı 0.saat, en düşük oran ise 6. saatte görüldü (Tablo 2).

Tablo 1: Endotoksin (K) , Vitamin E + Endotoksin (E) ve Prednisolon + Endotoksin (P) gruplarında belirlenen hemostatik parametreler ($n=10$, $\bar{x} \pm SEM$)

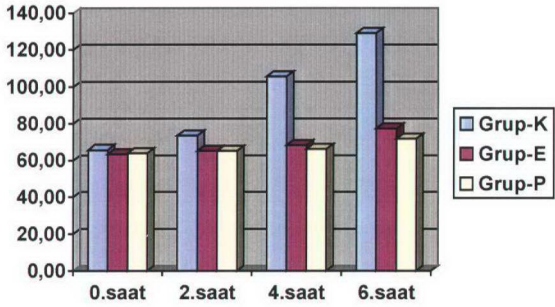
PARAMETRELER	GRUPLAR	ÖRNEKLEME ZAMANI (saat)			
		0	2	4	6
APTT (Saniye)	K	65,71 \pm 2,22 c	73,39 \pm 3,56 c	105,67 \pm 3,62 b A	129,13 \pm 3,95 a A
	E	63,49 \pm 3,56 b	65,10 \pm 2,51 b	68,35 \pm 2,12 b B	77,43 \pm 2,05 a B
	P	64,01 \pm 2,27 b	65,07 \pm 2,28 ab	66,24 \pm 1,55 ab B	71,94 \pm 1,85 a B
PT (Saniye)	K	13,45 \pm 0,34 d	15,53 \pm 0,38 c A	20,50 \pm 0,48 b A	27,27 \pm 0,50 a A
	E	12,91 \pm 0,50 c	13,85 \pm 0,48 bc B	15,24 \pm 0,43 b B	17,10 \pm 0,48 a B
	P	13,88 \pm 0,39 b	13,31 \pm 0,43 b B	14,85 \pm 0,45 b B	16,34 \pm 0,43 a B
TT (Saniye)	K	15,79 \pm 0,43 c	16,64 \pm 0,47 c	19,80 \pm 0,51 b A	23,75 \pm 1,52 a A
	E	15,44 \pm 0,25 b	15,74 \pm 0,54 b	16,58 \pm 0,60 ab B	18,25 \pm 0,55 a B
	P	15,06 \pm 0,37 b	15,25 \pm 0,38 b	15,92 \pm 0,69 b B	17,10 \pm 0,62 a B
FİBRİNOJEN (g/l)	K	2,92 \pm 0,10 a	2,48 \pm 0,11 b	1,88 \pm 0,06 c B	1,40 \pm 0,05 d B
	E	2,71 \pm 0,14 a	2,64 \pm 0,15 ab	2,20 \pm 0,11 bc A	1,97 \pm 0,11 c A
	P	2,67 \pm 0,10 a	2,60 \pm 0,08 a	2,43 \pm 0,07 ab A	2,19 \pm 0,05 b A
D-DİMER (μ g/ml)	K	0,18 \pm 0,01 c	0,21 \pm 0,02 c	0,47 \pm 0,03 b A	0,78 \pm 0,05 a A
	E	0,20 \pm 0,02 b	0,24 \pm 0,03 b	0,39 \pm 0,04 a AB	0,48 \pm 0,05 a B
	P	0,18 \pm 0,01 b	0,21 \pm 0,01 b	0,30 \pm 0,02 a B	0,37 \pm 0,03 a B

a, b, c, d ; aynı satırda değişik harf taşıyan saatler arası farklılık önemli ($P<0.05$).
 AB; aynı sütünde aynı parametreye ait değişik harf taşıyan gruplar arası farklılık önemli ($P<0.05$).

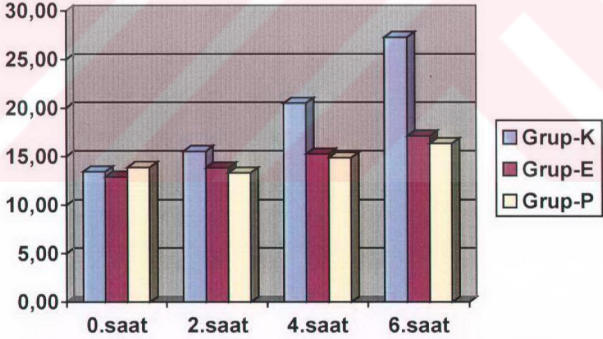
Tablo 2: Endotoksin (K), Vitamin E + Endotoksin (E) ve Prednisolon + Endotoksin (P) gruplarında belirlenen hematolojik parametreler (n=10, x±SEM)

PARAMETRELER	GRUPLAR	ÖRNEKLEME ZAMANI (saat)					
		0	2	4	6		
TROMBOSİT ($\times 10^9 / L$)	K	483±15 a	256±14 b B	164±8	c C	112±5	d C
	E	472±18 a	365±18 b A	311±12	c B	259±12	d B
	P	494±13 a	380±15 b A	356±15	bc A	307±18	c A
LÖKOSİT ($\times 10^3 / mm^3$)	K	5,95±0,36 a	1,43±0,27 c B	1,36±0,16	c C	2,60±0,32	b B
	E	6,68±0,80 a	1,75±0,19 b AB	2,10±0,27	b B	3,35±0,36	b B
	P	6,30±0,38 a	2,45±0,28 c A	3,02±0,20	c A	4,95±0,59	b A
A K Y U V	K	32,10±1,68 a	7,50±1,04 c B	6,20±1,31	c C	18,50±2,34	b C
	E	37,10±2,51 a	10,50±1,26 b B	17,10±2,13	b B	29,30±3,39	a B
	P	35,40±2,32 b	16,70±2,09 c A	30,40±2,31	b A	52,80±2,71	a A
A R	K	61,60±1,94 c	88,90±1,29 a A	90,40±1,24	a A	78,00±2,41	b A
	E	57,70±2,37 c	85,60±1,38 a AB	79,20±2,12	a B	67,90±3,44	b B
	P	58,90±2,57 c	80,70±2,06 a B	67,70±2,23	b C	45,90±2,65	d C
F O R M Ü L Ü	K	3,40±0,65	1,80±0,33 AB	2,10±0,28	A	2,50±0,37	A
	E	2,80±0,42	2,30±0,34 A	2,20±0,29	A	1,70±0,26	AB
	P	3,10±0,46 a	1,30±0,15 b B	1,10±0,01b	B	0,80±0,25	b B
E o z i n o f i l	K	1,80±0,29 a	0,90±0,23 b	0,70±0,21	b	0,60±0,22	b
	E	1,50±0,17 a	1,00±0,21 ab	0,90±0,23	ab	0,70±0,15	b
	P	1,60±0,22 a	0,90±0,18 b	0,50±0,17	b	0,40±0,16	b
B a z o f i l	K	1,10±0,28	0,90±0,18	0,60±0,22		0,40±0,16	
	E	0,90±0,23	0,60±0,16	0,60±0,22		0,40±0,16	
	P	1,00±0,21 a	0,40±0,16 b	0,30±0,15	b	0,10±0,01	b

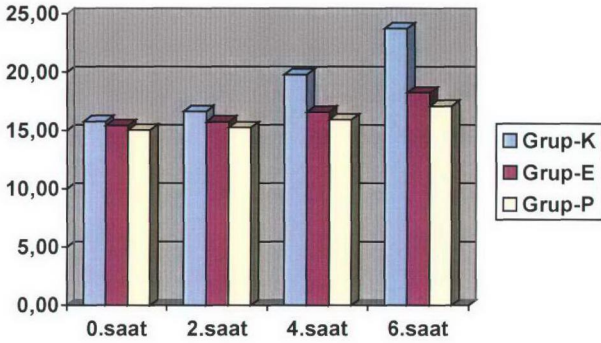
a, b, c, d ; aynı satırda değişik harf taşıyan saatler arası farklılık önemli (P<0,05).
A, B, C; aynı sütünde aynı parametreye ait değişik harf taşıyan gruplar arası farklılık önemli (P<0,05).



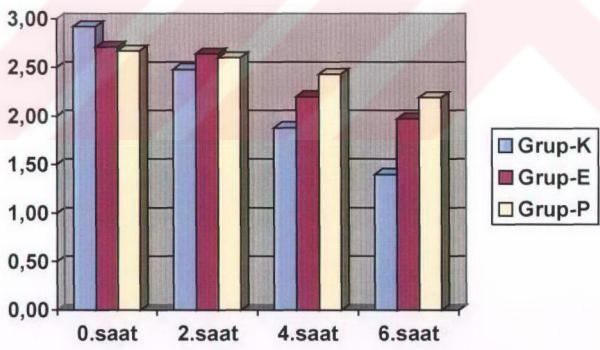
Grafik 1. Araştırma gruplarına ait plazma APTT değerleri (saniye)



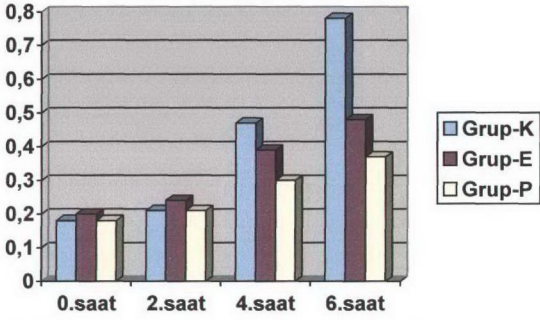
Grafik 2. Araştırma gruplarına ait plazma PT değerleri (saniye)



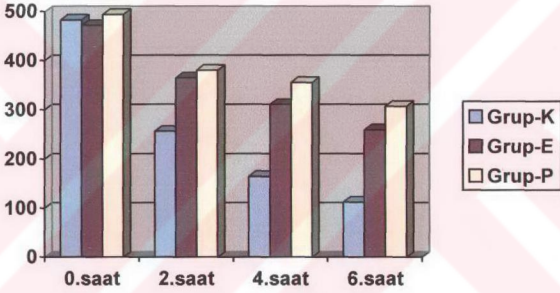
Grafik 3. Araştırma gruplarına ait plazma TT değerleri (saniye)



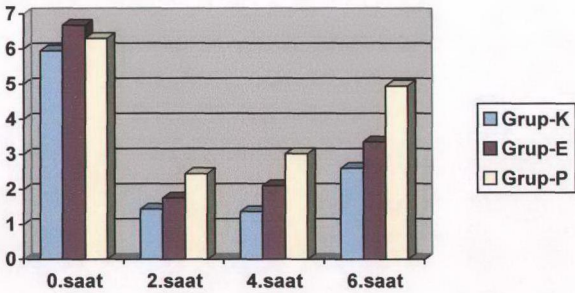
Grafik 4. Araştırma gruplarına ait plazma Fibrinojen değerleri (g/L)



Grafik 5. Araştırma gruplarına ait plazma D-Dimer değerleri (µg/ml)



Grafik 6. Araştırma gruplarına ait kan trombosit sayıları (X10⁹/L)



Grafik 7. Araştırma gruplarına ait kan lökosit sayıları (x10³/mm³)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tavşanlarda endotoksin uygulaması ile oluşturulan DIC üzerine vitamin E ve prednisolon'un etkilerinin araştırılmasının amaçlandığı çalışmada, tüm grupları oluşturan hayvanlarda 100µg/kg/saat dozunda E.coli lipopolisakkaridinin (O111:B4 serotipi) intravenöz 6 saat sürekli infüzyonuyla deneysel endotoksemi gerçekleştirildi (Warr ve ark 1990, Munoz ve ark 1999, Hermida ve ark 1999, Montes ve ark 2000). Plazma Vitamin E (dl- α -tokoferol asetat) düzeyinin sürekliliğini sağlamak amacıyla verilmesi gereken miktarının tavşan, rat, fare gibi birçok laboratuvar hayvanında 10-50 mg/kg dolayında olması gerektiği yolundaki bildirimler (Yoshikawa ve ark 1982, Marques ve ark 1987, Broner ve ark 1989, Sugimoto ve ark 1991) dikkate alınarak; araştırmanın E vitamini verilen grubunu oluşturan tavşanlara endotoksin infüzyonundan önceki 4 gün 10 mg/kg dozunda vitamin E intraperitoneal olarak enjekte edildi. Prednisolon uygulanan hayvanlarda ise 10mg/kg dozda subkutan prednisolon uygulamasının deneysel endotoksemide etkili olduğu ve hemostatik parametreler ile plazma sitokin düzeyleri üzerine etkili olduğu bildiriminden (Yamazaki ve ark 1999) hareketle, prednisolon enjeksiyonu endotoksin uygulamasından 30 dakika önce aynı doz ve yolla yapıldı.

Laboratuvar hayvanları üzerinde DIC oluşumunun patogenezisini inceleyen literatürlerin ışığında (Warr ve ark 1990, Munoz ve ark 1999, Yamazaki ve ark 1999, Hermida ve ark 1999, Montes ve ark 2000), çalışmada deneysel model olarak tavşan seçildi. Endotoksin ile oluşturulan DIC modelinin gram negatif sepsisli hastalarda gelişen tipik septomları sergilemesi ve DIC oluşumu ile endotoksinin özdeşleştirilmesi (Scherer ve ark 1995, Warr ve ark 1990), çalışmada yararlanılan modelde koagülasyon aktivatörü olarak endotoksinin tercih edilme sebebini oluşturdu.

Bütün deneysel modellerde, endotoksinin lokal yada sistemik olarak özellikle TNF ve IL gibi sitokinleri aktive etmesi sonucu etkinleşen doku faktörü/FVIIa yolu ile koagülasyon aktive edilmektedir. Bu süreçte, endotoksin infüzyonundan sonraki 3-5.saatlerde oluşan trombin; endotokseminin en önemli komplikasyonlarından biri olan DIC'in şekillenmesine yol açmaktadır (Van Devender ve ark 1990, Levi ve ark 1999). Bu nedenle çalışmada, endotoksin infüzyonunu izleyen 6.saat son örnekleme zamanı olarak değerlendirildi.

Araştırmada DIC'in diyagnozunda sıkça kullanılan (Bick 1994, Rocha ve ark 1998, Levi ve ark 1999) aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT), protrombin zamanı (PT), trombin zamanı (TT), fibrinojen konsantrasyonu, D-dimer düzeyi ile platelet sayısı, lökosit sayısı ve akyuvar formülü belirlendi.

Araştırmada belirlenen APTT, PT ve TT düzeylerinin referans sınırları kullanılan metoda veya test kitlerine göre farklılık arzettiğinden (Gentry ve Cooper 1979, Turgut 1995) değerlendirmede referans olarak her bir grubun 0.saatleri de dikkate alındı.

Çalışmada Kontrol grubu hayvanlarda endojen pıhtılaşma sistemini kontrol eden APTT 0.saatte 65.71 saniye olarak belirlenmiş olup bu değer çeşitli araştırmacılar tarafından tavşanlar için belirtilen bazal değere uygunluk göstermekteydi (Kouz ve ark 1996, Martin ve ark 1999). Söz konusu parametrenin aynı grupta (K) endotoksin infüzyonunu izleyen 2.saatte (73.39 saniye) istatistiksel önem olmaksızın, 4.ve 6.saatlerde önemli derecede uzadığı (sırasıyla; 105.67 ve 129.13 saniye) gözlemlendi ($P<0.05$). Aynı değer vitamin E ve Prednisolon verilen hayvanlarda da 0.saate göre sonraki örnekleme zamanlarında gittikçe arttığı, bu artışın son örneklemede ise önemli olduğu görüldü ($P<0.05$) APTT değeri tüm gruplarda 0.ve 2.saatlerde gruplar arası fark olmaksızın, 4.ve 6.saatlerde vitamin E ve Prednisolon gruplarında Kontrol grubununkinden düşüktü ($P<0.05$) (Tablo 1 ve Grafik 1). Araştırmada Kontrol grubu hayvanlarda belirlenen uzamış APTT, endotoksin ile oluşturulan DIC'in seyrinde endojen pıhtılaşma sisteminin olumsuz etkilendiğinin göstergesi sayılabilir. Kontrol grubunda 0.saatte saptanan APTT değeri; Kouz ve ark (1996)'nın tavşanlara doku faktörü vererek oluşturdukları DIC modelindeki bazal değere (65 saniye) uygunluk gösterirken, araştırmada 6.saatte 129.13 saniye olarak bulunan APTT değeri aynı araştırmacıların 7.saatte elde ettikleri 200 saniyelik değerden daha düşüktü. Bunun muhtemel sebebi, araştırmacıların (Kouz ve ark 1996) deneysel DIC'i doku faktörü ile oluşturmaları ve APTT ölçümünü 7.saatte yapmalarına bağlanabilir. Yine İzutani ve ark (2000)'nın E.coli lipopolisakkaridinin (0127:B8) ratlara 1 saat boyunca infüzyonuyla (50 mg/kg) oluşturdukları modelde, APTT; kontrol grubunda 35.4 saniye iken deneme grubunda toksin infüzyonunu izleyen 2.saatte 137.5 saniye olarak belirlenmiştir. Ayrıca tavşan (Katsuura ve ark 1994, Scherer ve ark 1995), rat (Ito ve ark 1990, Kawamura ve ark 1993, Gonda ve ark 1993, Fujita ve ark 2000) ve insanlarda (Okugawa ve ark 2000, Asakura ve ark 2001c) konuyla ilgili çalışma yapan diğer araştırmacıların deneysel veya klinik DIC modellerinde bildirdikleri APTT'deki önemli düzeyde uzama, araştırma bulgularıyla uyum içindedir. Çalışmada endotoksin infüzyonu öncesi prednisolon veya E vitamini uygulamasının APTT'nin uzamasını önemli derecede ($P<0.05$) inhibe ettiği görüldü (Tablo 1 ve Grafik 1). Bu bulgu, Yoshikawa ve ark (1982)'nin vitamin E uygulaması yaptıkları ratlara E.coli endotoksininin (055:B5) 4 saat sürekli infüzyonuyla oluşturdukları DIC modelindeki PTT (parsiyel tromboplastin zamanı)'de gözledikleri değişime benzerlik göstermektedir.

Çalışmada, eksojen pıhtılaşma sisteminde rol oynayan faktörlerin aktivitelerindeki değişikliklerin saptanması amacıyla ölçülen PT değeri; Kontrol grubunda örnekleme 0. saatinde 13.45 saniye olarak belirlenmiş olup bu değer Kouz ve ark (1996)'nın tavşanlar için belirtmiş oldukları fizyolojik değere (13 saniye) benzerlik göstermekteydi. Aynı grupta (K) söz konusu parametreye ait sürede tüm örnekleme zamanlarında bir öncekine göre önemli düzeyde artış görüldü ($P<0.05$). Vitamin E ve prednisolon verilen hayvanlarda ise PT de ilk örnekleme zamanlarından itibaren sürekli bir artış olurken, bu uzama sadece son örneklemede (6. saat) önemliydi ($P<0.05$). Söz konusu parametre açısından 0. saatte gruplar arası bir farklılık gözlenmezken daha sonraki örnekleme zamanlarında (2., 4. ve 6. saatler) kontrol grubu grubu değerlerinin vitamin E ve prednisolon gruplarına göre önemli ölçüde yüksek olduğu görüldü ($P<0.05$) (Tablo 1, Grafik 2). Araştırmada kontrol grubunda son örneklemede (6. saat) belirlenen PT değeri, Kouz ve ark (1996)'nın doku faktörü infüzyonunun 7. saatinde belirttikleri PT değerinden hafif düşük bulundu. Yamazaki ve ark (1999)'nın E. coli endotoksinini (055:B5) 30 mg/kg dozunda 4 saat boyunca infüze ederek ratlarda oluşturdukları deneysel DIC modelinde aynı parametre örnekleme 0. saatinde 12.3 saniye iken sonuncu örneklemede (4. saat) 46.1 saniye olarak rapor edilmektedir. Yine, Han ve ark (1999)'nın E. coli endotoksinini (0111:B4) 250µg dozunda uygulayarak farelerde oluşturdukları deneysel DIC modelinde, PT değeri infüzyonun 10. dakikasında kontrol grubunda 18 saniye iken, endotoksin verilen grupta 35 saniye olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde İzutani ve ark (2000)'nin ratlarda gerçekleştirdikleri çalışmada; PT, kontrol grubu hayvanlarda 12.6 saniye iken toksin infüzyonunun 2. saatinde 32.3 saniye olarak belirtilmektedir. Asakura ve ark (2001a, 2001b) ratlara E.coli endotoksininin (055:B5) 4 saat sürekli infüzyonu (30mg/kg) sonucu oluşturdukları DIC modelinde, çalışmaların 0. saatinde 12.7-13.0 saniye olarak kaydettikleri PT değerlerinin 4. saatte (son derece düşük fibrinojen seviyesinden dolayı) ölçülemeyecek kadar uzamış olduğunu kaydetmektedirler. Benzer şekilde tavşan ve ratlarda oluşturulan deneysel DIC'de PT değerinin patolojik olarak uzadığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Ito ve ark 1990, Yoshikawa ve ark 1990, Gonda ve ark 1993, Kawamura ve ark 1993, Scherer ve ark 1995, Fujita ve ark 2000). Birçok deneysel DIC modelinde PT'nin uzaması bulgusu, çalışma sonuçlarıyla aynı olup eksojen pıhtılaşma yolunun deneysel DIC'den etkilenmiş olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada endotoksin infüzyonu öncesi uygulanan vitamin E ve prednisolonun, PT'deki uzamayı önemli düzeyde baskıladığı gözlemlendi (Tablo 1). P grubunda elde edilen bulgular, Yamazaki ve ark (1999)'nın E.coli endotoksinini (055:B5) 30mg/kg dozunda 4 saat sürekli olarak infüze ederek ratlarda geliştirdikleri DIC modelinde elde ettikleri sonuçlarla (infüzyon

sonunda; kontrol grubunda 12.3 saniye, endotoksin grubunda 46.1 saniye ve prednisolon grubunda 15.1 saniye) paralellik arz etmektedir. Vitamin E uygulanan tavşanlarda elde edilen bulgu ise Yoshikawa ve ark (1982)'nin oluşturdukları DIC modelinde belirttikleri PT'de meydana gelen değişimlere (0. saatte 12.1 saniye, 4 saatlik infüzyonun sonunda ise; endotoksin grubunda 22.5 saniye ve Vit E grubunda 15.1 saniye) uygunluk göstermektedir. Antioksidan karakteri nedeniyle vitamin E serbest radikallerle reaksiyona girerek istenmeyen oksidasyonların önlenmesi ya da azaltılmasında etkili olmaktadır. Böylece endotelial trombomodulin inaktivasyonu ve hücrel hasarın önüne geçilebilmektedir (Broner ve ark 1989, Okajima 1999). Ayrıca vitamin E'nin platelet agregasyonunu inhibe etme özelliği ve antitrombotik fonksiyonu bulunmaktadır (Yoshikawa ve ark 1982, Yoshikawa ve ark 1984). Çalışmada Vitamin E'nin söz konusu parametre üzerine olumlu etkileri; bahsedilen mekanizmalar çerçevesinde gerçekleşen faydalı rollerine bağlanabilir. Glukokortikoidler; endotoksin, kompleman ve immün komplekslerce salınan prokoagülan doku faktörü oluşumunu inhibe edebilmekte (Putterman 1989), granülosit agregasyonunu baskılamakta, nötrofillerin endotelial yüzeye yapışma eğilimini azaltmakta, endoteliumu serbest radikallerin zararından korumakta ve kompleman aktivasyonunu engelleyebilmektedir (Skubitz ve ark 1981, Latour 1983). Ayrıca söz konusu madde endotoksinle indüklenen DIC'in patogenezisinde başlıca rol alan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi yangısal sitokinlerin salınımını önemli düzeyde baskılayabilmektedir (Yamazaki ve ark 1999). Çalışmada prednisolon uygulamasının PT üzerine baskılayıcı etkisi ise bahsedilen maddenin bu olumlu rollerine bağlandı.

Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda belirlenen değerlerdeki farklılıklar ise; kullanılan metot, yararlanılan hayvanın türü, oluşturulan deneysel DIC modeli (örneğin doku faktörü modeli, endotoksemi, septisemi), uygulanan endotoksinin tipi ve dozajı gibi farklılıklardan kaynaklanabilmektedir (Redl ve ark 1993, Turgut 1995).

Çalışmada, fibrinojenin fibrin monomerlerine dönüşüm derecesinde belirleyici olan TT değeri, Kontrol grubunda örnekleme 0. saatinde 15.79 saniye olarak ölçüldü. Bu değer çeşitli araştırmacılar tarafından (Keskin ve ark 1998, Oubina ve ark 2002) tavşanlarda bildirilen fizyolojik değere uygunluk göstermekteydi. Söz konusu parametre aynı grupta (K) örnekleme 2. saatinde istatistiksel olarak anlamsız, 4. ve 6. örnekleme 4. ve 6. saatlerde ise önemli düzeyde ($P < 0.05$) uzama gösterdi (Tablo 1). Vitamin E ve prednisolon enjekte edilen hayvanlarda da gözlenen uzama özellikle son örneklemede (6. saat) istatistiksel önem taşımaktaydı ($P < 0.05$) (Tablo 1). TT'nin 0. ve 2. saatlerde gruplar arası herhangi bir farklılık göstermediği, 4. ve 6. saatlerde ise K grubunun kine göre diğer deneme gruplarında (E ve P)

önemli düzeyde düşük olduğu gözlemlendi ($P<0,05$) (Tablo 1). Sonuç olarak prednisolon ve vitamin E'nin TT üzerinde önemli düzeyde baskılayıcı etkisi görüldü. Bu etki; vitamin E'nin antioksidan, platelet agregasyonunu inhibe etme ve antitrombotik özelliğine bağlanırken prednisolonun ise prokoagulan doku faktörü oluşumunu inhibe edebilme, granülosit agregasyonunu baskılama, nötrofillerin endotelial yüzeye yapışma eğilimini azaltma, endoteliumu serbest radikallerin zararından koruma, kompleman aktivasyonunu engelleyebilme ve birçok yangısal sitokinlerin salınımını önemli düzeyde baskılayabilme gibi DIC ve endotoksemi üzerine olan önemli etkilerine bağlandı. Söz konusu parametrenin; tavşan, kedi ve köpek gibi hayvanlarda konuyla ilgili yapılan diğer araştırmalarda (Scherer ve ark 1995, Deniz 1999) da uzama göstermesi çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir. Kontrol grubunda araştırmanın 6.saatinde ölçülen TT değerinin Kouz ve ark (1996)'nın belirttikleri değerden (29 saniye) biraz düşük olduğu gözlemlendi. Bunun muhtemel sebebi araştırmacıların deneysel DIC'i doku faktörüyle oluşturmaları ve örnekleme zamanlarının 7.saatte yapılması olabilir. TT'nin uzamasının nedeni; plazma fibrin yıkım ürünlerinin, fibrinojenin fibrine dönüşümünü engellemesine ve plazma fibrinojen konsantrasyonunun normalden düşük olmasına bağlanmaktadır (Bick 1994, Rocha ve ark 1998, Deniz 1999).

Çalışmadaki gibi şiddetli DIC gelişen bir canlıda, APTT, PT ve TT gibi trombin oluşum kapasitesini ölçen global koagülasyon test (Screening testler) sonuçları patolojik olarak uzamaktadır. Bunun başlıca sebebi fibrinojen ile aktifleşen bazı koagülasyon faktörlerinin (FII, V, VII, IX ve X) kullanılması, plazma parçalanması ve fibrin yıkım ürünleri tarafından yapımlarının inhibe edilmesidir. Bunun yanında hafif seyirli DIC olgularında nadiren bu değerler örnekleme zamanlarına bağlı olarak değişmemekte veya kısalabilmektedir (Bick 1994, Rocha ve ark 1998).

DIC olgularında rutin diğer parametrelerle birlikte (PT, trombosit sayısı vs.) plazma fibrinojen konsantrasyonunun da ölçülmesi gerektiği bildirilmektedir (Levi ve ark 1999). Bununla birlikte fibrinojen bir akut faz proteini olduğu için koagülasyonun şiddetli aktivasyonu durumları hariç düzeyi normal sınırlarda kalabilmekte hatta enflamasyon ile seyreden hastalıklarda plazmadaki miktarı artmaktadır. DIC'in şiddetli seyrettiği klinik ve deneysel çalışmalarda hipofibrinojenemi bulgusunun diyagnostik yönden tamamlayıcı ve yararlı olduğu kaydedilmektedir (Levi ve ark 1999, Deniz 1999).

Çalışmada kontrol (K) grubunda 0.saatte belirlenen fibrinojen miktarının (2.92 g/L) bir çok araştırmacının (Paloma ve ark 1992, Scherer ve ark 1995, Kouz ve ark 1996, Munoz ve ark 1999, Hermida ve ark 1999, Montes ve ark 2000,) tavşanlar için bildirdikleri fizyolojik sınırlar (2.2-3.38 g/L) içerisinde olduğu gözlemlendi. Araştırmada kontrol grubunda fibrinojen

konsantrasyonu 0.saat sonrası tüm örnekleme zamanlarında kademeli olarak düştü ($P<0.05$). Söz konusu parametre vitamin E ve prednisolon uygulanan tavşan gruplarında ilk örnekleme göre (0.saat) son örneklemede (6.saat) önemli bir düşüş ($P<0.05$) göstermesine karşın gerek vitamin E'nin gerekse prednisolon'un kontrol grubununkine göre 4.ve 6.saatlerde fibrinojen seviyesindeki düşüşü önemli oranda baskıladığı görüldü ($P<0.05$) (Tablo 1). Montes ve ark (2000) geliştirdikleri DIC modelinde, fibrinojen bazal düzeyini 3.34 g/L, endotoksin uygulaması sonrası 2., 4. ve 6.saatlerde sırasıyla; 3.09, 2.72, 2.39 g/L olarak belirtmektedirler. Munoz ve ark (1999) ise 0., 2. ve 6.saatlerdeki fibrinojen miktarını sırasıyla; 2.78, 2.48 ve 1.58 g/L olarak bildirmekte ve önemli düşüşe dikkat çekmektedirler. Paloma ve ark (1992)'nin oluşturdukları tavşan modelinde de bazal, 2. ve 6.saatlerdeki fibrinojen miktarı sırasıyla; 2.67, 1.93 ve 1.46 g/L olarak rapor edilmektedir. Hermida ve ark (1999)'nin tavşanlarda yaptıkları denemede de, araştırmanın 2.ve 6.saatlerindeki fibrinojen miktarı sırasıyla; başlangıç değerinin % 95.5'i ve %58.2'si olarak belirtilmektedir. Yamazaki ve ark (1999), ratlarda kontrol grubunda fibrinojen konsantrasyonunu 2.93 g/L, LPS infüzyonunun 4.saatinde ise 0.34 g/L gibi çok düşük bir düzeyde belirlemişlerdir. Yine Fujita ve ark (2000)'nin endotoksinle oluşturdukları rat modelinde (E.coli 0127:B8 LPS, 50 mg/kg) örnekleminin 0., 2.ve 3.saatlerinde fibrinojen konsantrasyonu sırasıyla; %100, %79.2 ve %38.5 olarak belirtilmektedir. Ayrıca tavşan (Triantaphyllopoulos 1984, Hara ve ark 1987, Warr ve ark 1990, Katsuura ve ark 1994, Scherer ve ark 1995, Kouz ve ark 1996), rat (Ito ve ark 1990, Yoshikawa ve ark 1990, Kawamura ve ark 1993, Gonda ve ark 1993, Izutani ve ark 2000, Asakura ve ark 2001 a, b), fare (Han ve ark 1999), domuz (Vasquez ve ark 1998) ve insanlarda (Shimura ve ark 1997, Okugawa ve ark 2000, Asakura ve ark 2001 c, d, e) deneysel ve klinik DIC gelişiminde fibrinojen miktarının önemli oranda düştüğü bildirilmektedir. Çalışma bulguları söz konusu araştırma sonuçlarının tamamını destekler niteliktedir.

Çalışmada Vitamin E'nin fibrinojen düzeyindeki düşüşü K grubununkine göre baskıladığı gözlemlendi (Tablo 1). Elde edilen değerler Yoshikawa ve ark (1982)'nin fibrinojen düzeyinde meydana gelen değişimlere ilişkin belirttikleri bulgularla (0.saat; 1.27 g/L, 4 saatlik infüzyon sonrası; endotoksin grubunda <0.2 g/L, vitamin E grubunda 0.37 g/L) paraleldir. Vitamin E'nin fibrinojen düzeyi üzerindeki bu etkisi, söz konusu maddenin DIC ve endotoksemide uygulanmasının faydalı olacağı sonucuna varılmasına neden oldu. Benzer şekilde prednisolonun da DIC'de şekillenen fibrinojen miktarındaki düşüşü azalttığı görüldü (Tablo 1). Bu bulgu, Yamazaki ve ark (1999)'nin elde ettikleri çalışma sonuçlarına (4 saatlik infüzyon sonrası; kontrol grubunda 2.93 g/L, endotoksin grubunda 0.34 g/L, prednisolon

grubunda 1.94 g/L) ve söz konusu maddenin DIC ve endotoksemide yararlı olduğu şeklindeki bildirimlere (Osterud ve ark 1989, Semrad 1993, Han ve ark 1999) uygunluk göstermektedir (Tablo 1).

D-dimer testi DIC'li hastalarda diyagnostik amaçla yaygın olarak kullanılan en güvenilir testler arasında yer almaktadır (Bick 1994, Carey ve Rodgers 1998). D-dimer düzeyinin intravasküler fibrin yıkımının önemli bir göstergesi olduğu belirtilmektedir (Müller-Berghaust ve ark 1999). Çalışmada belirlenen ortalama D-dimer düzeyi; tüm gruplarda ve bütün örnekleme zamanlarında (2., 4.ve 6.saat) 0.saate göre sürekli yükselme eğilimindeydi. Bu artış, kontrol grubu tavşanlarda özellikle 6.saatte, vitamin E ve prednisolon grupları tavşanlarında ise 4.ve 6.saatlerde daha önceki örnekleme saatlerinkine göre önemliydi ($P<0.05$). Söz konusu parametre gruplar arası farklılık yönünden 0.ve 2.saatlerde önem arzetmezken, 4.saatte P grubu değerinin K grubununkinden, 6.saatte ise E ve P grubu değerlerinin yine K grubununkinden önemli oranda düşük olduğu gözlemlendi ($P<0.05$), (Tablo 1 ve Grafik 5). Konuyla ilgili çalışmalar incelendiğinde (Scherer ve ark 1995, Yamazaki ve ark 1999, Garcia-Fernandez ve ark 2000, Asakura ve ark 2001a) DIC gelişen hastalarda D-dimer düzeyinin önemli derecede yükseldiği görülmektedir. Nitekim; Yamazaki ve ark (1999) kontrol grubu ratlarda plazma D-dimer düzeyinin $0.23\mu\text{g/ml}$ olduğunu, endotoksin infüzyonunun 4.saatinde ise $1.08\mu\text{g/ml}$ 'ye yükseldiğini kaydetmektedirler. Asakura ve ark (2001a, b) ratlarda yaptıkları çalışmalarda endotoksin infüzyonu öncesi D-dimer düzeyini $0.18 - 0.19\mu\text{g/ml}$, infüzyon sonrası 4.saate ise $1.2 - 1.3\mu\text{g/ml}$ olarak bildirmektedirler. Yine Asakura ve ark (2001c) DIC gelişen septik hastalarda yaptıkları çalışmada, D-dimer düzeyini $10.4\mu\text{g/ml}$ (insanlar için normal değer; $<5.0\mu\text{g/ml}$) olarak belirtmektedirler. Garcia Fernandez ve ark (2000) kontrol grubu hastalarda $0.13\mu\text{g/ml}$ olarak buldukları D-dimer düzeyini infeksiyöz SIRS olgularında $2.4\mu\text{g/ml}$ olarak kaydetmektedirler. Okugawa ve ark (2000) ise sağlıklı insanlarda $0.28\mu\text{g/ml}$ olarak buldukları D-dimer düzeyini DIC'li hastalarda $21.5\mu\text{g/ml}$ olarak bildirmektedirler. Scherer ve ark (1995) da tavşanlarda LPS (E.coli K-235) uygulayarak oluşturdukları DIC modelinde araştırmanın başlangıcında $0.05\mu\text{g/ml}$ olarak ölçtükleri D-dimer düzeyini uygulamadan sonraki 4.saatte $1.65\mu\text{g/ml}$ olarak kaydetmişlerdir. Çalışmada belirlenen; endotoksin infüzyonunun D-dimer düzeyinde artışa yol açması bulgusu, söz konusu araştırma sonuçlarıyla uyum göstermesine karşın, elde edilen değerler biraz düşüktü. Çalışmada endotoksin infüzyonu öncesi uygulanan vitamin E ve prednisolonun, plazma D-dimer düzeyindeki artışı önemli düzeyde baskıladığı gözlemlendi (Tablo 1). Prednisolon uygulanan grupta elde edilen bulgular Yamazaki ve ark (1999)'nın E.coli endotoksinini (055:B5, 30mg/kg) ratlara 4 saat sürekli olarak infüze ederek

geliştirdikleri DIC modelinde elde ettikleri bulgularla (infüzyon sonunda; endotoksin grubunda 1.08µg/ml ve prednisolon grubunda 0.32µg/ml) uyumludur. Çalışmada E vitamini grubunda kontrol grubundakine göre D-dimer düzeyinde belirlenen baskılanma, Yoshikawa ve ark (1982)'nin kontrol grubuna göre (4 saatlik infüzyonun sonunda ise; endotoksin grubunda 56.24 µg/ml) Vitamin E grubunda fibrin yıkım ürünleri (FDP) düzeyinde belirledikleri değişimle (5.1 2.4µg/ml) uyum göstermektedir. Söz konusu parametreye ilişkin çalışma sonuçları prednisolon ve Vitamin E'nin DIC ve endotoksemide daha önce bahsedilen mekanizma çerçevesinde gerçekleşen olumlu etkilerine bağlanabilir.

Çalışmada kontrol (K) grubunda 0.saatte kaydedilen ortalama trombosit sayısının (483×10^9 /L) bir çok araştırmacının (Warr ve ark 1990, Munoz ve ark 1999, Hermida ve ark 1999, Montes ve ark 2000) tavşanlar için bildirdiği fizyolojik sınırlar ($454-600 \times 10^9$ /L) içerisinde olduğu belirlendi. Bu grupta (K), endotoksin infüzyonu sonrası gözlenen trombosit sayısındaki sürekli azalma örnekleme zamanları arasında önemli düzeyde farklıydı ($P<0.05$). Söz konusu parametre E vitamini ve prednisolon uygulanan hayvanlarda da ilk örneklemeden son örnelemeye kadar düşme eğilimindeydi. Trombosit sayısındaki bu düşüş E vitamini uygulanan tavşanlarda tüm örnekleme zamanları; prednisolon uygulanan tavşanlarda ise 0.saat ile diğer saatler, 2.ve 4.saatler ile de 6.saat arasında önemli bulundu ($P<0.05$). Ortalama trombosit sayısı 0.saat dışında E ve P gruplarında K grubunununkinden yüksek olup farklılık önemliydi ($P<0.05$) (Tablo 2, Grafik 6). Endotoksin infüzyonu öncesine göre (0.saat) son örneklemede (6.saat) trombosit sayısının en az düştüğü grup P grubuydu. Montes ve ark(2000)'nin $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{saat}$ dozunda ve 6 saat boyunca sürekli endotoksin infüzyonuyla tavşanlarda oluşturdukları DIC modelinde, infüzyon öncesi trombosit sayısı 462×10^9 /L iken, örneklemenin 2., 4. ve 6.saatlerinde sırasıyla; 239, 144 ve 84×10^9 /L olarak kaydedilmekte ve örnekleme zamanları arasındaki farklılıkların önemli olduğu vurgulanmaktadır. Munoz ve ark (1999) E.coli endotoksininin (0.111:B4) 6 saat infüzyonuyla ($100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{saat}$) tavşanlarda oluşturdukları DIC'te, bazal, 2. ve 6.saatlerdeki trombosit sayısını sırasıyla; 454, 226 ve 97×10^9 /L olarak belirtmektedirler. Paloma ve ark (1992)'nin tavşanlarda E.coli endotoksiniyle (0.128:B8, $20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{saat}$) oluşturdukları modelde bazal, 2. ve 6.saatlerdeki trombosit sayısını sırasıyla; 517, 272 ve 150×10^9 /L olarak bildirilmektedir. Hermida ve ark(1999)'nin endotoksin infüzyonu uyguladıkları tavşanlarda yaptıkları çalışmada 2.ve 6.saatlerde belirlenen trombosit sayısındaki düşüşün sırasıyla; %48.8 ve %20.3 düzeylerinde olduğu kaydedilmektedir. Deneysel DIC oluşturulan tavşan (Triantaphllopoulos 1984, Hara ve ark 1987, Warr ve ark 1990, Katsuura ve ark 1994, Scherer ve ark 1995, Kouz ve ark 1996), rat (Ito ve ark 1990, Yoshikawa ve ark 1990, Kawamura ve ark 1993, Gonda ve ark 1993,

Yamazaki ve ark 1999, Fujita ve ark 2000, Izutani ve ark 2000, Asakura ve ark 2001 a, b), fare (Han ve ark 1999), domuz (Vasquez ve ark 1998) gibi hayvanlar ile klinik DIC gelişen insanlarda (Shimura ve ark 1997, Okugawa ve ark 2000, Asakura ve ark 2001 c, d, e) söz konusu parametre açısından elde edilen bulgular hem birbirlerini hem de araştırma sonuçlarını destekler niteliktedir. Tüm bu çalışmalar ışığında DIC'in ve organ yetersizliğinin patogeneziinde platelet aktivasyonunun önemli rolü olduğu sonucuna varılmıştır. Sepsis esnasında platelet aktivasyonunun başlıca mediyatörleri trombin ve PAF dır. Endotoksemilerde bu gibi mediyatörlerin etkisiyle koagülasyon olayına katılan plateletlerin periferel kandaki düzeyleri önemli ölçüde azalmakta, trombositopeni meydana gelmektedir. Trombositopeni oluşumunda plateletlerin gelişiminin birkaç gün sürmesi de önemli bir faktördür. Ayrıca endotoksinin kendisi plateletlere bağlanarak protein kinaz C'nin aktivasyonunu sağlamakta ve fibrinojen bağlanma alanlarının (GPIIb/IIIa) konformasyonel değişikliğine sebep olarak agregasyonu artırmakta ve hızlandırmaktadır (Marcus 1994, DeLa Cadena ve Colman 1999, Salat ve ark 1999). DIC'te oluşan trombositopeninin bir başka nedeni de endotoksinle aktiveleşen kompleman sisteminin plateletlere zarar vermesidir (Latour 1983, Bick 1994). Çalışmada prednisolon uygulamasının trombosit sayısındaki azalmayı önemli oranda baskıladığı görüldü (Tablo 2, Grafik 6). Elde edilen sonuçlar Yamazaki ve ark (1999)'nın geliştirdikleri rat modelinde prednisolon verdikleri grupta elde ettikleri bulgulara (kontrol grubunda; $753 \times 10^9/L$, endotoksin grubunda; $179 \times 10^9 /L$ ve prednisolon grubunda $565 \times 10^9 /L$) benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışma bulguları; "endotoksemi öncesi glukokortikoid uygulamasının plateletlerdeki serotonin kaybını, faktör III oluşumunu, plateletlerin agregasyonunu ve kompleman aktivasyonundan kaynaklanan trombositopeniyi önlediği" bildirimlerini destekler niteliktedir (Latour 1983). Çalışmada vitamin E'nin de trombosit sayısındaki düşüşü önemli oranda baskıladığı gözlemlendi (Tablo 2, Grafik 6). Çalışmada elde edilen bulgular Vitamin E ile ilgili olarak Yoshikawa ve ark (1982)'nin oluşturdukları DIC modellerinde belirttikleri trombosit sayısında meydana gelen değişimlere uygunluk göstermektedir. Sonuç olarak Vitamin E'nin trombosit agregasyonunu önleme ve antioksidan özelliği dikkate alınarak (Yoshikawa ve ark 1982, Basu ve Eriksson 2000) DIC ve endotokseminin seyrini hafifletebileceği söylenebilir.

Çalışmada lökosit sayısı; endotoksin infüzyonunu takiben kontrol grubunda 2.ve 4.saatlerde önemli düzeyde düşüş, 6.saatte ise ilk örneklemeden düşük olmakla birlikte önemli oranda yükselme gösterdi ($P < 0,05$). Söz konusu parametre prednisolon uygulanan hayvanlarda 2.örneklemede önemli düşüş, 3.örneklemede istatistiki önemi olmayan bir yükselme ve özellikle son örneklemede (6.saat) önemli düzeyde yükselme gösterdi ($P < 0,05$).

Aynı parametrenin E vitamini verilen tavşanlarda sadece 2.saatte önemli düzeyde azaldığı ($P<0,05$), bunu izleyen örneklemelerde ise istatistiki yönden önemsiz olmak üzere yükseldiği görüldü. Endotoksin uygulamasından hemen sonra tüm gruplarda gözlenen lökosit sayısındaki düşüşün, başlıca lökosit adezyon molekülleri ile endotelyal reseptörlerin etkileşiminden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Çalışmada endotoksemiye ilk cevap olarak belirlenen lökopeni tablosu; “endotoksinin, nötrofillerin aktivasyonuna ve endotelyuma adezyonlarına sebep olarak sepsisin şiddetine göre başlangıç lökosit sayısını azaltabileceği” bildirimlerini destekler niteliktedir (Gaviria ve ark 1998, Saenz ve ark 2001). Ayrıca çalışmada elde edilen bu bulgu, konuyla ilgili çeşitli araştırma sonuçlarıyla benzerdir (Osterud ve ark 1989, Semrad 1993, Scherer ve ark 1995). Çalışmada P grubunda özellikle 6.saatte diğer gruplarınkine göre lökosit sayısında gözlenen önemli artış, glukokortikoidlerin endotoksin tarafından oluşturulan lökopeniyi engelleyebileceği bildiriyle uyumludur (Latour 1983). Ayrıca Naess ve ark (1991)’nın domuzlarda yaptıkları çalışmada; kontrol grubunda endotoksin infüzyonunun (E.coli 026:B4) önemli derecede lökopeni oluşturduğu, metilprednizolon (MP) uygulanan grupta ise 1.saatte gözlenen lökopeni tablosunun 5.saatte düzelerek, lökosit sayısının başlangıç değerinin de üzerine çıktığı kaydedilmektedir. Osterud ve ark (1989)’nın tavşanlarda yaptıkları çalışmada, kontrol grubunda E.coli LPS’si (026:B6, 75 µg/kg iv) infüzyonunun yüksek düzeyde lökopeni oluşturduğu, MP uygulanan grupta ise 2.saate azalan lökosit sayısının 6.saatte başlangıç değerinin üzerine çıktığı, 24.saatte ise kontrol grubu değerinkinden 3-4 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Ayrıca sayıları artan lökositlerin büyük oranda granülositler olduğu da vurgulanmaktadır. Söz konusu çalışmalar ile rat (Latour 1983) ve sığırlar (Semrad 1993) üzerinde gerçekleştirilen araştırmalardan elde edilen sonuçlar çalışma bulgularını destekler niteliktedir.

Araştırmada akyuvar formülü incelendiğinde, heterofil oranının kontrol grubu tavşanlarda önce önemli düzeyde düştüğü (2. ve 4. saatlerde) daha sonra ise anlamlı bir yükselme gösterdiği (6.saatte) gözlemlendi ($P<0,05$). E vitamini uygulanan grupta 0.saate göre 2.saatteki düşüşün, 2.ve 4.saate göre ise son örneklemedeki (6.saat) yükselişin istatistiki olarak değer taşıdığı görüldü ($P<0,05$). prednisolon grubu tavşanlarda da heterofil yüzdelerinin örnekleme zamanlarına göre anlamlı değişimler gösterdiği belirlenmiş olup, 2.saatteki düşüş ile 4 ve 6.saatlerdeki yükselişler önemli düzeydeydi ($P<0,05$). Söz konusu parametrenin gruplar arası farklılık yönünden 0.saatte önemsiz olduğu, prednisolon uygulanan tavşanlarda 2.,4.ve 6.saatlerde kontrol ve E vitamini uygulanan tavşanlarınkine göre önemli düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Dördüncü ve 6.saatlerdeki farklılık ise tüm gruplar arasında önemliydi ($P<0,05$) (Tablo 2). Deneysel endotoksemi ile akut bakteriyel ve fungal

enfeksiyonlarda kısa bir nütropeni periyodunu nütrofil tablosu izlemektedir. Endotoksin uygulamasını izleyen nütrofil sayısındaki söz konusu azalma; lökosit adezyon molekülleri ile karaciğer, akciğer ve dalak gibi birçok organdaki endotelial reseptörlerin etkileşmesiyle ilişkilendirilmektedir. Bu etkileşimi NfP, endotoksin, TNF- α , IL-1, IL-8 ve PAF artırmaktadır. (Gaviria ve ark 1998). Nütropeni oluşumunu izleyen birkaç saat içerisinde endotoksinin direkt olarak salınımını artırdığı sitokinler (G-CSF, GM-CSF, TNF- α ...) ve aktive ettiği kompleman C3e vasıtasıyla kemik iliği rezervlerinden nütrofil salınımı stimüle edilmektedir (Dale ve ark 1995, Gaviria ve ark 1998, Muller Kobold ve ark 2000). Nitekim çalışmada 6.saatte, 2.ve 4.saatlere göre bir heterofili gözlenmektedir (Tablo 2).

Çalışmada kan lenfosit yüzde oranı, kontrol grubu hayvanlarda ilk örnekleme (0.saat) göre 2.örneklemede (2.saat) önemli oranda artarken ($P<0.05$), artış 4.saate kadar devam etti. Son örneklemede (6.saat) ise önemli oranda düştü ($P<0.05$). Söz konusu parametre yüzdesi açısından E vitamini grubunda 0.saate göre 2.saatte belirlenen önemli artış ($P<0.05$) daha sonraki örnekleme zamanlarında yerini düşüşe bıraktı. Bu düşüş 4.satte önemsiz, 6.saatte ise önemliydi ($P<0.05$). Aynı parametre yüzdesinin P grubunda 0.saate göre 2.saatte yükseldiği ($P<0.05$), daha sonraki örneklemede azalarak 6.saatte en düşük değerde olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). Lenfosit yüzde oranları açısından 0.saatte gruplar arası farklılık gözlenmezken, 2. saatte K ve P grupları, 4.ve 6.saatlerde de gruplar arası farklılıkların hepsi anlamlıydı ($P<0.05$) (Tablo 2). Endotoksemide nütropeniye eşlik eden lenfopeni önemli bulgular arasında sayılmaktadır (Saenz ve ark 2001). Araştırmada K grubunda 0.saatte %61.60 olan lenfosit oranının 2. (%88.90) ve 4. (%90.40) saatlerde yükselmesi genel değerlendirme çerçevesinde bir lenfositoz tablosu olarak algılanmamalıdır. Bu durum lökosit sayısının oranının aynı saatlerde azalmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü aynı grubun (K) 0.saatinde belirlenen ortalama lökosit sayısı; 5.95, 2.saatte 1.43, 4.saatte ise $1.36 \times 10^3 / \text{mm}^3$ 'dür (tablo 2). Bu değerlere göre basit bir hesaplamayla 0.saatte mm^3 kandaki lenfosit sayısının 3665, 2.saatte 1271, 4.saatte 1229 6.saatte ise 2028 olduğu ve lenfositoz değil, lenfopeni tablosunun olduğu görülmektedir.

Endotoksemide proinflamatuvar sitokin salınımı ve doku faktörü oluşumuna sebep olan monositler DIC'in patogeneziinde önemli rol oynamaktadır. Enfeksiyonlarda, konakçı savunmasında önemli rol oynayan bu hücrelerin sayılarının azaldığı bildirilmektedir (Dekkers ve ark 2000, Fijen ve ark 2000). Çalışmada elde edilen monosit yüzde değerlerinin, gerek oransal gerekse aynı örnekleme zamanındaki lökosit sayısı göz önüne alınarak yapılan değerlendirilmesinde, tüm gruplarda 0.saate göre 2.,4.ve 6.saatlerde düşük olduğu gözlemlendi. Monosit yüzde oranları örnekleme zamanlarına göre K ve E gruplarında önemli bir farklılık

göstermezken, P grubunda 2.örneklemede önemli düzeyde düşmüş ($P<0.05$) ve söz konusu düşüş sonraki örneklemelemlerde de devam etmiştir. Deneme grupları arasında monosit yüzdesi P grubunda 2.saatte E grubununkine, 4.saatte her iki grubunkine, 6.saatte ise K grubununkine göre düşük bulundu ($P<0.05$)(Tablo 2).

Eozinopeni septik hastalarda belirlenen bulgular arasında yer almaktadır (Turgut 1995). Araştırmada eozinofil yüzde oranları, K ve P gruplarında ilk örnekleme zamanına göre 2., 4.ve 6.saatlerde düşerken ($P<0.05$), E grubunda gözlenen azalma sadece 6.saatte önemliydi ($P<0.05$). Söz konusu parametre açısından hiçbir örnekleme zamanında gruplar arası farklılık anlamlı değildi (Tablo 2).

Çalışmada bazofil yüzde değerleri yönünden sadece P grubunda 0.saate göre daha sonraki örnekleme saatlerinde önemli düzeyde azalma ($P<0.05$) belirlenirken, gerek diğer gruplarda örnekleme zamanları arasında gerekse aynı saatlerde gruplar arası bir farklılık gözlenmedi. Bununla birlikte en yüksek yüzde oranı tüm gruplarda 0.saat, en düşük oran ise 6. saatte görüldü (Tablo 2).

P grubundaki akyuvar formülündeki değişimler glukokortikoidlerin kemik iliğinde nötrofil oluşumunu artırmasına, lenfosit, monosit, eozinofil ve bazofil sayısını ise azaltmasına bağlanabilir (Yılmaz 1999). Ayrıca çalışmada elde edilen lökosit yüzdelerindeki değişim ile ilgili bulgular, deneysel endotoksemi oluşturulan bir çok çalışma sonuçlarıyla benzer bulundu (Latour 1983, Osterud ve ark 1989, Naess ve ark 1991, Semrad 1993, Scherer ve ark 1995, Islam ve ark 1998, Wu ve ark 1999).

Sonuç olarak; tavşanlarda endotoksin infüzyonu ile oluşturulan deneysel DIC üzerine vitamin E ve prednisolon'un etkilerinin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada; yalnız endotoksin uygulanarak DIC oluşturulan tavşanlarda APTT, PT ve TT' de önemli derecede patolojik uzama, fibrinojen konsantrasyonu ve trombosit sayısında azalma, D-dimer seviyesinde yükselme ve lökopeni belirlendi. Ancak önceden E vitamini ve özellikle de prednisolon uygulamalarının, hemostatik mekanizmalarda ve hematolojik parametrelerde oluşacak olumsuz değişiklikleri engelleyebileceği ve DIC'te kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı.

6. ÖZET

S.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ / KONYA-2003

Ramazan ÇÖL

Danışman

Prof. Dr. Zafer DURGUN

Tavşanlarda Endotoksin İle Oluşturulan Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DIC) Üzerine Vitamin E ve Prednisolon'un Etkileri

Araştırmada sağlıklı ve canlı ağırlıkları 1.5-2.5 kg civarında olan 30 adet Yeni Zelanda ırkı erkek tavşandan yararlanıldı. Hayvanlar endotoksin (K), Vitamin E+endotoksin (E) ve prednisolon+endotoksin (P) olmak üzere üç eşit gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol (K) olarak kullanılırken, hayvanlara 6 saat boyunca 100 µg/kg/saat dozunda infüzyon tarzında endotoksin (E. coli lipopolisakkarit 0.111:B4) uygulandı. İkinci grubu oluşturan hayvanlara (E) 4 gün 10 mg/kg/gün İP Vitamin E (DL-alpha tocopherol acetat) enjeksiyonundan sonra dördüncü enjeksiyonu takiben 10. dakikadan itibaren yine 6 saat, 100µg/kg/saat dozunda endotoksin infüzyonu yapıldı. Üçüncü gruptaki (P) hayvanlara aynı süre ve dozdaki endotoksin infüzyonundan 30 dakika önce 10mg/kg SK prednisolon (Prednisolon) verildi. Anestezi altındaki hayvanların arteria femoralislerinden endotoksin infüzyonundan hemen önce (0.saat) ve infüzyonu izleyen 2., 4. ve 6. saatlerde kan örnekleri alındı. Alınan örneklerde; plazma APTT, PT, TT, fibrinojen ve D-dimer düzeyleri ile kan platelet sayısı, lökosit sayısı ve lökosit yüzdeleri belirlendi.

Çalışmada; endotoksin (K) grubunda APTT, PT ve TT' de önemli derecede uzama, fibrinojen konsantrasyonu ve trombosit sayısında düşme, D-dimer seviyesinde yükselme ve lökopeni gözlenirken, akyuvar tipleri yüzdelerinde ise örnekleme zamanlarına göre anlamlı değişimler kaydedildi. Buna karşın; Vitamin E ve Prednisolon uygulamasının hemostatik ve hematolojik birçok parametrede meydana gelen olumsuz değişiklikleri (APTT, PT ve TT'nin uzamasını, lökopeni oluşumunu fibrinojenin miktarı ve trombosit sayısının azalmasını, D-dimer düzeyinin artmasını vb.) önemli düzeyde baskıladığı belirlendi. Söz konusu etkinin E grubunkine göre P grubunda daha belirgin olduğu görüldü.

7. SUMMARY

Effects of Vitamin E and Prednisolone on Endotoxin-induced Disseminated Intravascular Coagulation in Rabbits

This study was conducted to determine the protective effects of prednisolone and vitamin E on the development of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits.

In this study, a total of 30 male New Zealand White rabbits weighing between 1.5-2.5 kg were used. The animals were equally divided into three groups as endotoxin (K), prednisolone +endotoxin (P) and vitamin E+endotoxin (E) groups. Experimental DIC was induced in all groups by intravenous infusion of 100 µg/kg/h lipopolysaccharide (E coli 0111:B4, LPS) for 6 h in 60 ml (10 ml/h) saline through the marginal ear vein. In group E, vitamin E was injected (10 mg/kg, intraperitoneally) for 4 successive days, and LPS was infused 10 min after the final vitamin E injection. Prednisolone was injected (10 mg/kg subcutaneously) 30 min before the administration of LPS in group P. Blood samples from the anaesthetized animals were taken through a catheter inserted into the femoral artery immediately before LPS infusion, and then 2, 4 and 6 hours after the beginning. The severity of DIC was determined by reference to various parameters including fibrinogen, D-dimer, APTT, PT, TT, platelet counts, leukocyte counts and percentage of differential leukocytes.

In this study, in group K we observed an important prolongation in APTT, PT and TT, and a decrease in platelet count and fibrinogen level, and an increase in D-dimer concentration, and leukopenia, and also significant changes in the percentage of differential leukocytes at sampling times. However, the administrations of prednisolone and vitamin E significantly caused the suppression on the determined parameters in endotoxemic animals. We have suggested that the treatments of prednisolone and vitamin E may be useful in LPS-induced DIC, and we have concluded that prednisolone has more effective than vitamin E.

8. LİTERATÜR LİSTESİ

- Abe H, Okajima K, Okabe H, Takatsuki K and Binder BR (1994)** *Granulocyte proteases and hydrogen peroxide synergistically inactivate thrombomodulin of endothelial cells in vitro*, J Lab Clin Med, 123, 874-881.
- Aderka D (1991)** *Role of Tumor necrosis factor in pathogenesis of intravascular coagulopathy of sepsis: potential new therapeutic implication*, Isr J Med Sci, 27, 52-60.
- Asakura H, Kamikubo Y, Goto A, Shiratory Y, Yamazaki M, Jokai H et al (1995)** *Role of tissue factor*, Thromb Res, 80, 217-224.
- Asakura H, Aoshima K, Ichino T, Suga Y, Saito M, Morishita E et al (2001a)** *All-trans retinoic acid is partially effective against lipopolysaccharide-induced but not against tissue-factor-induced disseminated intravascular coagulation in rat models*, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 12, 301-306.
- Asakura H, Aoshima K, Suga Y, Yamazaki M, Morishita E, Saito M et al (2001b)** *Beneficial effect of the active form of vitamin D₃ against LPS-induced DIC but not against tissue-factor-induced DIC in rat models*, Thromb Haemost, 85, 287-290.
- Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Ito T, Saito M et al (2001c)** *Depressed plasma activity of plasminogen or α 2 plasmin inhibitor is not due to consumption coagulopathy in septic patients with disseminated intravascular coagulation*, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 12, 275-281.
- Asakura H, Ontachi T, Mizutani T, Kato M, Saito M, Morishita E et al (2001d)** *Elevated levels of free tissue factor pathway inhibitor antigen in cases of disseminated intravascular coagulation caused by various underlying diseases*, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 12, 1-8.
- Asakura H, Ontachi T, Mizutani T, Kato M, Saito M, Kumabashiri I et al (2001 e)** *An enhanced fibrinolysis prevents the development of multiple organ failure in disseminated intravascular coagulation in spite of much activation of blood coagulation*, Crit Care Med, 29, 6, 1164-1168.
- Basu S and Eriksson M (2000)** *Vitamin E in relation to lipid peroxidation in experimental septic shock*, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 62,3,195-199.
- Bauer KA, ten Cate H, Barzegar S, Spriggs DR, Sherman ML and Rosenberg RD (1989)** *Tumor necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans*, Blood, 74, 165-72.
- Bennett JS (1990)** *The molecular biology of platelet membrane proteins*, Semin Hematol, 27, 186-204.
- Berridge NJ (1984)** *Inositol trisphosphate and diacylglycerole as second messengers*, Biochem J, 220, 345-360.

- Bevilacqua M, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS and Gimbrone MA (1984)** *Interleukin-1 induces biosynthesis and cell expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cell*, J Exp Med, 160, 618-23.
- Bick RL and Baker W (1992)** *Diagnostic efficacy of the D-dimer assay in DIC and related disorders*, Thromb Res, 65, 785.
- Bick RL (1994)** *Disseminated intravascular coagulation: Objective Criteria for Diagnosis and Management*, Medical Clinics of North America, 78(3), 511-543.
- Biomond BJ, Levi M and ten Cate H (1995)** *Endotoxin-induced activation and inhibition of the fibrinolytic system: Effects of various interventions in the cytokine and coagulation cascade in experimental endotoxemia in chimpanzees*, Clin Sci, 88, 587-594.
- Bokoch (1995)** *Chemoattractant signaling and leukocyte activation*, Blood, 1649-1660.
- Bone RC, Fisher CJ and Clemmer TP (1989)** *Sepsis syndrome: A valid clinical entity*, Crit Care Med, 17, 389.
- Broner CW, Henep JL, Stidham GL, Stokes DC, Fairclough D, Schonbaum GR and Rehg JE (1989)** *Effect of antioxidants in experimental Escherichia coli septicemia*, Circulatory Shock, 29, 77-92.
- Carey MJ and Rodgers GM (1998)** *Disseminated intravascular coagulation: Clinical and Laboratory Aspects*, Am J Hematol, 59, 65-73.
- Clermont HG, Williams Js and Adams JT (1974)** *Steroid effects on the release of lysosomal enzyme phosphatase in shock*, Am Surg, 179, 917-921.
- Colman RW, Marder VJ, Salzman EW and Hirsh J (1994)** *Plasma coagulation factors in "Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice"*. 3-17, JB Lippincott Company, Philadelphia.
- Conway EM and Rosenberg RD (1988)** *Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells*, Mol Cell Biol, 8, 5588-92.
- Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wun TC, Taylor FBJ and Hinshaw LB (1993)** *Tissue Factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock*, J Clin Invest, 91, 2850-2856.
- Creasey AA (1999)** *New potential therapeutic modalities: Tissue factor pathway inhibitor*, Sepsis, 3, 173-182.
- Creasey AA and Reinhart K (2001)** *Tissue factor pathway inhibitor activity in severe sepsis*, Crit Care Med, 29 (7), 125-129.
- Crutchley DJ, Conanan LB, Toledo AW, Solomon DE and Que BG (1993)** *Effects of prostacyclin analogues on human endothelial cell tissue factor expression*, Arterioscl Throm Vas, 13, 1082-1089.

- Dale DC, Liles C and Summer R(1995)** *Review: Granulocyte colony-stimulating factor-role and relationships in infectious diseases*, J Infect Dis, 172, 1061-1075.
- Dekkers PEP, ten Hove T, Velde AA, Deventer AJH and van der Poll T (2000)** *Upregulation of monocyte urokinase plasminogen activator receptor during human endotoxemia*, Infection and Immunity, 68, 4, 2156-2160.
- DeLa Cadena R, Wachtfogel YT and Colman RW (1994)** *Contact activation pathway; Inflammation and Coagulation* in “ Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice”. 3-17, JB Lippincott Company, Philadelphia.
- DeLa Cadena RA and Colman RW (1999)** *Platelets in sepsis*, Sepsis, 3, 143-146.
- Dempfle CE, Pfitzner SA, Dollman M, Huck K, Stehle G and Heene DL (1995)** *Comparison of immunological and functional assays for measurement of soluble fibrin*, Thromb Haemostas, 74, 673-679.
- Deniz A (1999)** *Felin immun yetmezlik virus'unun (FIV) seropozitif olduğu kedilerde kan pıhtılaşma sisteminin kontrolü*, Vet Bil Derg, 15, 1, 111-118.
- Deniz A (2000)** *Kedi ve Köpeklerde kan Pıhtılaşma sisteminin kontrolü*, Vet Bil Derg, 16,1, 151-159.
- Dündar Y ve Aslan R (2000)** *Hekimlikte oksidatif stres ve Antioksidanlar*, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yayın no: 29.
- Elsayed TA, Nakagawa K, Kamikubo YI, Enjojo KI, Kato H and Sueishi K (1996)** *Effects of recombinant human tissue factor pathway inhibitor on thrombus formation and its in vivo distribution in a rat DIC model*, American Journal of Clinical Pathology, 106, 574-583.
- Erhan ÖL ve Yaşar MA (1997)** *Sesis ve septik şok “Sistemik İnfeksiyöz Hastalıkları” Ed: Süleyman Felek, Nobel Tıp Kitapevleri*, 397-409.
- Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM et al (1999)** *Inflammation, sepsis, and coagulation*, Haematologica, 84, 254-259.
- Faulkner WR (1995)** *Laboratory diagnosis of DIC*, Lab Rep , 17, 1-5.
- Feldman BF (1992)** *Diagnostic approaches to coagulation and fibrinolytic disorders*, Semin. Vet. Med. Surg. (Small Animal), 7, 315-322.
- Feola M, Simoni J, Conigardo PC (1988)** *Toxicity of polymerized hemoglobin solution*, Surg Gynecol Obst, 166, 211-22.
- Fmk MP and Heard SO (1990)** *Laboratory models of sepsis and septic shock*, Journal of Surgical Research, 49, 186-196.
- Fijen JW, Kobold ACM, de Boer P, Jones CR, van der Werf TS, Tervaert JWC et al (2000)** *Leukocyte activation and cytokine production during experimental human endotoxemia*, European Journal of Internal Medicine, 11, 89-95.

- Fisher CJJ and Yan SB (2000)** *Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases*, Crit Care Med, 28, 49-56.
- Foster AP, Lees P and Andrews MJ (1992)** *Effects of WEB 2086, an antagonist to the receptor for platelet-activating factor (PAF), on PAF-induced responses in horse*, Equine Vet J, 24, 203-207.
- Fourrier F, Chopin C, Huart JJ, Runge I, Caron C and Goudemand J(1993)** *Double-blind placebo-controlled trial of antithrombin III concentrate in septic shock with disseminated intravascular coagulation*, Chest, 104, 882-92.
- Fujita M, Izutani W and Kamurasaki Y (2000)** *Effect of urinary protein C inhibitor on lipopolysaccharide- induced disseminated intravascular coagulation in rats*, Thromb Haemost, 84, 54-58.
- Gando S, Kameue T, Nanzaki S and Nakanishi Y(1996)** *Diseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome*, Thromb Haemost, 75, 224-228.
- Garcia-Fernandez N, Montes R, Purroy A and Rocha E (2000)** *Hemostatic disturbances in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and associated acute renal failure (ARF)*, Thrombosis Research, 100, 19-25.
- Gaviria JM, Dale DC and Root RK (1998)** *Neutrophils: Function and role in sepsis syndrome*, Sepsis, 2, 107-117.
- Gentry PA and Cooper ML (1979)** *Reagent dependent variability of plasma clotting times in the cat*, Feline Pract., 9, 33-37.
- Gomez-Jimenez J, Salgado A, Mourelle M, Martin MC, Segura RM, Peracaula R and Moncada S (1995)** *Nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock*, Crit Care Med, 23, 253-257.
- Gonda Y, Hirata S, Saitoh K, Aoki Y, Mohri M, Gomi K et al (1993)** *Antithrombotic effect of recombinant human soluble thrombomodulin on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats*, Thrombosis Research, 71, 325-335.
- Green R (1989)** *Hemostatic Disorders* in "Textbook of Veterinary internal Medicine. Diseases of the Dogs and Cats"., Ed., Ettinger, S.J., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2246-2264.
- Gregory SA, Morrissey JH and Edgington TS (1989)** *Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin*, Mol Cell Biol, 9, 2752-5.
- Gross OL and Aird WC (2000)** *The Endothelium and thrombosis*, Seminars in thrombosis and hemostasis, 26(5), 463-78.
- Guyton MD and Hall NR (1996)** *Hemostaz ve kan pıhtılaşması "Tıbbi Fizyoloji"*. Ed., Çavuşoğlu, H., 463-472, Nobel Tıp Kiyapevi, İstanbul.

- Hack CE (1993)** *Inhibitor substitution in sepsis*, Intensive Care Med, 19, 1-2.
- Hack CE and Zeerleder S (2001)** *The endothelium in sepsis : Source of and a target for inflammation*, Crit Care Med, 29 (7), 21-27.
- Han SJ, Choi JH, Ko HM, Yang HW, Choi IW, Lee HK, Lee OH and Im SY (1999)** *Glucocorticoids prevent NF- κ B activation by inhibiting the early release of platelet-activating factor in response to lipopolysaccharide*, Eur J Immunol, 29, 1334-2341.
- Hara H, Tamao Y, Kikumato R and Okamoto S (1987)** *Effect of a synthetic thrombin inhibitor MCI-9038 on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits*, Thrombosis and Haemostasis, 57 (2), 165-170.
- Hardaway RM (2000)** *Review of septic shock*. The American Surgeon, 66(1), 22-29.
- Hermida J, Montes R, Munoz MC, Orbe J, Paramo JA and Rocha E (1999)** *Effects of low molecular weight heparin, alone or combined with antithrombin III, on mortality, fibrin deposits and hemostatic parameters in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits*, Am J Hematol, 60, 6-11.
- Hesselvik JF, Blomback M, Brodin B and Maller R (1989)** *Coagulation, fibrinolysis and kallikrein systems in sepsis: relation to outcome*, Critical Care Med, 17, 724-733.
- Hinshaw LB, Beller BK, Chang ACK, Murray CK, Flournoy DJ, Passey RB and Archer LT (1985)** *Corticosteroid treatment of adrenalectomized dogs challenged with lethal E. coli*, Circ Shock, 16, 265-277.
- Hinshaw LB, Tekamp-Olson P and Chang ACK (1990)** *Survival of primates in LD100 septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF)*, Circ Shock, 30, 279-92.
- Houck JC and Gladner JA (1970)** *Proposed mechanisms for the ameliorative effects of corticosteroids in shock*, Ad Exp Med Biol, 9, 125-130.
- Hynes RO (1987)** *Integrins: A family of cell surface receptors*, Cell, 48, 549-554.
- Islam KN, Devaraj S and Jialal I (1998)** *α -Tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells*, Circulation, 98, 2255-2261.
- Ito T, Asai F, Oshima T and Kobayashi S (1990)** *Role of activated platelets in endotoxin-induced in rats*, Thrombosis Research, 59, 735-747.
- izutani W, Fujita M, Nishizawa K and Koga J (2000)** *Urinary protein C inhibitor as a therapeutic agent to disseminated intravascular coagulation (DIC): A comparison with low molecular weight heparin in rats with lipopolysaccharide-induced DIC*, Biol Pharm Bull, 23 (9), 1046-1050.

- Jalbert LR, Rosen ED and Moons L (1998)** *Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice*, J Clin Invest, 102, 1481-1488.
- Jansen PM, Boermeester MA and Fischer E (1995)** *Contribution of interleukin-1 to activation of coagulation and fibrinolysis, to neutrophil degranulation and the release of sPLA2 in sepsis*, Blood, 86, 1027-34.
- Katsuura Y, Aoki K, Tanabe H, Kiyoki M, Funatsu A (1994)** *Characteristic effects of activated human protein C on tissue thromboplastin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits*, Thromb Res, 76, 353-362.
- Kawamura M, Terashita Z, Imura Y, Shino A and Nishikawa K (1993)** *Inhibitory effect of TCV-309, a novel platelet activating factor (PAF) antagonist, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats: possible role of PAF in tissue factor generation*, Thrombosis Research, 70, 281-293.
- Keskin E, Durgun Z, Kocabatmaz M, Baş AL, Dönmez N and Önder F (1998)** *Effect of garlic and aspirin on some coagulation parameters in hypercholesterolaemic rabbits*, Medical Science Research, 26, 413-415.
- Konuk T (1981)** *Pratik Fizyoloji*, A Ü Vet Fak Yayınları, Ankara.
- Kouz J, Czsck J, Nicolay U and Dickneite G (1996)** *Influence of recombinant hirudin on tissue-factor-induced activation of coagulation in rabbits*, Haemostasis, 26, 179-186.
- Lane DA, Preston FE, van Ross ME and Kakkar VV (1978)** *Characterization of serum fibrinogen and fibrin fragments produced during disseminated intravascular coagulation*, Br J Haematol, 40, 609-615.
- Latour JG and Leger C (1975)** *Prevention by glucocorticoids of disseminated intravascular coagulation induced by endotoxin; mechanism*, J Lab Clin Med, 85, 934-949.
- Latour JG (1983)** *Modulation of disseminated intravascular coagulation (DIC) by steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs*, Agents and Actions, 13, 5/6, 487-495.
- Levi M, Ten Cate H, Bauer KA, van der Poll T, Edgington TS, Buller HR et al (1994)** *Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifyllin or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in a chimpanzee model*, J Clin Invest, 93, 114-120.
- Levi M, Van der Poll T, ten Cate H and van Deventer SJH (1997)** *The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanism in sepsis and endotoxaemia*, European Journal of clinical investigation, 27, 3-9.
- Levi M and ten Cate H (1999)** *Disseminated intravascular coagulation: current concept*, N Engl J Med, 341, 586-592.
- Levi M, Jonge E, van der Poll T and ten Cate H (1999)** *Disseminated intravascular coagulation*, Thrombosis and Haemostasis, 82(2), 685-705.

- Levi M, Jonge E, van der Poll T and ten Cate H (2000)** *Novel approach to the management of disseminated intravascular coagulation*, Crit Care Med, 28 (9), 20-24.
- Levi M, de Jonge E and van der Poll T (2001)** *Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation*, Crit Care Med, Jul;29(7Suppl), 90-94.
- Mammen EF (1995)** *Clinical relevance of antithrombin deficiencies*, Seminars in Hematology, 32(2), 2-67.
- Mammen EF (1998)** *The haematological manifestations of sepsis*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41 Suppl A, 17-24.
- Marcus AJ, Weksler BB and Jaffe EA (1978)** *Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide H_2 and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells*, J. Biol. Chem., 253, 7138-7174.
- Marcus AJ (1994)** *Thrombosis and inflammation as multicellular processes: Significance of cell-cell interactions*, Semin Hematol, 31, 261-269.
- Marder VJ, Feinstein DI, Francis CW and Colman RW (1994)** *Consumptive thrombohemorrhagic disorders* in "Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice". 3-17, JB Lippincott Company, Philadelphia.
- Marques D, Cazana L and Puyol R (1987)** *dl- α -Tocopheryl acetate induces hypocoagulability and platelet hypoaggregability in rats*, Internal J Vit Nutr Res, 57, 375-379.
- Martin DJ, Toce JA, Anevski PJ, Tollefsen DM and Abendschein DR (1999)** *Anticoagulant and antithrombotic activity of maltodapoh, a novel sulfated tetrasaccharide*, JPET, 288, 516-521.
- Masters RM, Mannucci PM, Coppola R, Keller T, Ostermann H and Kienast J (1996 a)** *Factor VIIa and antithrombin III activity during severe sepsis and septic shock in neutropenic patients*. Blood, 88, 881-6.
- Masters RM, Flörke N, Osremann H and Keinast J (1996 b)** *Increase of plasminogen activator inhibitor levels predicts outcome in leucocytopenic patients with sepsis*, Thrombosis and Haemostasis, 75, 902-7.
- Matot I and Sprung CL (2001)** *Definition of sepsis*, Intensive Care Med, 27, 3-9.
- McKechnie K, Furman BL, Parrant JR (1986)** *Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats*, Circulatory, 19, 429-439.
- Meijers JCM and Bouma BN (1999)** *New Concepts in Activation of the Clotting Cascade in Sepsis*, Sepsis, 3:87-91.

- Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR (1988)** *Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration*, N Engl J Med, 318, 1481-1486.
- Montes R, Declerck PJ, Calvo A, Montes M, Hermida J, Munoz MC and Rocha E (2000)** *Prevention of renal fibrin deposition in endotoxin-induced DIC through inhibition of PAI-1*, Thromb Haemost, 84, 65-70.
- Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CGM and Tervaert JWC (2000)** *Leukocyte activation in sepsis; correlation with disease state and mortality*, Intensive Care Med, 26, 883-892.
- Muller MM and Griesmacher A (2000)** *Markers of endothelial dysfunction*, Clin Chem Lab Med, 38, 77-85.
- Munck A, Guyre PM and Holbrook NJ (1984)** *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions*, Endoc Rev, 5, 25-44.
- Munoz MC, Montes R, Hermida J, Orbe J, Paramo JA and Rocha E (1999)** *Effect of the administration of recombinant hirudin and / or tissue-plasminogen activator (t-PA) on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation model in rabbits*, British Journal of Haematology, 105, 117-122.
- Müller-Berghaus G, ten Cate H and Levi M (1999)** *Disseminated intravascular coagulation: Clinical spectrum and established as well as new diagnostic approaches*, Thrombosis and Haemostasis, 82(2), 706-712.
- Naess F, Roeise O, Pillgram-Larsen J, Ruud TE, Stadaas JO and Aasen AO (1991)** *Plasma kallikrein generation in endotoxemia is abolished by ultra high doses of methylprednisolone: In vivo studies in a pig model*, Circulatory Shock, 34, 394-355.
- Nawroth PP and Stern DM (1986)** *Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 163, 740-5.
- Nuijens JH, Huijbregts CCM and Eerenberg-Belmer AJM (1988)** *Quantification of plasma factor XIIa-C1-inhibitor and kallikrein-C1-inhibitor complexes in sepsis*, Blood, 72, 184-188.
- Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC and Beger HG (1999)** *Leukocytes, the janus cells in inflammatory disease*, Langenbeck's Arch Surg, 384, 222-232.
- Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Okabe H and Takatsuki, K (1996)** *Determination of plasma soluble fibrin using a new ELISA method in patients with disseminated intravascular coagulation*, Am J Haematol, 51, 186-191.
- Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Okabe H and Takatsuki K (1997)** *Plasma levels of soluble E-selectin in patients with disseminated intravascular coagulation*, Am J Hematol, 52, 219-224.
- Okajima K (1999)** *The role of leukocytes in disseminated intravascular coagulation associated with sepsis*, Sepsis, 3, 135-142.

- Okugawa Y, Wada H, Noda T, Sakakura M, Nakasaki T, Watanabe R et al (2000)** *Increased plasma levels of tissue factor pathway inhibitor-activated factor X complex in patients with disseminated intravascular coagulation*, *Am J Hematol*, 65, 210- 214.
- Opal SM and Thijs LG (1999)** *New potential therapeutic modalities: Antithrombin III*, *Sepsis*, 3, 153–159.
- Osterud B, Tindall A and Olsen JO (1989)** *Effect of steroids during Esherichia coli endotoxemia in rabbits*, *Haemostasis*, 19, 292-299.
- Oubina MP, Heras N, Vazquez-Perez S, Cediell E, Sanz-Rosa D, Ruilope LM et al (2002)** *Valsatran improves fibrinolytic balance in atherosclerotic rabbits*, *J Hypertens*, 20, 2, 303-310.
- Paloma MJ, Paramo JA and Rocha E (1992)** *Effect of DDAVP on endotoxin-induced intravascular coagulation in rabbits*, *Thrombosis and Haemostasis*, 68 (3), 306-309.
- Pectre C, Thysell H, Grubb A and Olsson I (1988)** *Tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids*, *Eur J Haematol*, 41, 414-419.
- Pixley RA, de la Cadena R, Page JD, Kaufman N, Wyshock EG, Chang A, Taylor FB and Colman RW (1993)** *The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in letal bacteremia: in vivo use of a monoclonal ant-factor XII antibody to block contact activation in baboons*, *J Clin Invest*, 92, 61-68.
- Putterman C (1989)** *Corticosteroids in sepsis and septic shock: the jury reached a verdict?*, *Isr J Med Sci*, 25, 332-338.
- Radomski MW, Palmer RMJ and Moncada S (1990)** *L-arginin/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*, *Proc Natl Acad Sci*, 87, 5193-97.
- Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V and Muller WA (1998)** *Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro*, *Blood*, 92, 4167-4177.
- Redl H, Bahrami S, Schlag G and Traber DL (1993)** *Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia*, *Immunobiology*, 187, 330-345.
- Rintala E, Kauppila M and Seppala OP (2000)** *Protein C substitution in sepsis-associated purpura fulminans*, *Crit Care Med*, 28, 2373-2378.
- Rocha E, Paramo JA, Montes R and Panizo C (1998)** *Acute generalized, widespread bleeding. Diagnosis and management*, *Haematologica* , 83, 1024-1037.
- Rodgers GM (1988)** *Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells*, *FASEB. J.*, 2, 116-123.
- Sabharwal AK, Bajaj SP and Ameri A (1995)** *Tissue factor pathway inhibitor and von Willebrand factor antigen levels in adult respiratory distress syndrome and in a primate model of sepsis*, *AM J Respir Crit Care Med*, 151, 758-767.

- Saenz JJ, Izura JJ, Manrique A, Sala F and Gaminde I (2001)** *Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype*, Intensive Care Med, 27, 970-977.
- Sakaguchi O, Kanda N, Sakaguchi S, Hsu C and Abe H (1981)** *Effect of α -tocopherol in endotoxemia*, Microbiol Immunol, 25, 787-799.
- Salat A, Murabito M, Boehm D, Bodingbauer G, Pulaki S, Sautner T, Mueller MR and Fuegger R (1999)** *Endotoxin enhances in vitro platelet aggregability in whole blood*, Thrombosis Research 93, 145-148.
- Saussy DL, Mars DE, Burch RM (1986)** *Identification of a putative thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor in human platelet membranes*, J Biol Chem, 261, 2065.
- Schade FU, Buemeister I and Engel R (1987)** *Increased 13-hydroxyoctadecadienoic acid content in lipopolysaccharide-stimulated macrophages*, Biochem Biophys Res Comm, 147, 696-700.
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK and Baldwin AS (1995)** *Role of transcriptional activation of I χ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids*, Science, 270, 283-286.
- Scherer RU, Giebler RM, Schmidt U, Paar D, Wüst T, Spangenberg P, Militzer K, Hirche H and Kox WJ (1995)** *Short-time rabbit model of endotoxin-induced hypercoagulability*, Laboratory Animal Science, 45, 538-546.
- Schmeck J, Heller A, Phan TL, Urbschek R and Koch T (1999)** *Effects of endothelin-1 on bacterial clearance in rabbits*, Eur J Anaesthesiol. 16, 169-175.
- Semrad SD (1993)** *Comparison of flunixin, prednisolone, dimethyl sulfoxide, and a lazaroid (U74389F) for treating endotoxemic neonatal calves*, Am J Vet Res, 54, 9, 1517-1522.
- Shimura M, Wada H, Wakita Y, Nakase T, Hiyoyama K, Negaya S et al (1997)** *Plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in patients with disseminated intravascular coagulation*, Am J Haematol, 55, 169-174.
- Sissons SD, Dinarello CA (1988)** *Production of IL-1 α and IL-1 β and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, Blood, 72, 1368-1374.
- Skubitz KM, Craddock PR, Hammerschmidt DE and August JT (1981)** *Corticosteroids block binding of chemotactic peptide to its receptor on granulocytes and cause disaggregation of granulocyte aggregation in vitro*, J Clin Invest, 68, 13-20.
- Spero JA, Lewis JH and Hasiba U (1980)** *Disseminated intravascular coagulation. Findings in 346 patients*, Thromb Haemost, 43-28-33.
- Spijkstra JJ, Girbes ARJ (2000)** *The continuing story of corticosteroids in the treatment of septic shock*, Intensive Care Med, 26, 496-500.

- Spitznagel JK (1990)** *Antibiotic proteins of human neutrophils*. J Clin Invest, 86, 1381-1386.
- SPSS (1988)** *SPSS/PC + V.2.0. Base Manual for IBM PC/XT/AT and PS/2. Marija and Morusis*. Soil Science Society of America, Inc., Chicago, IL.
- Suffredini AF, Harpel PC and Parillo JE (1989)** *Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activator after administration of intravenous endotoxin to normal subject*, New Eng J Med, 320, 1165-72.
- Sugimoto Hiroyuki, Matsuzaki Shigero, Hamana Koei, Yamada Shoji and Kobayashi S (1991)** *α -Tocopherol and superoxide dismutase suppress and diethylthiocarbamate and phrone enhance the lipopolysaccharide-induced increase in N^1 -Acetylspermidine concentration in mouse liver*, Circulatory Shock, 33, 171-177.
- Takeda K, Shimada Y, Okada T, Amano M, Sakai T and Yoshiya I (1986)** *Lipid peroxidation in experimental septic rats*, Crit Care Med, 14, 8, 719-723.
- Taylor FB, Chang Jr A, Esmon CT, D' Angelo A, Vigano D'angelo S and Blick KE (1987)** *Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon*, J Clin Invest, 79, 918-25.
- Taylor F, Chang A, Ferrell G, Mather T, Catlett R, Blick K and Esmon CT (1991a)** *C4b-binding protein exacerbates the host response to Escherichia coli*, Blood, 78, 357-363.
- Taylor FB, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K and Edgington TS (1991b)** *Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody*, Circ Shock, 33, 127-134.
- Ten Cate H, Bauer KA and Levi M (1993)** *The activation of factor IX and factor X by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor*, J Clin Invest, 92, 1207-12.
- Thijs LG, de Boer JP, de Groot MCM and Hack CE (1993)** *Coagulation disorders in septic shock*, Intensive Care Med, 19: Suppl 1, 8-15.
- Titheradge MA (1999)** *Nitric oxide in septic shock*, Biochimica et Biophysica Acta 1411, 437-455.
- Triantaphyllopoulos DC (1984)** *Effects of human antithrombin III on mortality and blood coagulation induced in rabbits by endotoxin*, Thromb Haemost, 51 (2), 232-235.
- Turgut K (1995)** *Hemostazis ve koagulasyon bozuklukları ve testleri “ Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis”*, 104-130.
- Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H and Takatsuki K (1992)** *Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury by antithrombin III*, Am J Physiol, 270, 921-930.
- Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Okamoto S and Okado T (1997a)** *Effects of plasma kallikrain specific inhibitor and active-site blocked factor VIIa on the pulmonary vascular injury induced by endotoxin in rats*, Thromb Haemost, 78, 1209-1214.

- Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Johno M, Okabe H and Takatsuki K (1997 b)** *Effects of human urinary thrombomodulin on endotoxin-induced intravascular coagulation and pulmonary vascular injury in rats*, *Am J Hematol*, 54, 118-123.
- Vallet B and Wiel E (2001)** *Endothelial cell dysfunction and coagulation*, *Crit Care Med*, 29, 7, 36-41.
- van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA and van Devender SJH (1990)** *Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subject*, *N Engl J Med*, 322, 1662-1627.
- van der Poll T, Levi M, Buller HR, van Devender SJH, de Boer JP and Hack CE (1991)** *Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subject*, *J Exp Med*, 174, 729-33.
- van der Poll T, Levi M and Hack CE (1994)** *Elimination of interleukin-6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees*, *J Exp Med*, 179, 1253-9.
- Van Devender SJH, Buller HR, ten Cate JW, Aarenden LA, Hack CE and Sturk A (1990)** *Experimental endotoxemia in humans; analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways*, *Blood*, 76, 2520-2526.
- Vasquez Y, Williams CH and Hardway RM (1998)** *Effect of urokinase on disseminated intravascular coagulation*, *Journal of Applied Physiology*, 85, 4, 1421-1428.
- Vassali P (1992)** *The pathophysiology of tumor necrosis factor*, *Annu Rev Immunol*, 10, 411-42.
- Von Der Mohlen MAM, Kimmings AN and Wedel NI (1995)** *Inhibition of endotoxin-induced cytokine and neutrophil activation in humans using recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI₂₃)*, *J Infect Dis*, 172, 144-151.
- Voss R, Matthias FR, Borkowski G and Reitz D (1990)** *Activation and inhibition of fibrinolysis in septic patients in an internal intensive care unit*, *British Journal of Haematology*, 75, 99-105.
- Wada H, Minamikawa K, Wakita Y, Nakase T, Kaneko T, Ohwa M et al (1993)** *Hemostatic study before onset of disseminated intravascular coagulation*, *Am J Hematol*, 43, 190-194.
- Wada H, Nakase T and Nakaya R (1996)** *Elevated plasma tissue factor antigen level in patients with disseminated intravascular coagulation*, *Am J Hematol*, 52, 165-170.
- Wagner DD, Urban-Pickering M and Marder VJ (1984)** *Von Willebrand protein binds to extracellular matrices independently of collagen*, *Proc Natl Acad Sci*, 81, 471-478.
- Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A and Oldner A (2000)** *The endothelin system in septic and endotoxin shock*, *European Journal of Pharmacology* 40,7, 1-15.

- Warr BTA, Rao VM and Rapaport S (1990)** *Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity*, Blood, 75, 7, 1481-1489.
- Weiss HJ, Turitto VT (1979)** *Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium*, Blood, 53, 244-250.
- Weiss SJ (1989)** *Tissue destruction by neutrophils*, N Engl J Med, 320, 356-376.
- Weiss DJ and Rashid J (1998)** *The Sepsis-coagulant axis: A review*, J Vet Intern Med, 12, 317-324.
- Wilson RF, Farag AM, Mammen EF and Fujii Y (1989)** *Sepsis and antithrombin III, prekallikrein and fibronectin levels in surgical patients*, American of Surgery, 121, 635-40.
- Wu D, Koga T, Martin KR and Meydani M (1999)** *Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes*, Atherosclerosis, 147,297-307.
- Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T and Nawata H (1989)** *Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells*, Biochem Biophys Res Commun, 163,1404-1411.
- Yamazaki M, Aoshima K, Mizutani T, Ontachi Y, Saito M, Morishita E, Asakura H, Matsuda T and Triplett DA (1999)** *Prednisolone inhibits endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and improves mortality in rats: Importance of inflammatory cytokine suppression*, Blood Coag Fibrinol, 10, 321-330.
- Yılmaz B (1999)** *Glikokortikoidler "Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi"*, 210-228, Feryal mabaacılık, Ankara.
- Yılmaz B (2000)** *Kan "Fizyoloji"*. 116-135, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- Yoshikawa T, Furukawa Y, Murakami M, Watanabe K and Kondo M (1982)** *Effects of vitamin E on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats*, Thromb Haemostas 48, 235-237.
- Yoshikawa T, Murakami M, Yoshida N, Seto O and Kondo M (1983)** *Effects of superoxide dismutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats*, Thromb Haemostasis, 50, 869-872.
- Yoshikawa T, Murakami M and Kondo M (1984)** *Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in vitamin E deficient rats*, Toxicology and Applied Pharmacology, 74, 173-179.
- Yoshikawa T, Murakami Mi Furukawa Y and Kondo M (1986)** *Effects of prostaglandin I₂ and thromboxan A₂ synthetase inhibitor on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats*. J Clin Biochem Nutr, 1, 31-37.

Yoshikawa T, Takeda S, Naito Y and Kondo M (1990) *Protective effects of ono-3307, a new synthetic protease inhibitor against experimental disseminated intravascular coagulation in rats*, *Thrombosis Research*, 60, 1-7.

Young KL and Linch DC (1993) *Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor differentially regulates neutrophil migration across IL-1-activated and non-activated endothelium*, *J Immunol*, 150, 2449-2456.

Zimmerman GA, Prescott SM and McIntyre TM (1992) *Endothelial cell interactions with granulocytes: Tethering and signaling molecules*, *Immunol Today*, 13, 93-100.



9. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Ortaköy’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı ilçede tamamladıktan sonra 1992 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ne kayıt yaptırdı ve 1997 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Şubat 1998’de Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde Doktora eğitimine başladı. Halen aynı Üniversite kadrosunda bulunmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.



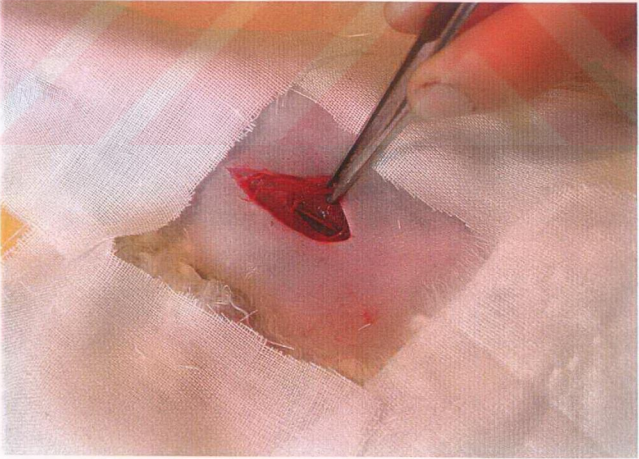
10. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Zafer DURGUN'a, çalışma süresince maddi ve manevi desteklerini gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Ercan KESKİN ve Prof. Dr. Tufan KEÇECİ'ye, Fizyoloji Anabilim Dalı Arş.Gör. Banu ATALAY'a, değerli katkılarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Enver YAZAR'a ve projeme maddi destek sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.





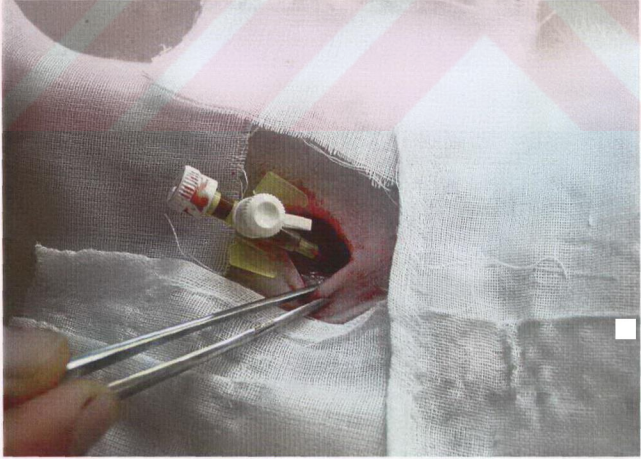
Resim 1: Kulak venine intraket uygulaması.



Resim 2: Diseksiyon sonrasında femoral arterin görünümü.



Resim 3: Anestezi altındaki tavşanda disekte edilen femoral arter bölgesinin görünümü.



Resim 4: Femoral artere intraket uygulaması.