

**T.C.**  
**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı**

**SEPSİSTE LEVOSİMENDANIN HEPATİK KAN AKIMI,  
İNFLAMASYON VE MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYONA  
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. İsmail ÇETİN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Melek ÇİVİ**

**MANİSA 2008**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yardımlarını ve her türlü desteğini esirgemeyen Anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Melek ÇİVİ'YE, tezimin hazırlanmasında yardımları olan Doç. Dr. H. Seda VATANSEVER, Doç. Dr. İ. Şebnem ÖRGÜÇ, Doç. Dr. Ece ONUR'A ve Dr. A. Eda BAYRAM'A, mesleğimi öğrenme ve geliştirme safhalarında emekleri olan anabilim dalımızdaki öğretim üyelerine, asistanlık eğitimim esnasında beraber çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma, beraber çalıştığımız anestezi teknisyeni, hemşire ve personellere, sevgilerini ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim eşime, çocuklarıma, bugünlere gelmemde katkısı olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. İsmail ÇETİN**

## İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
III. GEREÇ VE YÖNTEM	19
IV. BULGULAR	27
V. TARTIŞMA	43
VI. SONUÇ	54
VII. ÖZET	55
VIII. SUMMARY	57
IX. KAYNAKLAR	59

## I. GİRİŞ

Sepsis, bir çok sistemi etkileyen, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden klinik bir tablodur. Etyopatogenezinde ve tedavisinde kaydedilen çok önemli gelişmelere rağmen en iyi merkezlerde bile sepsis yüksek mortalite oranlarına sahiptir. Erken sepsisin hemodinamik görünümü sistemik oksijen tüketiminde artma ve bozulmuş oksijen kullanımının eşlik ettiği hipovolemi, vazoregülatuar disfonksiyon ve myokard depresyonunu içerir. Hemodinamik değişiklikler global doku hipoksisini oluşturmaya katkıda bulunur (1,2).

Sepsisli hastaların %10-15'inde yaştan bağımsız olarak myokard depresyonu gözlenir (3). Yeterli sıvı replasmanı kardiyak indekste genellikle % 25-40 oranında iyileşme sağlar ve septik hastaların yaklaşık % 50'sinde sadece sıvı tedavisi ile hipotansiyon düzelmekte ve hemodinamik stabilite sağlanmaktadır (4,5). Yeterli sıvı replasmanına rağmen hemodinamik bozukluğu devam eden veya doku hipoperfüzyonu olan hastalarda inotropik ajanlar verilmelidir.  $\beta$  adrenerjik inotrop destekle, myokard depresyonunu düzelterebilir, ancak kontraktileti ve periferik vasküler direnci artırıcı etkisi nedeniyle altta yatan hipovolemiyi maskeleyebilir. Ayrıca oluşturabilecekleri taşikardi nedeniyle oksijen tüketimi üzerine olumsuz etkileri de gözden kaçırılmamalıdır.

Levosimendan akut ve kronik kalp yetmezliğinde kullanılan, myokardın kalsiyum duyarlılığını artıran ve vazodilatör etkiye sahip bir inotropik ajandır. Daha önce yapılan deneysel septik şok modelinde levosimendanın sistemik ve intestinal oksijen dağılımında ve kardiyak output'da iyileşme sağladığı bildirilmiştir (6).

Sepsisin erken dönemlerinde karaciğer kan akımının anlamlı olarak azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (7,8). Karaciğer kan akımındaki

bu azalma hepatosit ve kuffer hücre hasarına ve proinflamatuvar mediatörlerin lokal ve sistemik salınımına neden olmaktadır (8).

Levosimendanın dekompanze kalp yetmezlikli hastalarda proinflamatuvar sitokinlerin serum seviyelerini azalttığı ve apoptozise gidişini baskıladığı gösterilmiştir (9).

Bu çalışmada deneysel sepsis modelinde levosimendanın, karaciğer kan akımı, karaciğer dokusunda inflamatuvar sitokin düzeyi, mitokondriyal disfonksiyona etkisi ve apoptozis ile apoptotik yollara etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## **II.GENEL BİLGİLER**

### **II.1.Sepsis**

Sepsis, enfeksiyona karşı konağın sistemik bir yanıtı olarak gelişen kompleks bir klinik tablodur (10). Son yıllarda patofizyolojisi daha iyi aydınlanmasına; uygun antibiyotik kullanımı, hemodinamik ve ventilatör desteği içeren yoğun bakım tedavilerine rağmen, sepsis özellikle şok ve çoklu organ yetersizliği ile komplike olduğunda yüksek mortaliteye sahip bir tablodur (11-13).

#### **II.1.1. Sepsisle ilgili tanımlar**

Sepsis ile ilgili durumların klinikte ifadesinde; bakteriyemi, sepsis, sepsis sendromu, septisemi, septik şok gibi farklı terimler kullanılmıştır. Sepsisin tanımında farklı terimlerin kullanılması, araştırma ve tedavi protokollerinin karşılaştırılması ve sonuçların yorumlanmasında karışıklıklara neden olmuştur. Bu nedenle "American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine" 1992 yılında yaptıkları ortak toplantıda, sepsis ile ilgili tanımları gözden geçirerek yeniden belirlemişlerdir. Bu uzlaşma toplantısında kabul edilen tanımlamalar aşağıdaki şekildedir (14);

#### **II.1.2. Enfeksiyon**

Mikroorganizmaların, normalde steril olan konak dokularında bulunması veya invazyonu sonucu gelişen inflamatuvar yanıtıdır.

#### **II.1.3. Bakteriyemi**

Canlı bakterinin kan dolaşımında bulunmasıdır. Bakteriyemi tanısı kan kültürü pozitifliği ile konur.

#### **II.1.4. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS)**

Değişik ağır klinik durumlara inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan (yanık, travma, pankreatit, hemoraji, iskemi, immünolojik doku zedelenmesi gibi) nedenlere bağlı gelişebilir ve aşağıdaki durumların iki veya daha fazlasının bulunması ile tanı konur;

1. Vücut ısısı  $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$  yada  $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
2. Kalp hızı  $>90$  atım/dk,
3. Solunum sayısı  $>20$ /dk ya da  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg,
4. Beyaz küre sayısı  $>12.000/\text{mm}^3$ ,  $<4000/\text{mm}^3$  ya da kanda  $>10\%$  immatür lökosit olması.

#### **II.1.5. Sepsis**

Enfeksiyona verilen sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanır. Enfeksiyon sonucu SIRS bulgularının iki veya daha fazlasının bulunmasıdır.

#### **II.1.6. Ağır Sepsis**

Sepsis ile birlikte organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun bulunması durumudur. Hipoperfüzyon ve perfüzyon bozukluğunda, laktik asidoz, oligüri veya mental durumda akut değişiklik bulunabilir.

#### **II.1.7. Septik Şok**

Sepsiste, yeterli sıvı tedavisine rağmen, hipotansiyon ile birlikte perfüzyon bozukluğu belirtilerinin (laktik asidoz, oligüri, akut mental değişiklik) devam etmesi durumudur. İnotropik veya vazopressör ilaç alanlarda hipotansiyon olmaksızın perfüzyon bozukluğu olabilir. Bu hastalar da septik şokta kabul edilmelidir.

#### **II.1.8. Sepsise Bağlı Hipotansiyon**

Sistolik kan basıncının  $90\text{ mmHg}$ 'nin altına düşmesi veya diğer nedenler olmaksızın, bilinen sistolik kan basıncının  $40\text{ mmHg}$ ' den daha fazla düşmesi olarak tanımlanır.

### **II.1.9. Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu (Multiple organ dysfunction syndrome-MODS)**

Akut hastalık tablosu içinde olan hastada organ fonksiyon bozukluklarının bulunmasıdır. Bu klinik tabloda tedavisiz homeostaz sağlanamaz.

## **II.2 Epidemiyoloji**

Sepsis, septik şok ve organ yetmezliği gibi sepsis ile ilgili klinik tabloların gerçek insidansını vermek ülkemiz için olduğu gibi diğer ülkeler için de zordur. Sepsis, Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm ölüm sebepleri arasında 10. ve koroner yoğun bakım dışındaki yoğun bakımlarda yatan hastalar arasında 2. sırada ölüm sebebidir (15,16).

ABD'de 1979 yılından 2000 yılına kadar yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, 10.319.418 sepsis vakası izlendiği ve bunun da hastaneye yatan hastaların %1.3'ünü oluşturduğu bildirilmiştir (17). Yine aynı çalışmada sepsis insidansında 22 yılda yıllık % 8,7 'lik artış olduğu gösterilmiştir. Bu artmış insidansın nedenleri, invaziv araç ve girişimlerin artması, immünoşpresif ilaçlar, kemoterapi, transplantasyon, HIV (Human Immunodeficiency Virus) enfeksiyonunda epidemik artış ve mikrobiyal dirençte artıştır (16).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda yoğun bakım ünitelerinde sepsis insidansının %7.6-15.8 arasında olduğu bildirilmiştir (18-20).

## **II.3 Etiyoloji**

Sepsiste başlıca kaynak solunum sistemi enfeksiyonlarıdır. Bunu intraabdominal ve cerrahi saha enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları takip eder (21,22). Sepsis etiolojisinden bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler olarak pek çok farklı mikroorganizma sorumlu olabilmektedir. En sık etken bakterilerdir. Toplumdan kazanılmış sepsis olgularında en sık etkenler *E. coli* (%25), *S. Pneumonia* (%16) ve *S. aureus'tur* (%14) (23). Nozokomiyal sepsiste ise antibiyotikler kullanım alanına girmeden önce en sık etken streptokoklar ve stafilokoklar iken; antibiyotik kullanım döneminde



gram negatif bakteriler gittikçe artan oranlarda sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır (23-25). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise Gram (+) bakteri sepsislerinde artış dikkati çekmektedir (26).

Vincent ve ark.'nın (21) 2006 yılında yayınladıkları 23 Avrupa ülkesini kapsayan çalışmada; sepsisteki hastaların % 60'ında kültür pozitifliği saptanmıştır. Hastaların % 40'ında gram (+) organizma, % 38'inde gram (-) organizma, % 17'inde mantar ve % 18'in de ise karışık üreme tespit edilmiştir.

#### **II.4 Patofizyoloji**

Sepsis patogenezindeki yeni gelişmeler, tanı ve tedavideki yenilikleri de beraberinde getirmektedir. Üzerinde en fazla yoğunlaşılan gram (-) bakteri sepsisidir. Gram (-) bakterilerin hücre duvarını içte peptidoglikan tabaka, dışta lipopolisakkaritler, proteinler ve fosfolipitler oluşturur. Lipopolisakkarit tabakada yer alan endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece inaktiftir. Hücrenin hızla büyümesi veya hücre yıkımı sırasında açığa çıkan endotoksin ve bu molekülün en iç kısmında yer alan lipid A maddesi, sepsisteki olaylar dizisini başlatan anahtar moleküllerdir (27,28). Bunun yanında toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1), pirojenik ekzotoksin A, Gram (+) bakteri veya mantar hücre duvarı yapıları, viral ve mantar antijenleri sepsis kaskatını başlatabilir (29-31).

Sepsis fizyopatolojisi oldukça karmaşıktır. Mikroorganizmaların hücresel yapıları ve toksinleri, dolaşımdaki mononükleer fagositleri, endotel hücrelerini ve diğer farklı bir çok hücreyi uyararak güçlü mediatörlerin salınmasına neden olurlar. Bunların en önemlileri; tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 (IL-1), interlökin-2 (IL-2), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve trombosit aktive edici faktör'dür (PAF) (29-38). Mediatörlerin salınımını takiben koagülasyon sistemi, kompleman sistemi, fibrinolizis ve kinin sistemi aktive olur (29,36-38).

Sepsiste araşidonik asit metabolitleri de önemli rol oynar. Siklooksijenaz yoluyla prostoglandinler ve tromboksan A<sub>2</sub>, lipooksijenaz yoluyla ise lökotrienler açığa çıkar. Endotoksin ve TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi

mediatörler araşidonic asit metabolitlerinin açığa çıkmasını ve sentezini aktive eder. Tromboksan A2 kuvvetli vazokonstrüktör ve prostoglandinler ise vazodilatör etkiye sahiptir. Araşidonic asit metabolitleri, ateş, taşikardi, takipne, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu ve laktik asidoz oluşumunda rol alırlar (39).

Enfeksiyona sistemik yanıt bu salınan mediatörler tarafından oluşturulur. Bu mediatörlerin bir kısmı proinflamatuvar (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8) ve bir kısmı ise antiinflamatuvar (IL-4, IL-10) özelliğe sahiptir. Sepsis patogenezinde rol oynadığı bilinen proinflamatuvar, antiinflamatuvar sitokinler ve diğer moleküller Tablo-1'de görülmektedir. Normalde sitokin yanıtı belli bir düzen içerisinde düzenlenir. Bu düzenin bozulmasını proinflamatuvar reaksiyon (SIRS) veya kompensatuvar antiinflamatuvar reaksiyon takip eder. Bu reaksiyonların sonucu olarak ta sepsis klinik tablosu ortaya çıkar (40).

#### **II.4.1. Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  inflamasyonun primer mediatörüdür ve çok sayıda enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz inflamatuvar hastalıkta salınır (41). TNF- $\alpha$  primer olarak LPS'nin uyardığı mononükleer fagositlerden üretilir. TNF- $\alpha$  infüzyonu hayvanlarda karakteristik septik semptomlara neden olur (42-45). Bakteriyel endotoksin ile oluşturulan insan ve hayvan sepsis modellerinde, TNF- $\alpha$  hızla aktive olmakta ve plazmada tespit edilmektedir. Michie ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; sağlıklı gönüllülerde *Escherichia coli* endotoksini infüzyonu sonrası TNF- $\alpha$  konsantrasyonunun anlamlı olarak arttığı ve 1 saat sonra pik yaptığı gösterilmiştir (46). Daha sonra yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve TNF- $\alpha$ 'nın endotoksin infüzyonundan 60-90 dakika sonra pik yaptığı gözlenmiştir (47-49).

TNF- $\alpha$  sitokin kaskadın aktivasyonunda ve inflamatuvar yanıtın koordinasyonunda önemli rolü vardır. İn vitro olarak TNF- $\alpha$  diğer sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) güçlü indükleyicisidir. Endotoksin enjekte edilen çeşitli deney hayvanlarında, anti TNF- $\alpha$  antikoları ile tedavi sonrası IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 üretiminde azalma olmuştur. Buna ilaveten morbitite ve mortalite de azalmıştır (50-53).

**Tablo-1: Sepsiste inflamatuvar mediatörler**

<b>Konak hücre</b>	<b>Proinflamatuvar Mediatörler</b>	<b>Düzenleyici Mediatörler</b>	<b>Anti-inflamatuvar Mediatörler</b>
Monosit/makrofaj	TNF- $\alpha$ ,IL-1,IL-8, IFN- $\gamma$ , doku faktörü, prostonoidler, lökotrienler, PAF, NO	IL-6 IL-12	IL-1Ra sTNFr TGF- $\beta$
Nötrofiller	İntegrin ekspresyonu, süperoksit, TNF- $\alpha$ , IL-1		BPI, defensinler, asikloksiasilhidrolaz
Lenfositler	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	IL-12	IL-4, IL-10, sIL-2r
Endotel hücresi	selektin,VCAM, ICAM, NO, doku faktörü		
Trombositler	serotonin, prostonoidler	PDGF	
Plazma Komponentleri	koagülasyon kaskadı, kompleman aktivasyonu, bradikinin	CRP, LBP	

BPI, bakteriyel/permeabilite artırıcı protein; CRP, C-reaktif protein; ICAM, hücre içi adezyon molekülü; IFN- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; IL-1Ra, interlökin-1 reseptör antagonisti; LBP, lipopolisakkarid bağlayan protein; NO, nitrik oksit; PAF, trombosit aktive eden faktör; PDGF, trombositten açığa çıkan büyüme faktörü; sIL-2r, solubl IL-2 reseptör; sTNFr, solubl TNF reseptör; TGF- $\beta$ , transforming büyüme faktörü; TNF, tümör nekroz faktörü; VCAM, damar hücre adezyon molekülü.

#### **II.4.2. İnterlökin-6 (IL-6)**

IL-6 aktive T ve B hücreleri, monositler, endotel hücreleri, epitel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, hepatositler, nöroglial hücreler gibi çok değişik hücreler tarafından üretilen glikoprotein yapısında bir sitokindir. IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , interferonlar, platelet-derived growth faktör, IL-6 sentezini artırırken; IL-4, IL-10, IL-13 inhibe eder (54). IL-6'nın çeşitli biyolojik etkileri vardır. Bunlardan bazıları; B ve T lenfosit aktivasyonu, karaciğerde akut faz protein üretiminin artırılması ve hematopoezin modülasyonudur (55). Ayrıca IL-6 koagülasyon sistemini ve hipotalamik ateş merkezini uyararak endojen olarak aktive eder (45,56).

Deneyisel olarak bakteri veya endotoksin enjeksiyonundan sonra plazmada IL-6 saptanmaktadır. IL-6'nın pik konsantrasyonu, TNF- $\alpha$  ve IL-1'in pik konsantrasyonundan sonra olmaktadır. Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada TNF- $\alpha$ 'nın 1,5-2 saat, IL-6'nın 4 saat sonra pik konsantrasyona ulaştığı görülmüştür. IL-6 düzeyleri ile sepsise bağlı mortalite ve morbidite arasında direkt bir korelasyon vardır. Sepsiste, IL-6 yüksekliğinin kötü bir prognoz kriteri olduğu kabul edilmektedir (57).

Sepsisli hastalarda IL-6 düzeyleri yüksek olarak saptanmıştır. IL-6'nın intravenöz verilmesi herhangi bir hemodinamik değişikliğe, sistemik organ yetmezliğine ve sepsise neden olmamıştır. IL-6, sepsis ve endotoksemide inflamatuvar yanıtın ayrılmaz bir parçasıdır ve önceden üretilmiş IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'ya karşı yanıt olarak salgılanarak bunların üretimini azalttığı düşünülmektedir (58).

IL-6, sepsiste diğer sitokinlerden daha sık ve yaygın olarak rol almaktadır. Plazma IL-6 düzeyi sitokinlerin aktivasyonunda marker olarak kullanılabilir. Konakçı inflamatuvar yanıtı ve hastalığın yaygınlığı ile korelasyon gösterir. Yapılan bir çok klinik çalışma bunu destekler niteliktedir (57,59). Plazma IL-6 konsantrasyonu, sepsis ve sitokinlerin aktivasyonunda iyi bir indikatördür (57).

#### **II.4.3. İnterlökin-10 (IL-10)**

IL-10, T<sub>H</sub>2 lenfositler, monositler ve epitelyal hücreler tarafından üretilen güçlü antiinflamatuvar bir sitokindir ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmaktadır. IL-10 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, granulosit-makrofaj koloni-stimulating faktör (GM-CSF), granulosit koloni-stimulating faktör (G-CSF) üretimini baskılamaktadır. Endojen olarak üretilen IL-10, sepsiste konak savunmasında önemli rol almaktadır. Antijen spesifik T hücre aktivasyonunu önlemekte ve T hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca polimorfonükleer lökositler ve aktive monositler tarafından IL-1 reseptör antagonistinin saliverilmesini güçlendirmektedir (60).

Marchant ve ark. (61) gram negatif ve gram pozitif sepsisli hastalarda yaptıkları çalışmada IL-10'un salgılandığını fakat konsantrasyonunun 12-2400 pg/ml arasında değişebildiğini ileri sürmüşlerdir.

Endotoksemi ve sepsiste, IL-10 uygulamasının, TNF- $\alpha$  salınımını ve mortaliteyi azaltarak prognoz açısından pozitif etkilere sahip olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Anti IL-10 uygulanan farelerde ise TNF- $\alpha$  salınımının ve mortalitenin arttığı gözlenmiştir. Hücresel immünitenin inhibisyonunu gerektiren durumlarda tedavi amaçlı kullanılabilir (60).

#### **II.4 4. Apoptozis**

Apoptozis (Programlanmış hücre ölümü) terimi, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan "hücre intiharı" programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (62). Apoptozis, yaşlı veya disfonksiyonel hücrelerin normal eliminasyonunda başlıca mekanizmadır. Ek olarak apoptozis yoluyla hücre ölümü, enfeksiyonun kontrol altına alınması durumunda inflamatuvar olayların sonlandırılmasını sağlayan önemli bir mekanizmadır. Bununla birlikte proinflamatuvar sitokinler, aktive makrofaj ve nötrofillerdeki apoptozisi geciktirebilir. Bu etki sonucu inflamatuvar yanıt uzar yada büyüme göstererek çoklu organ yetmezliğine katkıda bulunabilir.

Apoptotik hücre ölümündeki düzensizliklerin aynı zamanda sepsisteki doku zedelenmesinde de kritik rol oynadığına inanılmaktadır. Apoptozis, intestinal epitel hücreleri gibi hızlı proliferasyon olan hücre popülasyonlarını selektif olarak sınırlayan normal bir fizyolojik mekanizmadır. Endotoksin, sitokinler ve reaktif oksijen türleri gibi çeşitli inflamatuvar mediatörler ile temas eden parenkimal ve endotelial hücreler stres gen ekspresyonu yaparak, hızlandırılmış apoptozis ile yok edilirler.

Apoptozis, aktif enerji gerektiren bir süreçtir. Apoptozis sırasında çeşitli genlerin kodladığı bazı proteinler hücre içinde aktif veya inaktif hale gelirler (63,64). Bugüne kadar saptanmış en az 30 protein ve bir o kadar da

apoptoziste olası rolü düşünölen protein vardır. Bu proteinlerden en bilinenleri Tablo-2'de gösterilmiştir. Apoptozis Bcl-2 grubu dimerize proteinler tarafından kontrol edilir. Bcl-2 geni, bir proto-onkogendir. Bazı antiapoptotik (bcl-2, bcl-xl...) ve pro-apoptotik (bax, bad...) proteinler bu grupta yer almaktadır.

**Tablo-2: Apoptoziste rolü olan proteinler**

<b>Artıranlar</b>	<b>Azaltanlar</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FAS (CD-95)</li> <li>▪ p53</li> <li>▪ Nurr77</li> <li>▪ Glikokortikoid reseptör</li> <li>▪ C-myc</li> <li>▪ İnterlökin konverting enzim</li> <li>▪ (İCE ve benzerleri)</li> <li>▪ Bcl-2 ile ilişkili proteinler</li> <li>▪ (Bad, Bax, Bak, Bcl-xs)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bcl-2 ile ilişkili proteinler</li> <li>▪ (BHRF-1, bcl-xs)</li> <li>▪ Soluble fas</li> <li>▪ Ras</li> <li>▪ Crm-A</li> <li>▪ p53</li> </ul>

Apoptozun regölasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır (65,66). Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 gibi apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır (67). Proapoptotik genler: Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi) olmak üzere iki alt aileye sahiptir (68). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer yada heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (65,69). Örneğin; Bcl-2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (70).

Son yıllardaki, hücrenin yaşamı yada ölümü konusundaki araştırmalar dikkatleri mitokondri üzerinde toplamıştır (71). Mitokondriiler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir protoonkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir. Bu proteinler, iyon alış verişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu

etki yaparlar. Özellikle antiapoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL'in mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptoz inhibisyonu gerçekleşmektedir (68). Bcl-2 ailesinin bir diğer ilginç özelliği de reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini prooksidan gibi davranarak kontrol etmesidir (71). Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının "permeabilite geçiş poru" na doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF, doğrudan kromatin kondansasyonunun ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom-C apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom-C, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'in aktivatörüdür. Sitokrom-C'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptosom" olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (65). Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır (69).

## **II.5. Sepsis Tedavisinde Kullanılan Vazoaktif İlaçlar**

### **II.5.1. Dopamin**

Dopamin, epinefrin ve norepinefrinin doğal prekürsörüdür, alfa, beta ve dopa reseptörlere doza bağlı olarak çeşitli farmakolojik etkileri vardır. Septik şokta vazopressör olarak seçilecek ilk ilaç olarak önerilmektedir (72). 5 µg/kg/dk'nın altındaki dozlarda dopaminerjik reseptörler (DA1,DA2) aracılığı ile renal, mezenterik ve koroner damarlarda vazodilatasyona neden olur (73,74). 5 -10 µg/kg/dk'lık dozlarda β<sub>1</sub> adrenerjik etkisi ön plana çıkarak kardiyak kontraktilite ve kalp hızında artışa neden olur. 10 µg/kg/dk'nın üzerindeki dozlarda α<sub>1</sub> adrenerjik etki ile arteriyel vazokonstriksiyona ve kan basıncında artışa neden olur.

Dopaminin 5 µg/kg/dk'nın altındaki dozlarda dopaminerjik etki ile renal kan akımını koruduğuna inanılmaktaydı. Fakat Bellomo ve ark. tarafından Avustralya'da yapılan randomize, çift-kör çalışmada; septik şoktaki hastalarda dopaminin renal yetmezlikten korumadığı gösterilmiştir (75). Daha sonra 2001 yılında yayınlanan bir metaanalizde bu çalışmayla benzer şekilde renal dozda dopaminin mortalite, akut renal yetmezlik ve diyalizden korumadığı bildirilmiştir (76). 2008 yılında yayınlanan kılavuzda renal koruma için düşük doz dopamin önerilmemektedir (77).

Dopamin pulmoner şanti, akciğerin az havalanan bölgelerindeki kan damarlarını, kardiyak outputtaki artışa bağlı olarak açarak artırmaktadır. Ancak PaO<sub>2</sub> relatif olarak sabit kalmaktadır. Bunun nedeni miks venöz oksijen saturasyonunda artış ve/veya hemodinamik iyileşme olabilir.

Dopaminin oksijen alımında artışa yol açtığı gösterilmiştir, ancak dopaminin hesaplanan veya ölçülen oksijen tüketimi üzerindeki etkileri karışıktır. Oksijen atılım oranı, doku oksijenasyonunda iyileşme olmadığını düşündürecek şekilde tipik olarak azalır (78-80). Bu durum vital organlardaki mikrosirkülatur akımın iyileşmesindeki bozulmaya veya bazı hastalarda anlamlı doku oksijen ihtiyacının eksikliğine bağlı olabilir (80).

Dopamin, sepsiste yeterli sıvı tedavisine rağmen hipotansif kalan hastalarda, ortalama arteriyel basıncını % 24 artırmaktadır. Dopamin ortalama arteriyel basıncı ve kardiyak output'u öncelikle stroke volümde artışa ve daha az olarak kalp hızında artışa bağlı olarak artırır (78). Santral venöz basıncı, pulmoner kapiller tıkanma basıncı, sistemik vasküler rezistans indeksi ve pulmoner arter rezistans indeksinde değişiklik yapmaz. 20 µg/kg/dk'nın üstündeki infüzyonlarda dopamin sağ kalp basıncını artırır (81).

Özet olarak dopamin yeterli sıvı tedavisi sonrası hipotansif kalan hastalarda da ortalama arteriyel basıncı etkin olarak artırır. Diğer vazopresör ilaçlara göre taşikardi ve aritmojenik etki dopaminin istenmeyen etkileridir. Diğer yan etkileri; pulmoner şantta artma, prolaktin salgılanmasında azalma ve immünosupresyondur.



### **II.5.2. Norepinefrin**

Norepinefrin hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  adrenerjik etkiye sahiptir. Düşük dozlarda beta adrenerjik etki ile kan basıncı ve atım hacmini artırır. Daha yüksek dozlarda primer olarak alfa adrenerjik etki ile sistemik vasküler direnci artırarak kan basıncını artırır. Norepinefrin kardiyak outputta %10-20 ve atım hacminde %10-15 artış sağlar (82). Norepinefrin pulmoner arter tıkanma basıncını çok az artırır (1–3 mm Hg) veya hiç değişiklik yapmaz.

Norepinefrin septik şoka bağlı hipotansiyonun tedavisinde dopaminden daha etkilidir. Bazı çalışmalarda sıvı tedavisi ve dopamin infüzyonu sonrası hipotansiyonu devam eden hastalarda norepinefrinin ortalama arteriyel basıncı artırdığı gösterilmiştir (83). İnfüzyon dozları 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dk}$ 'dan başlar ve 3,3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dk}$ 'ya kadar çıkılabilir.

Norepinefrin, efferent renal arterde afferent renal artere göre daha fazla vazokonstrüksiyon yaparak filtrasyon fraksiyonunda artışa neden olur. Septik şoktaki hastalarda norepinefrinin tek başına veya dobutamine ek olarak verildiğinde kreatinin klirensini ve idrar çıkışını artırır.

### **II.5.3. Dobutamin**

Dobutamin,  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  adrenerjik etkilere sahip sentetik bir katekolamindir. Dopamine göre daha az yan etkileri vardır. 5-15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dk}$  dozunda infüzyon ile verilebilir. Etkisi 1-2 dakika içinde başlar ve en yüksek etkiye 10 dk sonra ulaşılır. Uzun süre uygulandıktan sonra, muhtemelen reseptör down-regülasyonuna bağlı olarak hemodinamik etkilerini kaybetmeye yatkındır. Bununla birlikte, dobutamin, uzun süreli infüzyon için myokardiyal norepinefrin depolarını tüketen dopaminden daha iyi bir seçenektir. Kalp debisini artırması nedeniyle, dobutamin uygulaması ile idrar çıkış artışı sağlanabilir (84).

Dobutaminin septik şok tedavisinde vazopressörler ile koadjuvan rolü vardır ve bu tedavi ile miks venöz oksijen saturasyonu ve kardiyak indekste iyileşme sağlanabilir. Dobutaminin inotropik etkilerinin yanında göreceli olarak daha az kronotropik etkileri vardır ve bu sayede septik kalbin sistolik performansında iyileşme sağlayabilir. Ancak orantısız olarak kalp hızı artışı

sistemik vazodilatasyona neden olarak hipotansiyonda ağırlaşmaya neden olabilir. Dobutamin sepsiste pulmoner vasküler rezistansı azaltır ve kardiyak indekste iyileşme sağlar. Bu etkiler sonucu sağ kalp kontraktilesini ve splanknik kan akımını artırır (84,85).

#### **II.5.4. Epinefrin**

Epinefrin, sıvı tedavisine ve diğer vazopressör infüzyonuna yanıt vermeyen hastalarda ortalama arteriyel kan basıncını artırabilir bunu da öncelikle kalp hızı ve sistemik vasküler dirençte ılımlı artış ile atım hacmi ve kardiyak indeksi artırılarak sağlar. Sağ ventrikül yetmezlikli hastalarda epinefrin kontraktileyi iyileştirerek sağ ventrikül fonksiyonunu artırır. Epinefrin, oksijen alınımını artırır fakat oksijen tüketimini de artırabilir (86).

Epinefrin arteriyel, splanknik ve hepatik venöz laktat konsantrasyonunda geçici artma, PCO<sub>2</sub> açığında artma ve pH'da azalma ile birlikte splanknik kan akımını azaltır. Bu etkiler sonuçta splanknik oksijen alınımında azalmaya neden olabilir (87).

#### **II.5.5. Vazopressin**

Vazopressin, komplike kardiyovasküler etkileri olan ve V1 reseptörlerine etki eden kuvvetli vazokonstriktör bir hormondur. Vazopressin invitro belirgin vazopressör etki gösterir, bu etki invivo olarak minimaldir ve yüksek konsantrasyon gerektirir. Bu etki dolaşımdaki endojen vazopressinin barorefleksleri potansiyasyonu ve sempatik efferentlerin inhibisyonuyla meydana gelebilir (88).

Normalde endojen vazopressin düzeyleri çok düşüktür, normal bir bireyde esas olarak vazokonstriktör etkisi yoktur. Ancak septik şokun başlangıcında vazopressin düzeyleri çok artar. Uzamış septik şokta göreceli olarak vazopressin eksikliği gelişir (89). Ekzojen olarak vazopressin verilmesi dramatik olarak hemodinamik tabloyu değiştirir, hızla kan basıncı yükselir. Vazopressin, diğer vazoaktif ajanların etkilerini potansiyalize eder. Vazopressin uygulanması, septik şokta yüksek doz vazoaktif ajan kullanıldığı halde yanıt alınamayan hastalarda önerilmektedir. Uygulanacak doz fizyolojik

sınırdadır (0.01-0.04 U/dk) dozda olmalıdır; yüksek dozları ciddi ve zararlı vazokonstriksiyona neden olur. Vazopressin, bilinen koroner arter hastalığı varlığında güvenli değildir (88).

### **II.5.6. Levosimendan**

Levosimendan, pyridazinone-dinitrile derivativesi, myokardın kalsiyum duyarlılığını artıran ve vazodilatör etkiye sahip yeni bir inotropik ajandır. İlaç doza bağımlı olarak kardiyak indeks ve atım hacminde artışa ve yine doza bağımlı olarak pulmoner kapiller tıkanma basıncı ve pulmoner arteriyel basınçta azalmaya neden olur (90,91). Levosimendan, kardiyak troponin C'nin N terminal bölgesine selektif olarak bağlanır, böylece kontraktıl proteinlerin kalsiyuma olan duyarlılığını artırır. Bu etki kalsiyum konsantrasyonuna bağımlıdır. Sitolitik kalsiyum sistolde daha fazla olduğu için, miyofilamanların üzerine olan etkisi sistolde daha belirgindir; böylece, düşük enerji tüketimi ile kontraktilite iyileşir. Buna karşın, kalsiyum konsantrasyonu ve sensitizasyonu diyastolde azaldığı için diyastolik relaksasyonun etkilenmediği yada iyileştiği ileri sürülmüştür (92,93).

Levosimendanın pozitif inotropik etkilerine ek olarak myosit ve vasküler düz kas hücrelerinde ATP bağımlı potasyum kanallarını açarak sistemik vasküler yatakta vazodilatasyona yol açtığı gösterilmiştir (94). Sonuçta levosimendanın miyokardiyal preload ve afterloada azalmaya neden olduğu, koroner arterlerde de vazodilatasyona neden olarak myokard kan akımını artırdığı, buna karşın myokardın oksijen tüketimini artırmadığı bildirilmiştir (95). Ayrıca Pataricza ve ark. (96) tarafından yapılan bir çalışmada, levosimendanın izole insan portal veninde ATP bağımlı potasyum kanallarını açarak vazodilatasyon yaptığı da gösterilmiştir.

Proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-6) salınması, kronik kalp yetmezlikli hastalarda apoptozda artışa ve olumsuz inotrop etkilere neden olur (97). Bu sitokinlerin salınımının azalması kalp yetmezlikli hastalarda ventrikül fonksiyonunda ve hastanın klinik durumunda iyileşme sağladığı gösterilmiştir (98,99). Bazı çalışmalarda levosimendanın inotropik ve vazodilatör etkilerinin yanında anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkilerinin

olduğu ve bu etkilerini de dolaşımda bulunan proinflamatuvar sitokinler (TNF- $\alpha$ , İL-6) ve apoptoz mediatörlerinin (Fas-fas ligand) salınımını azaltarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir (100-102).

Septik şokta levosimendanın olumlu etkilerinin olabileceği ilk olarak Oldner ve ark. (6) tarafından ileri sürülmüştür. Yaptıkları çalışmada levosimendanın, sistemik ve intestinal oksijen sunumunda iyileşme, kardiyak indekste ve atım hacminde artış sağladığını, ayrıca OAB (ortalama arteriyel basıncı) ve sistemik vasküler dirençte azalma, portal kan akımında deney grubunda artış olduğunu göstermişlerdir.

Levosimendanın septik şokta klinik ilk kullanımını Matejovic ve ark. (103) tarafından 2005 yılında yayınlanan olgu sunumunda bildirilmiştir. Daha sonra çok az olgu sunumu ve küçük vaka serilerinde, septik şoktaki hastalarda oksijen transportunda ve hemodinamik parametrelerde iyileşme sağladığı rapor edilmiştir (104,105).

Septik çoklu hastalarda levosimendanın etkilerini araştıran ilk randomize kontrollü klinik alışma Morelli ve ark.'nın (106) yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmaya standart tedavinin (sıvı replasmanı, norepinefrin ve dobutamin) 48 saat uygulanmasından sonra sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun % 45'in altında kalan septik çoklu 28 hasta dahil edilmiştir. Hastalar 48 saat standart tedavi sonrası randomize olarak 2 gruba ayrılmışlar; 1. gruba 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dk}$ 'dan levosimendan, 2. gruba ise 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dk}$ 'dan dobutamin infüzyonu 24 saat verilmiş. OAB 70-80 mmHg olacak şekilde gerektiğinde norepinefrin uygulanmıştır. Sıvı tedavisinde kolloid kullanılmış ve pulmoner arter tıkanma basıncı 12 mmHg'nin üstünde olacak şekilde verilmiş. Sonuç olarak levosimendanın başlangıç değerlerine göre sistemik vasküler indeks, kardiyak indeks, oksijen sunum indeksi ve oksijen tkretim indeksinde artış sağladığı saptanmıştır. Ortalama pulmoner arter basıncıta, sağ atriyal basıncıta ve pulmoner arter tıkanma basıncında azalma saptanmıştır. Diyastol sonu hacim indeksi ve sistol sonu hacim indeksinde levosimendan düşüşe sebep olurken sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu da artırmıştır, fakat bu sonuçlar dobutamin grubu ile anlamlı fark oluşturmamıştır.

Levosimendan İV yolla uygulanmaktadır. Aktif metaboliti olan OR-1896'nın eliminasyon yarı ömrünün 75-80 saat olması nedeniyle, hemodinamik etkisi ilaç kesildikten sonra 7-9 gün devam etmektedir (107).

Levosimendanın ventrikül doluşu yada çıkım yolunu etkileyen belirgin mekanik obstrüksiyon, ciddi böbrek ve karaciğer yetersizliği, ciddi hipotansiyon ve taşikardi, torsade de pointes öyküsü yada levosimendana karşı bilinen aşırı duyarlılığı olan hastalarda kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir (93).

Genel olarak levosimendan iyi tolere edilebilen bir ilaçtır. Levosimendan ile en sık rastlanan yan etkiler baş ağrısı, bulantı, baş dönmesi ve arteriyel hipotansiyondur. Daha az görülen diğer yan etkiler ekstrasistol, atriyal fibrilasyon, taşikardi, ventriküler taşikardi, çarpıntı ve miyokard iskemisidir.

Bu çalışmada; deneysel sepsis modelinde levosimendanın, karaciğer kan akımı, karaciğer dokusunda inflamatuvar sitokin düzeyi, mitokondriyal disfonksiyona etkisi ve apoptozis ile apoptotik yollara etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

### III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel tez çalışması, Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Etik Kurul'unun 2007/007 protokol numaralı onayı alındıktan sonra, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, Wistar albino cinsi, 38 erişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklendi. Deneysel sepsis modeli olarak Çekal Ligasyon Perforasyon (ÇLP) yöntemi seçildi. Çalışmaya kadar sıçanlar ısı ve nem oranı standardize edilmiş alanda, su ve yiyecek alımlarına izin verilerek tutuldu.

#### III.1. Anestezi

Çalışma öncesinde su içmelerine izin verilmek koşulu ile 10 saat aç bırakılan sıçanların tümünde, cerrahi girişim, infüzyonlar ve doku örneklerinin alınması işlemleri intraperitoneal ketamin (90 mg/kg) + Ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında yapıldı.

#### III.2. Deney Grupları

**Grup I (n=6):** 3 cm'lik orta hat insizyonu ile batın açıldıktan sonra çekum eksplere edildi ve işlem yapılmadan batın 3/0 ipekle kapatıldı. İşlemden 24 saat sonra intravenöz % 5 dextroz infüzyonu uygulandı.

**Grup II (n=6):** 3 cm'lik orta hat insizyonu ile batın açıldıktan sonra çekum eksplere edildi ve işlem yapılmadan batın 3/0 ipekle kapatıldı. İşlemden 24 saat sonra intravenöz 100 µg/kg dozunda levosimendan 10 dk yükleme dozu verildikten sonra 100 µg/kg/sa 4 saat infüzyon yapıldı.

**Grup III (n=8):** 3 cm'lik orta hat insizyonu ile batın açıldıktan sonra çekum eksplere edildi. Çıkan kolon sıvazlanarak çekum gaita ile doldurulduktan sonra çekuma giden damarlar bulunarak 3/0 ipekle bağlandı. Çekum ön yüzü 20 G iğne ile iki defa delindi. Gaita çıkışı gözlendikten sonra

batın 3/0 ipekle kapatıldı (ÇLP yöntemi). İşlemden 24 saat sonra intravenöz % 5 dextroz infüzyonu uygulandı.

**Grup IV (n=9):** ÇLP tekniği ile sepsis oluşturulduktan 24 saat sonra, 100 µg/kg dozunda levosimendan 10 dk yükleme dozu verildikten sonra 100 µg/kg/sa 4 saat infüzyon yapıldı.

**Grup V (n=7):** ÇLP tekniği ile sepsis oluşturulduktan 24 saat sonra, 200 µg/kg dozunda levosimendan 10 dk yükleme dozu verildikten sonra 200 µg/kg/sa 4 saat infüzyon yapıldı.

**Grup VI (n=2):** Bu gruba hiçbir işlem uygulanmadı. Saf kontrol olarak kullanıldı.

### **III.3. Deneysel İşlemler**

Operasyondan sonra sıçanlar ısı ve nem oranı standardize edilmiş alanda su ve yiyecek alımlarına izin verilerek izlendi. Operasyondan 24 saat sonra intravenöz infüzyon yapmak için femoral ven diseke edilip askıya alındı, sonra 24 G branül ile venöz kanülasyon yapıldı. Sıçanların deney süresince kan basınçlarını ölçmek için femoral arter diseke edilip asıldıktan sonra 24 G branül yerleştirildi.

### **III.4. Kalp Hızı ve Kan Basıncı Ölçümü**

Kan basıncı ölçümü için, femoral arterin kan basınç sinyalleri yükseltildi (TBM4-WPI, USA) ve sayısal olarak kayıt edildi (PowerLab/8P, AD Instruments, Castle Hill, NSW, Australia). Kalp atım hızı bu basınç sinyalleri kullanılarak saptandı. İstatistiksel çalışmada bazal ve 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240. dakikalardaki ölçülen kan basınçları ve kalp atım hızları kullanıldı.

### **III.5. Karaciğer Kan Akımı Ölçümü**

İnfüzyonlar tamamlandıktan sonra Doppler USG ile portal kan akımı ölçüldü. Renkli Doppler ölçümü General Elektrik marka Logiq 3 Expert model cihaz ve 7.5 MHz lineer transdüser kullanılarak gerçekleştirildi. Karın bölgesi tıraşlanan anestezi altındaki sıçanlarda portal hilus düzeyinde portal ven

görüntüledi. B-mode görüntülerde elektronik kaliperler kullanılarak portal ven çapı ölçüldü. D-mod görüntülerde portal ven lümeni içine yerleştirilen uygun boyuttaki örnekleme hacmi ile birkaç kardiak siklus boyunca Doppler spektrumu yazdırıldı. Cihaz üzerindeki otomatik program aracılığı ile portal ven çapı ve portal ven içerisinden yazdırılan akım bilgilerini içeren Doppler spektrum ölçümleri kullanılarak, portal ven akım hacmi (debi) hesaplandı.

### **III.6. Histolojik Değerlendirme**

Denekler, deney sonunda servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Her bir gruptan alınan karaciğer dokuları direkt %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu. Alınan kesitler dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksil-eozin ile boyanır iken, diğer kesitler apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL yöntemi, doku enflamasyonunun ve apoptotik mekanizmaların açıklanabilmesi için IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , sitokrom-C, Bcl-2, Bax ve kaspaz-3 dağılımları indirekt immunoperoksidaz teknikleri ile incelendi.

#### **III.6.1. Parafin Doku Takibi**

Tespit edilen karaciğer dokuları, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 15'er dakika %60'dan %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 15 dakika 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 30'ar dakika parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo-3).

#### **III.6.2.Hematoksilen-Eozin Boyaması**

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5  $\mu$ 'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60 °C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakikalık iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidrasyon işlemi için %95'den %60'a azalan oranlarda alkol serilerinden geçirilen



kesitler 5 dk akar su altında yıkandı. 2 dk hemotoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire, UK) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dk akar suda yıkanma yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinde geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dk iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo-4).

**Tablo-3: Parafin doku takibi**

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	15 dk
	% 70 etil alkol	15 dk
	% 80 etil alkol	15 dk
	% 95 etil alkol	15 dk
	% 95 etil alkol	15 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen – Alkol	15 dk
	Ksilen	15 dk
	Ksilen	15 dk
Emdirme %60 C etüv	Ksilen parafin	15 dk
	Parafin	30 dk
	Parafin	30 dk
Gömme	Parafin	

**Tablo-4: Hematoksilen-Eozin Boyaması**

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
	% 80 alkol	1 dakika
	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

### **III.6.3.TUNEL Boyaması**

Bu teknik için Dead-End Colorimetric TUNEL system kiti (Apoptag, Peroksidase Insitu Detection Kit, 90419, Chemicon, Temecula, CA) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak fosfat tampon solüsyonunda (PBS: Posphate buffer solution) 5 dk yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında 15 dk 20 µg/ml proteinase K ile inkübe edilen kesitler 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulanan kesitler PBS ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkandı. Equilibration tampon solusyonu ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilen kesitler, TdT enzimi ile 37 °C de 1 saat bekletildi. Kontrol boyama kesitleri TdT enzimi konmayıp, sadece reaksiyon solüsyonunda bekletildi. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında 10 dakika tampon solüsyonu ile, 3 defa 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Anti-digoxigenin konjugat solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen kesitler 4 defa 5'er dakida PBS ile yıkandı. TUNEL reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacı ile kesitler 5 dakika diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL pozitif hücre sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda Image-Pro Plus 5.1.2 hücre sayım programında her gruptan her bir denekten alınan kesitlerde en az 5 farklı alanda boyalı ve boyanmayan hücreler belirlenerek sayım yapıldı (Tablo-5)

### **II.6.4.İndirekt İmmunohistokimya Boyaması**

Alınan karaciğer kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku

endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS; ile yıkanan kesitler 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu

**Tablo-5: TUNEL boyaması**

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K solüsyonu	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	% 3'lük hidrojen peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Tamponlama	Equilibration tampon sol.	5 dk
Primer antikor	Enzim solüsyonu	37°De 1 saat
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Anti-digoxigenin konjugat	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB boyası	10 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt boyama	Mayer hematoksilen	4 dakika
İşlem	Madde	Süre
Dehidratasyon	%80- %90'lık alkol serileri	2 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika
Kapama	Entellan	

dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-IL-6 (ab6672, Abcam, Cambridge, UK) anti-IL-10 (af519, R&D Systems, Minneapolis, MN USA), anti-TNF- $\alpha$  (HP8001, Hycult Biotechnology, Uden The Netherlands), anti-sitokrom-C (sc-13156, Santa Cruz, California, USA), anti-Bcl-2 (sc-7382, Santa Cruz, California, USA), anti-Bax (sc-7840, Santa Cruz, California, USA) ve anti-kaspaz-3 (NB 600-1235, Novus Biologicals, Littleton, USA) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, biotinylated anti-mouse ve anti-rabbit, conjugated streptavidin-horsedish peroxidase solüsyonları ile (KP-500, Universal Phosphatase Kit, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) 30'ar dakika boyandı. Her bir ikincil antikor 3 defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla

kesitler DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilin (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (H701, CC/Mount, Universal Phosphatase Kit, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) ile kapatıldı (Tablo-6).

**Tablo-6: İndirekt immunohistokimyasal boyama**

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Bcl-2, p53, Bax	2 saat, 4° de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	AEC	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zit Boyama	Mayer's hematoksilin	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Kapatma maddesi	

### III.7. İstatistiksel Değerlendirme

Renk ayrımı kullanılarak sayım yapılan histolojik kesitlerde TUNEL sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda her bir alanda görülen hücrelerden 100 hücre sayılarak, bunlardan kaçının pozitif oldukları sayıldı. Bu sayım işlemi, her bir örnekte farklı 5 alanda sayılarak değerlendirildi. Elde edilen değer % olarak verildi. Veriler nonparametrik ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. Ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak verilen değerlerin karşılaştırılmasında  $p < 0.05$  ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirme yine iki farklı histolog tarafından ayrı zamanlarda incelenerek çok zayıf (-/+), zayıf (+), orta (++) ve Őiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

Grupların OAB, KAH ve portal kan akımı değerlerinin analizinde One Way ANOVA testi, Mann-Whitney U testi ve Wilcoxon testi kullanıldı.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

## IV. BULGULAR

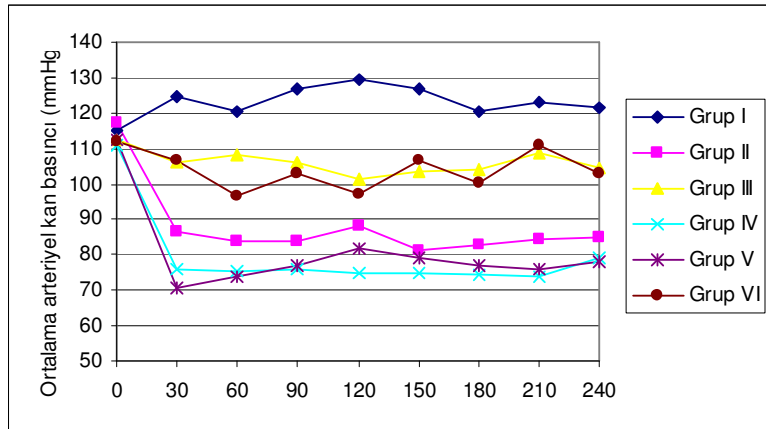
### IV.1. Hemodinamik Değişiklikler

Ortalama arteriyel kan basınçları arasında bazal değerlerde altı grup arasında fark bulunamadı. Levosimendan infüzyonu yapılan 2.,4. ve 5. gruplarda yükleme dozundan sonra ortalama arteriyel kan basınçlarının anlamlı olarak düştüğü görüldü. (Tablo-7, Şekil-1)

**Tablo-7: Grupların ortalama arteriyel basınçları**

Gruplar	Bazal	30 dk	60 dk	90 dk	120 dk	150 dk	180 dk	210 dk	240 dk
I	115±10	125±11*	120±16	127±11*	129±11	127±9*	121±11	123±8	122±6
II	117±6	87±6*	84±9*	84±10*	88±10*	82±8*	83±4*	84±7*	85±6*
III	112±14	106±21	108±20	106±27	102±25	104±26	104±26	109±25	104±21
IV	111±12	76±3*	76±7*	76±9*	75±6*	75±5*	75±7*	74±7*	79±10*
V	112±9	70±5*	74±4*	77±8*	82±4*	79±5*	77±4*	76±3*	78±5*
VI	112±7	107±2	97±8	103±16	97±6	106±2	101±4	111±3	103±0

\* <p0,05 Grup içi zamana bağlı değişiklikler bazal ölçüm ile karşılaştırıldığında Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.



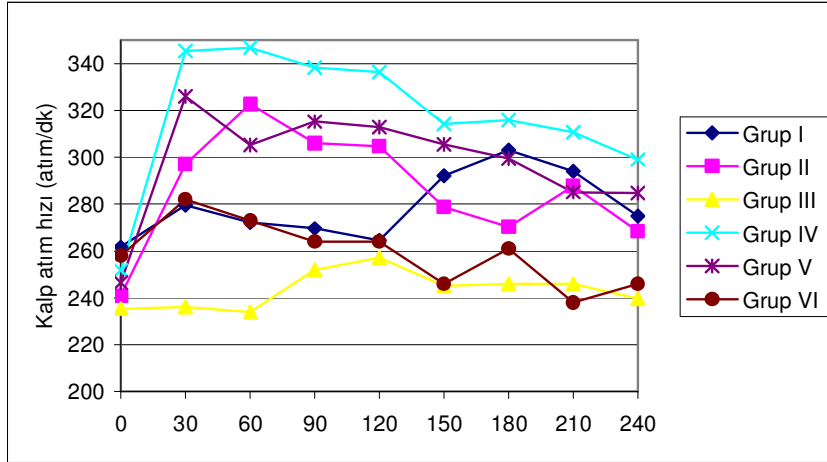
**Şekil-1: Grupların zamana göre ortalama arteriyel basınçları**

Kalp hızları değerlendirilmesinde bazal değerler incelendiğinde altı grup arasında anlamlı fark bulunamadı. Levosimendan verilen gruplarda (2.,4. ve 5.) yükleme dozundan kalp atım hızında anlamlı artış saptandı. (Tablo-8, Şekil-2)

**Tablo-8: Grupların kalp atım hızları**

Gruplar	Bazal	30 dk	60 dk	90 dk	120 dk	150 dk	180 dk	210 dk	240 dk
I	262±32	280±25*	272±27	270±22	265±24	292±6	303±12	294±26	275±22
II	241±13	297±13*	323±27*	306±29*	305±25*	279±14*	270±16*	288±17*	268±10*
III	236±44	236±55	234±44	252±34	257±33	245±53	246±43	246±57	240±24
IV	252±34	345±27*	347±13*	338±23*	336±23*	314±35*	316±44	311±37	299±19
V	247±30	326±30*	305±56*	315±39*	313±43*	305±43*	300±36*	285±32*	285±29*
VI	258±8	282±8	273±21	264±17	264±34	246±8	261±4	238±20	246±8

\* <p0,05 Grup içi zamana bağlı değişiklikler bazal ölçüm ile karşılaştırıldığında Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.



**Şekil-2: Grupların zamana göre kalp atım hızları**

Karaciğer portal kan akımı ölçümleri incelendiğinde; düşük doz levosimendan verilen 4. grupta diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Yüksek doz levosimendan verilen 5. grupta portal kan akımı 1.,2.ve 6. gruplardan daha yüksek ve 3. gruptan daha düşük bulundu. Ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi. (Tablo-9)

**Tablo-9: Grupların portal kan akımları**

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
Portal kan akımı	4,15±1,83	3,35±0,77	5,43±2,56	9,32±2,18*	4,35±1,43	3,57±1,04

\* <p0,05 1,2,3,5,6. gruplarla karşılaştırıldığında

#### **IV.2. Histokimyasal İnceleme**

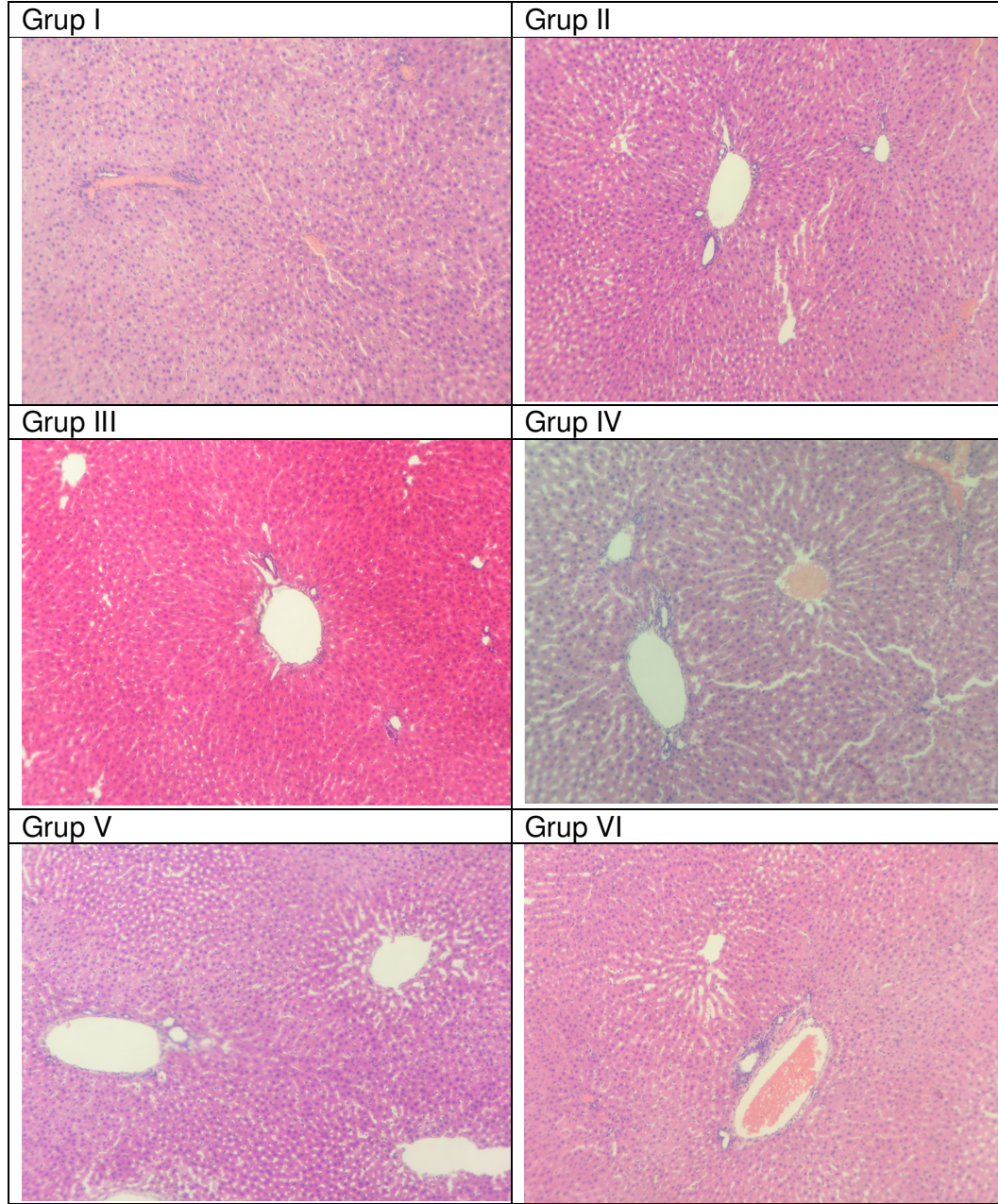
Karaciğer dokuları hematoksilin-eozin ile yapılan kesitlerde histolojik açıdan değerlendirildiğinde, tüm gruplara ait kesitlerde, karaciğer dokusunda merkezde santral ven ve köşelerde portal triadı oluşturan yapı ve ışınsal tarzda düzenlenmiş hepatosit hücre kordonları net olarak seçilmekte idi (Resim 1). Sıçan karaciğer dokusunda lobülasyon sınırları net olarak belli olmadığından dolayı kesitlerde altıgen lobülasyonların sınırları net değildir. Tüm grup karaciğer örneklerinde hepatositler kübik şekilli, hücre sınırları kolaylıkla ayırt edilebilen, bazıları çift çekirdekli olarak gözlemlendi. Hepatositler arasında sinuzoidler ve kuffer hücreleri de izlendi. Hiçbir grupta PNL hücrelerine rastlanmadı.

#### **IV.3. TUNEL Tekniği ile İnceleme**

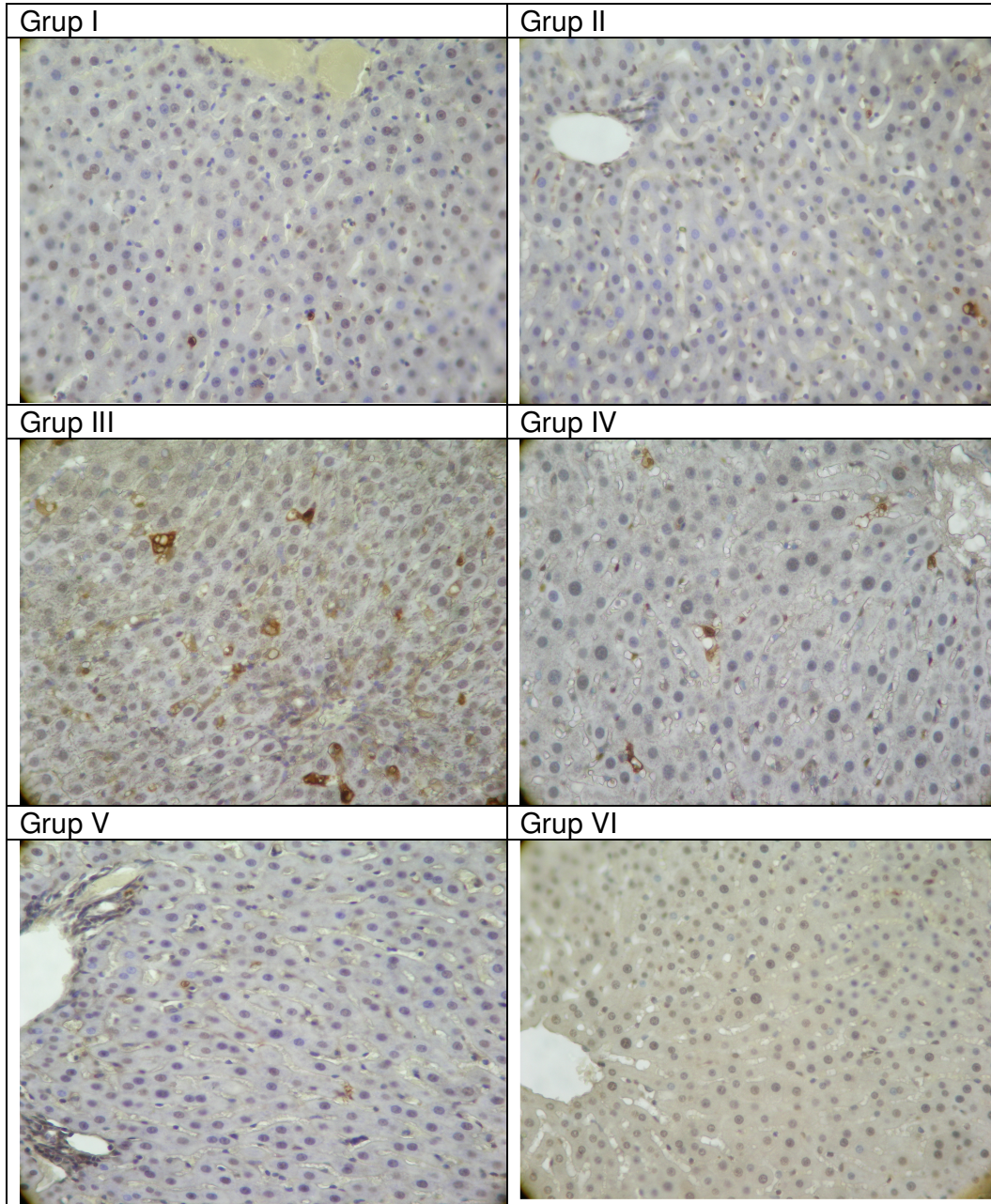
TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) boyaması ile yapılan apoptotik hücrelerin belirlenmesi çalışmasında, TUNEL pozitif hücreler çekirdekleri kahverengi boyalı olarak gözlenen hücrelerdir. Grup I ve Grup II de yer yer TUNEL pozitif hücrelere rastlanır iken, Grup III de TUNEL pozitif hücre sayısı en fazla idi. Bununla beraber Grup IV ve V'de TUNEL pozitif hücre gözlenmesine rağmen pozitif hücre sayısı, Grup III'e oranla daha az, fakat Grup I ve II'ye oranla ise daha fazla idi. Saf kontrol olan ve herhangi bir işlem yapılmayan Grup VI'da ise TUNEL pozitif hücreye rastlanmadı (Resim 2). Her bir alandaki hücreler sayılıp, istatistiksel analiz yapıldığında, TUNEL pozitif hücre sayısının Grup I'de % 1.9±0.23, Grup II'de % 1.5±0.22, Grup III'de % 11.3±0.73, Grup IV'de % 6.4±0.34, Grup V'de % 2.5±0.22 ve Grup VI'da da 0 olduğu hesaplandı. Tüm sonuçlar Tablo-10'da verilmiştir. Elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise, Grup I değerlerinin Grup II ve V değerleri ile arasında istatistiksel olarak



**Resim 1: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinin histokimyasal olarak değerlendirilmesi. Hematoksilen-Eozin. X100.**



**Resim 2: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinin TUNEL tekniği ile değerlendirilmesi. X400.**



anlamli değildir. Bununla beraber levosimendanin yüksek doz uygulandığı grupta TUNEL pozitif hücre sayısı Grup I ve Grup II ile benzer iken, Grup III ve Grup V ile istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki, sepsis sonucunda apoptotik hücre sayısı en fazla Grup III de gözlenmiştir. Levosimendan tedavisi ile apoptotik hücre sayısında azalma görülmesi yanı sıra esas olarak yüksek doz levosimendanin daha etkili olduğu ve bu grupta apoptotik hücre sayısının kontrol gruplarına benzer sayıda olduğu izlendi.

**Tablo-10: Karaciğer rneklerinde TUNEL boyaması sonucunda pozitif hücre oranları**

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
TUNEL %	1.9±0.23	1.5±0.22	11.3±0.73	6.4±0.34	2.5±0.22	0

Grup I değerinin Grup II ve Grup V karşılaştırılması ile, Grup II değerinin Grup V ve VI ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlam gözlenmez iken ( $P>0.05$ ), diğer tüm verilerin karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlamlı ( $P<0.001$ ) bulunmuştur.

#### **IV.4. İmmunohistokimyasal Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

İmmunohistokimyasal olarak TUNEL sonucunda gözlenen TUNEL pozitif hücrelerin, apoptotik hücreler olarak değerlendirilmesi sonucunda, oluşturulan sepsis modelinde gelişen apoptotik mekanizmada hangi yolağın (ekstresek ve/veya intresek) aktive olduğunu incelemek ve ayrıca sepsis sonucu aktive olan sitokinlerin varlığını ve dağılımını görmek amacı ile indirekt immunohistokimyasal analiz yapıldı. Apoptotik mekanizmalarda rol oynayan intresek yolakta etkili ve mitokondrinin aktivasyonu sonucu salınımı gözlenen sitokrom-C ile birlikte anti-apoptotik protein Bcl-2 ve apoptotik protein Bax dağılımı ile birlikte hem intresek hem de ekstresek yolağın son ürünü olan kaspaz-3 dağılımları incelenmiştir. Sitokin salınımı açısından ise TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-10 dağılımlarına bakıldı.

**TNF- $\alpha$  Dağılımı:** Grup I de TNF- $\alpha$  immunoreaktivitesinin ışınal tarzda yerleşmiş olan hepatosit hücrelerinde yer yer zayıf (+) yer yer ise orta şiddette (++) pozitif olduğu gözlendi. Bununla beraber Grup II deki boyanmanın Grup I'e benzer olduğu fakat immunoreaktivite şiddetinin daha zayıf şiddette (+) olduğu saptandı. Grup III'de hepatositlerdeki

immunoreaktivitenin kuvvetli pozitif olduğu (+++) ve klasik lobüldeki tüm hücrelerde (zon ayrımı olmaksızın) mevcut idi. Grup IV'de yani levosimendanın düşük doz uygulandığı tedavi grubunda TNF- $\alpha$  immunoreaktivitesinin ışınal tarda tüm zonlarda bulunan hücrelerde yer yer pozitif ve orta şiddette (++) olduğu izlendi. Levosimendanın yüksek doz uygulandığı Grup V'de ise immunoreaktivitenin esas olarak vena santralis etrafındaki hücrelerde yani zon 3'e uyan bölgedeki hücrelerde orta şiddette olduğu (++) , zon 3'de uzaklaştıkça immunoreaktivitenin azaldığı ve özellikle zon 1'i oluşturan hücrelerde immunoreaktivitenin negatif olduğu saptandı. Saf kontrol grupta ise TNF- $\alpha$  immunoreaktivitesinin yer yer negatif fakat yer yer ise zayıf şiddette olduğu gözlemlendi. Fakat immunoreaktivite Grup I ve II den bile daha az olduğu gözlemlendi (Resim 3).

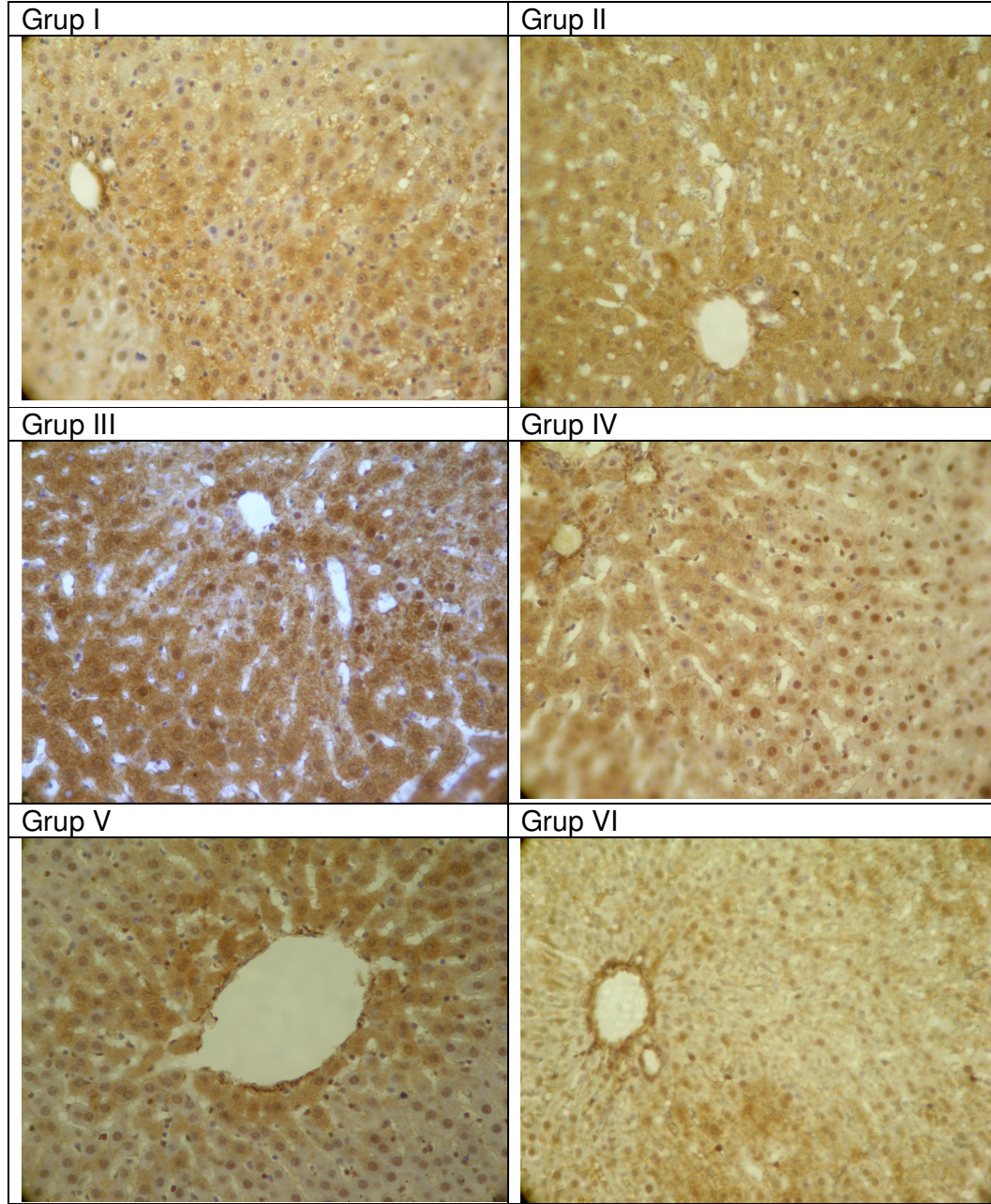
**IL-6 Dağılımı:** Grup I ve II'de IL-6 immunoreaktivitesi negatif iken, Grup III'de immunoreaktivitenin zayıf şiddette (+) olduğu, Grup IV'de ise kuvvetli pozitif olduğu (+++) gözlemlendi. Grup V de ise TNF- $\alpha$  immunoreaktivitesine benzer şekilde özellikle zon 3 de bulunan hücrelerde kuvvetli pozitif, zon 2 ve yer yer de zon 1 deki hücrelerde zayıf şiddette olduğu gözlemlendi. Grup VI'da ise immunoreaktivite negatif idi (Resim 4).

**IL-10 Dağılımı:** IL-10 immunoreaktivitesi tüm gruplarda pozitif olarak gözlemlendi. Grup I, II ve III'de (+), Grup IV'de (+++), Grup V'de yer yer (+++) yer yer (++) , Grup VI'da da bazı hücrelerde (+) olarak görüldü. Grup IV'de gözlenen immunoreaktivitenin tüm zonlardaki hücrelerde olduğu ve aynı şiddette olduğu saptandı. Grup V'deki immunoreaktivitenin ise zon 3 deki hücrelerde (+++) iken diğer zonlardaki hücrelerde yer yer immunoreaktivite negatif iken, yer yer (++) şiddetinde olduğu saptandı. Kontrol grubunda ise tek tek bazı hücrelerde pozitif boyanma gözlemlendi (Resim 5).

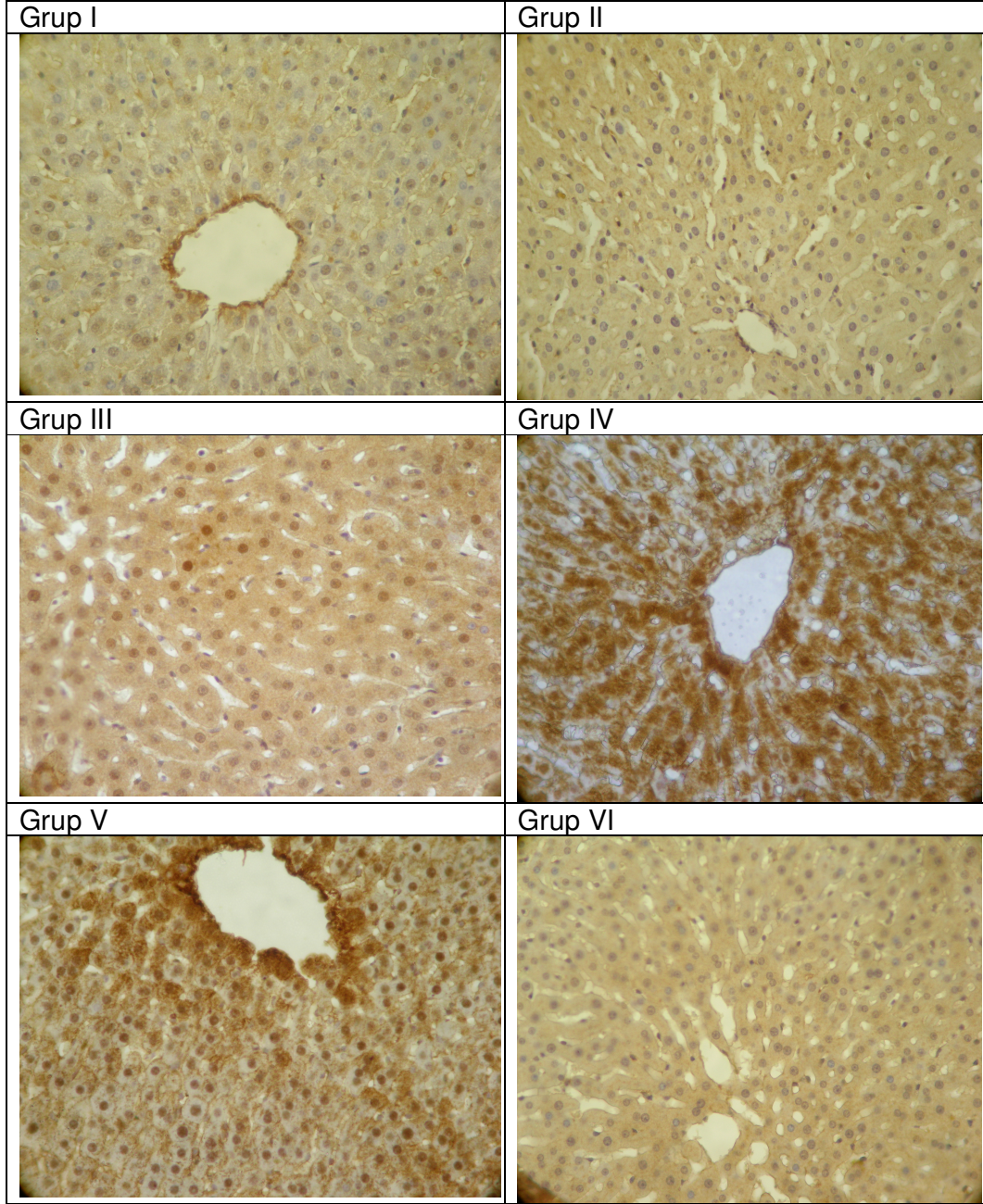
**Bcl-2 Dağılımı:** Bcl-2 immunoreaktivitesi canlı kalma sinyali alan hücrelerde pozitif olarak salgılanır ve anti-apoptotik bir proteindir. Bcl-2 immunoreaktivitesine bakıldığında Grup I ve Grup VI'deki hücrelerde pozitif olarak görülür iken (+), diğer gruplarda ise negatif olarak gözlemlendi (Resim 6). Özellikle III., IV. ve V. gruplarda gözlenmemiş olması anti-apoptotik mekanizmalardan Bcl-2 salınımının olmadığını (belki diğer anti-apoptotik

mekanzimalar çalışıyor olabilir), bu gruptaki karaciğer hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelerin varlığından dolayı anti-apoptotik mekanizmalardan ziyade apoptotik mekanizmaların aktive olduğunu düşündürmektedir.

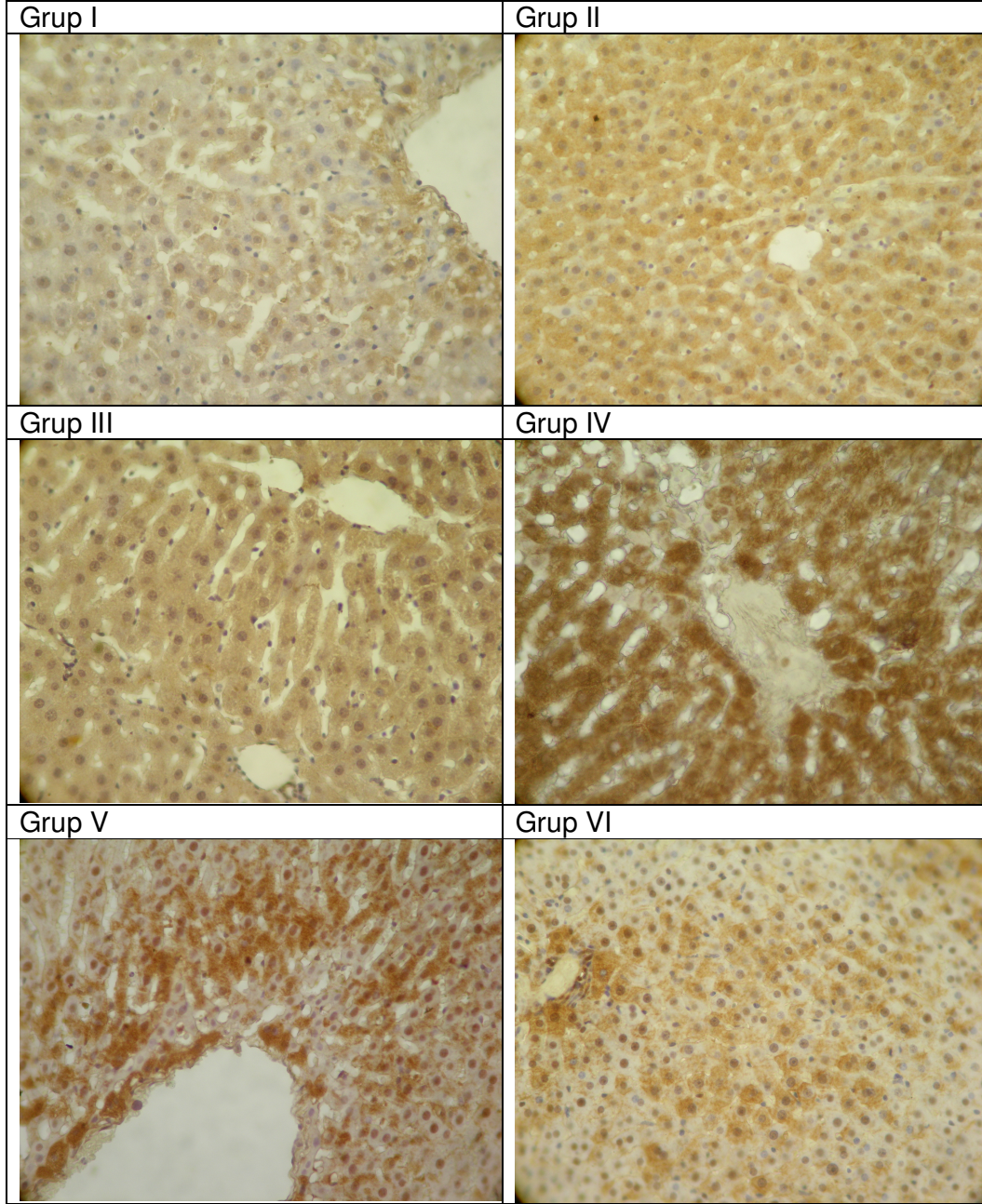
**Resim 3: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde TNF- $\alpha$  dağılımı. X400**



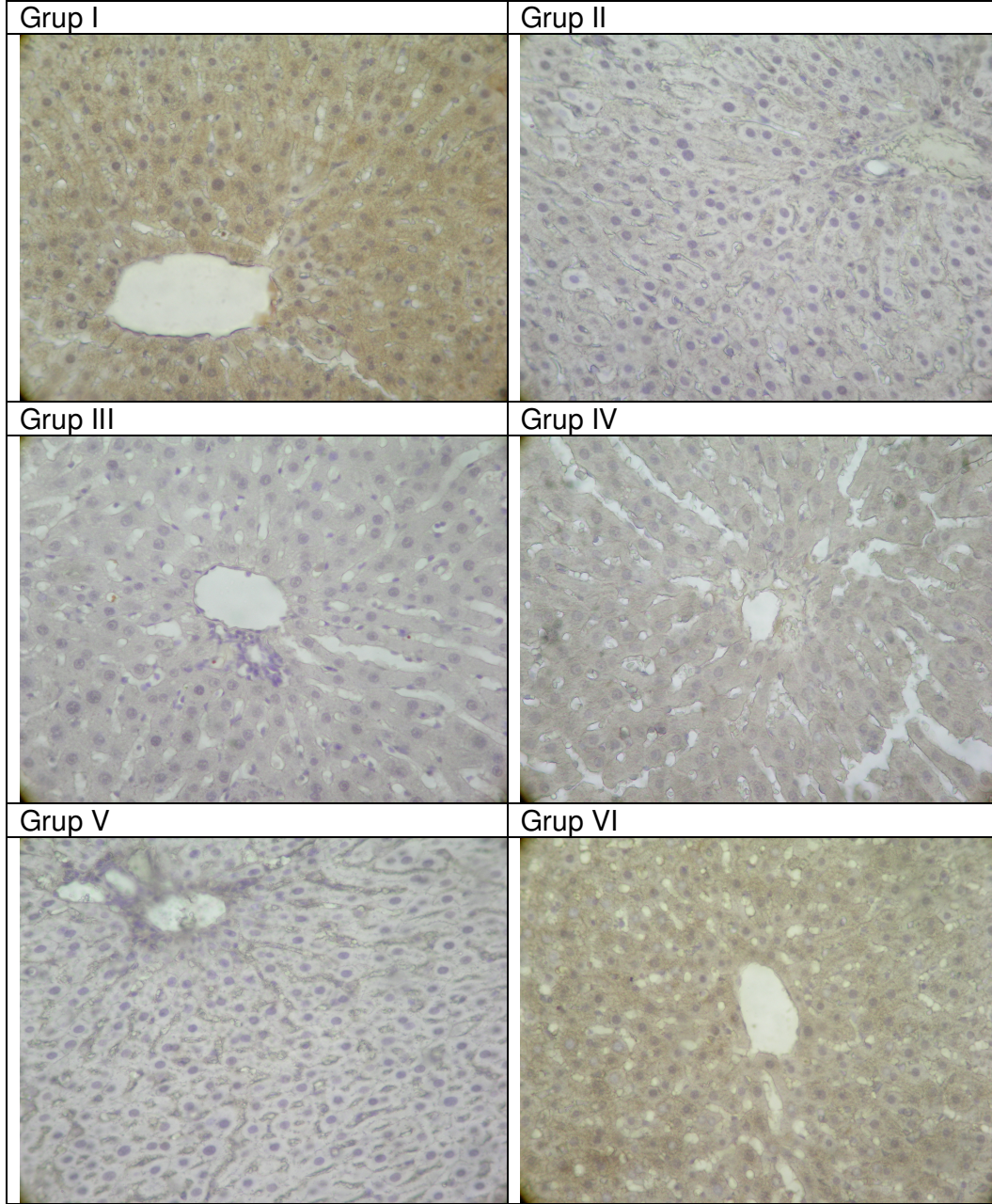
**Resim 4: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde IL-6 dağılımı. X400**



**Resim 5: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde IL-10 dağılımı. X400**



**Resim 6: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde Bcl-2 dağılımı. X400**



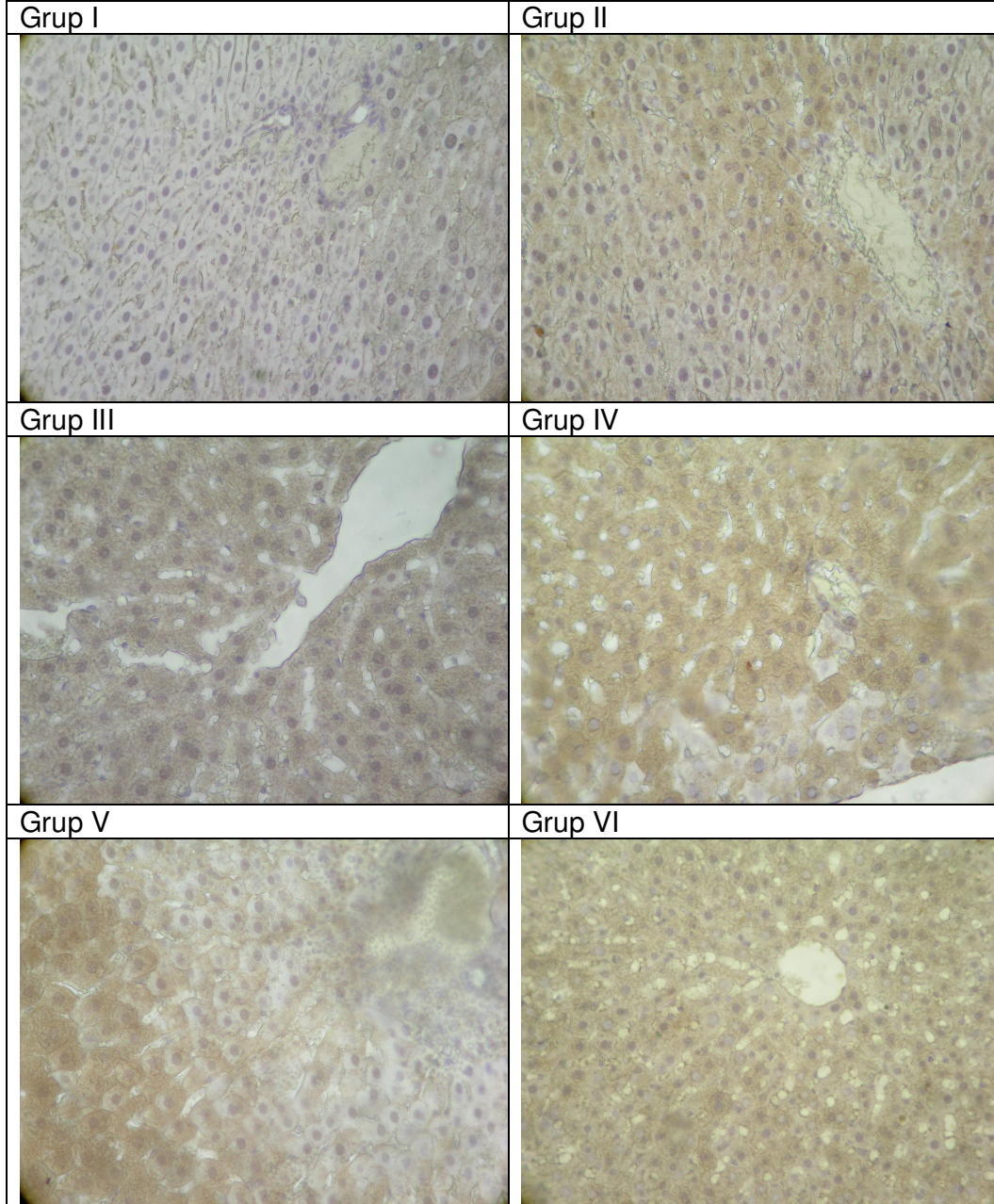


**Bax Dağılımı:** Grup I Bax immunoreaktivitesinin negatif olduğunu, Grup VI'da ise çok zayıf şiddette olduğu görüldü. Grup II'de yer yer zayıf şiddette (+) immunoreaktivite gözlenir iken, Grup III, Grup IV ve Grup V'de immunoreaktivitelerin orta şiddette (++) olduğu izlendi (Resim 7). Bcl-2 immunoreaktivitesine zıt olarak, Bcl-2 pozitifliği olan dokularda Bax'ın negatif olduğu, Bcl-2'nin negatif olduğunda Bax'ın pozitif olarak saptandı. Dokudaki apoptotik mekanizmalardan biri olan Bcl-2/Bax oranının Bcl-2 yönünde fazlalığı hücrenin canlı kalmasını sağlar iken, Bax oranının fazla olması hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Çalışmamızda da sepsis oluşturulmuş tüm gruplarda Bax oranı Bcl-2'ye oranla daha fazla görülmesi üzerine bu dokularda apoptotik mekanizmaların aktive olduğunu desteklemektedir. Bununla beraber bu oranın Grup III'de Bax yönünden daha fazla olması, sepsis oluşturulmuş fakat levosimendan ile tedavi edilmiş gruplarda ise oranın bir miktar azaldığının gözlenmesi ile, sepsis sonucunda aktive olan apoptotik mekanizmaların tedavi ile bir miktar önlenebildiği hem TUNEL sonuçları, hem de Bcl-2/Bax oranı sonuçları ile desteklenmektedir.

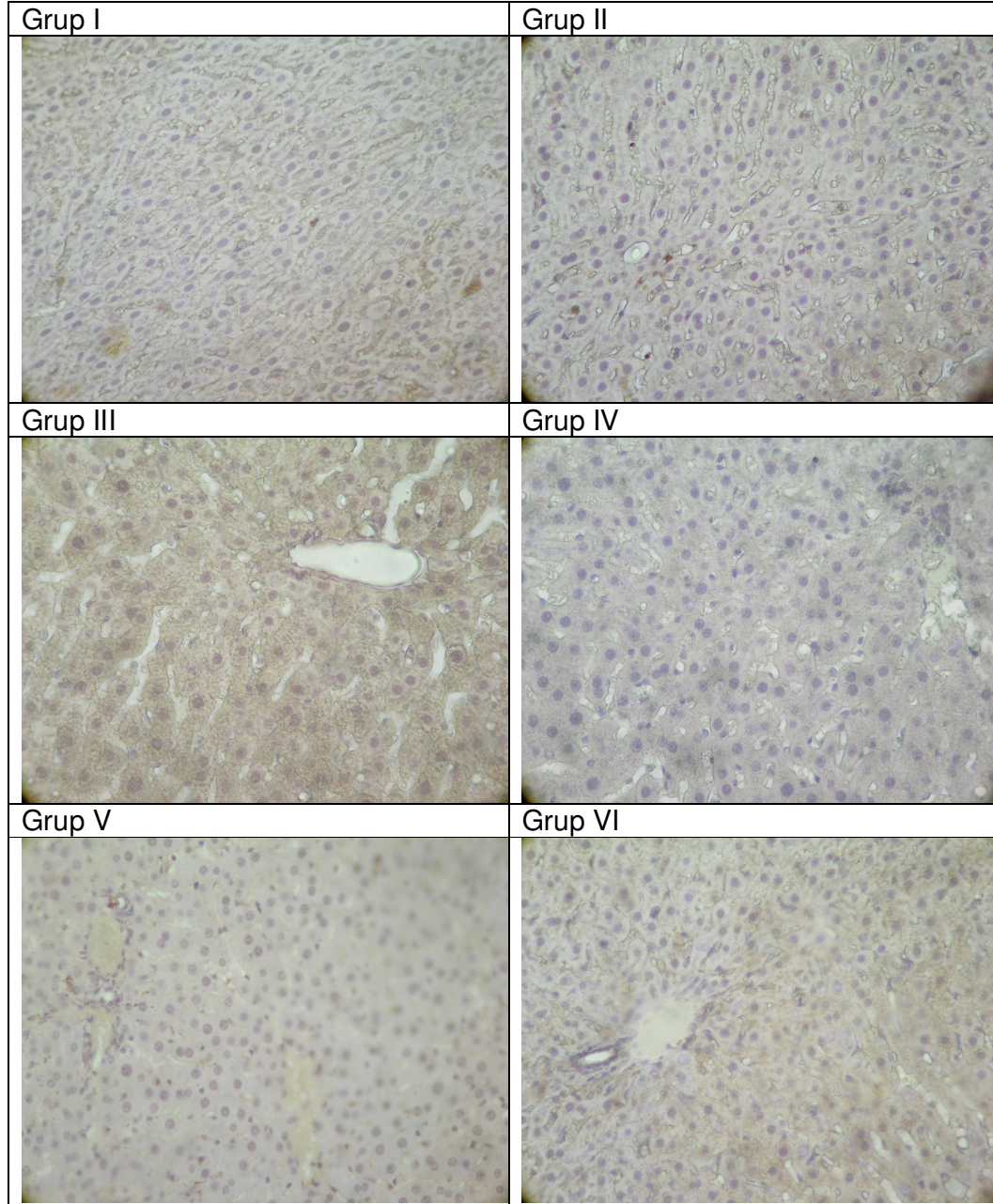
**Sitokrom-C Dağılımı:** Sitokrom-C immunoreaktivitesi sadece Grup III'de zayıf şiddette (+), diğer gruplarda ise negatif olarak gözlendi (Resim 8). Sitokrom-C'nin sadece Grup III'de salınımının gözlenmesi, sepsis sonucu mitokondriyal hasarın olduğunu desteklemektedir. Fakat levosimendan ile tedavi uygulanan gruplarda bu hasarın önlendiği düşünüldü.

**Kaspaz-3 Dağılımı:** Apoptotik yolağın son ürünü olan kaspaz-3 immunoreaktivitesinin Grup I, II ve VI'da negatif olarak gözlenmiştir. O nedenle bu üç grupta apoptotik mekanizmalar aktive olmadığı desteklenmektedir (diğer immunohistokimyasal sonuçlar ile). Grup III'de kaspaz 3 immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu görüldü (Resim 9). Diğer apoptotik belirteçlerin immunohistokimyasal değerlendirilmesi sonucunda apoptozisin sepsis uygulaması sonucunda tetiklendiğini desteklemektedir. Grup IV ve Grup V'de kaspaz 3 immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) olduğu gözlendi. Buda göstermektedir ki, sepsis ile aktive olmuş apoptozis levosimendan tedavisi ile bir miktar önlenebilmiştir.

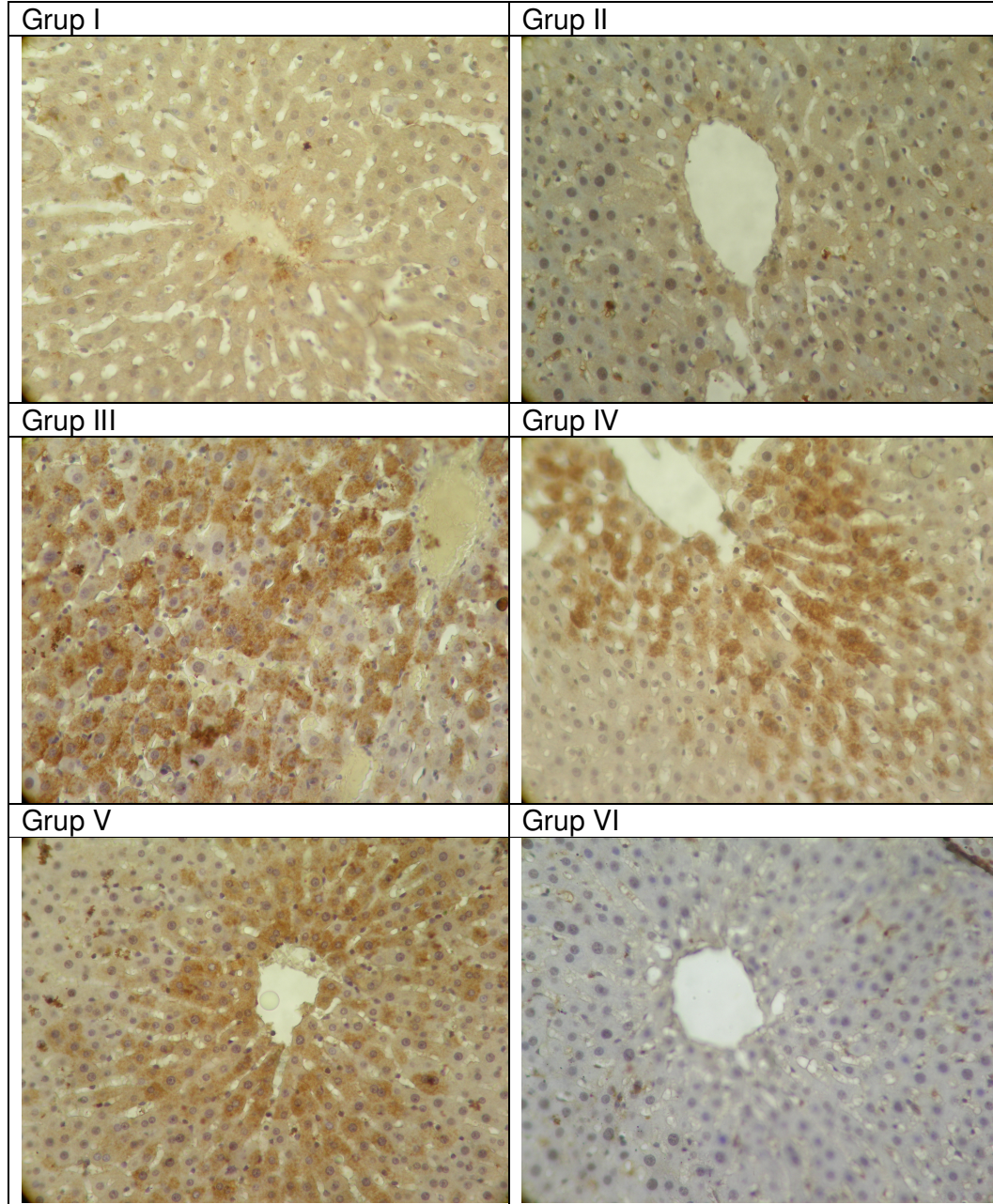
**Resim 7: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde Bax dağılımı. X400**



**Resim 8: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde sitokrom-c dağılımı.  
X400**



**Resim 9: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde kaspaz-3 dağılımı.  
X400**



Tüm gruplara ait immunohistokimyasal dağılımlar Tablo-11'de özetlenmiştir.

**Tablo-11: Tüm gruplara ait karaciğer örneklerinde TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, Sitokrom-C, Bcl-2, Bax ve kaspaz-3 dağılımlarının immunohistokimyasal olarak karşılaştırılması sonuçları**

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
TNF- $\alpha$	+/ yer yer ++	+	+++	++	Zon 3'de ++ Zon 2'de + Zon 1'de -	-/+
IL-6	-	-	+	+++	Zon 3'de ++ Zon 2'de + Zon 1'de -	-
IL-10	+	+	+	+++	Zon 3 de +++, Diğer zonlarda ++	Yer yer +
Bcl-2	+	-	-	-	-	+
Bax	-	+	++	++	++	-/+
Sitokrom-C	-	-	+	-	-	-
Kaspaz-3	-	-	+++	++	++	-

## V. TARTIŞMA

Sepsis ağır bir enfeksiyon tablosu ve buna eşlik eden sistemik inflamatuvar yanıt ile birlikte yaygın doku hasarının ortaya çıktığı klinik bir tablodur. Normalde enfeksiyona organizmanın yanıtı, bakteri istilasını sınırlamaya, kontrol etmeye ve tamir etmeye yönelik kompleks bir olaylar zinciridir. Bu inflamatuvar olaylar zinciri, fagositik hücrelerin uyarılması, inflamatuvar ve anti inflamatuvar sitokinlerin, interferon-gama, pıhtılaşma faktörleri, kompleman sistemi, proteaz, eikosanoidler, trombosit aktive eden faktör, nitrik oksit gibi ara ürünlerin (sitokinler) salgılanması ile başlar. Enfeksiyona bu erken yanıt yaygınlaşır ve bulunduğu yerden uzaktaki organları da etkileyecek kadar büyür ise sepsis adını verdiğimiz tablo gelişir. İnflamatuvar yanıt sıradan bir konak yanıtıdır; ancak normal yanıtın oluşmasında bozukluk ile aşırı ve kontrolsüz inflamatuvar ara ürünlerin salınması ve buna bağlı yaygın doku hasarı ortaya çıkması beklenmedik bir tepkidir ve sonuçta, bu son derece ciddi tablonun ortaya çıkmasına neden olur (29).

İntravasküler sıvı açığı, periferel vazodilatasyona bağlı hipotansiyon ve anormal kan akımı dağılımı sepsisli hastalarda karakteristiktir. Septik şok tedavisinde ana hedef kan volumünün düzeltilmesi, yeterli doku perfüzyonunun ve dokuların oksijen ihtiyacının sağlanmasıdır (77). Bu amaçla ilk yapılması gereken yeterli sıvı tedavisidir. Yeterli sıvı replasmanına rağmen hemodinamik bozukluğu devam eden veya doku hipoperfüzyonu olan hastalarda inotropik ajanlar verilmelidir. Beta adrenerjik inotropik ajanlar ile destek miyokardiyal depresyonu düzeltebilir, ancak kontraktileti ve periferik vasküler direnci arttırıcı etkisi nedeniyle altta yatan hipovolemiyi maskeleyebilir. Ayrıca oluşturabileceği taşikardi nedeniyle oksijen tüketimi üzerine olumsuz etkileri gözden kaçırılmamalıdır.

Levosimendan, miyokardın kalsiyum duyarlılığını artıran ve vazodilatör etkiye sahip bir inotropik ajandır. Levosimendan, inotropik etkisini diğer pozitif

inotropik ajanlardan farklı olarak hücre içi kalsiyum miktarını artırmadan gerçekleştirir. Böylece myokardın oksijen tüketimini artırmadan myokardiyal kontraktileti artırmış olur. Ayrıca hücre içi kalsiyum artışına bağlı olan aritmi, iskemi ve myosit disfonksiyonu gibi yan etkiler önlenmiş olur (90).

Sepsisli hastaların %10-15'ine yaştan bağımsız olarak myokardiyal depresyon eşlik eder. Sepsise bağlı depresyon, her iki ventrikülde sistolik ve diyastolik disfonksiyon ile sonuçlanan bir takım kompleks olaylar sonucu oluşur. Bu olaylar,  $\beta$  adrenerjik sitümlasyonda azalma, intrasellüler kalsiyum trafiğinde değişiklik ve myofibriller seviyesinde elektromekanik bağlanmada bozulmadır. Bunlar içinde intrasellüler kalsiyum trafiğindeki değişiklik önemli bir yer tutmaktadır. Septik sıçan izole kalp kası hücresinde, endotoksin ve sitokinlerin L tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarında kalsiyum akımını baskılayarak intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (108-110). Ayrıca sepsiste Ryanodin reseptör dansitesinin azalması ile sistol sırasında sarkoplazmik retikulumdan kalsiyuma bağlı kalsiyum salınımının bozulduğu gösterilmiştir (111,112). Sonuç olarak, sistol sırasında intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun azalması myokardiyal kontraksiyonun azalmasına neden olur.

Sepsiste bu hücre içi kalsiyum trafiğindeki değişikliklere bağlı olarak gelişen myokardiyal süpresyonda, levosimendanın kardiyak troponin C'ye kalsiyuma bağımlı bir mekanizmayla bağlanarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırmadan, troponin C'nin hücre içi kalsiyuma duyarlılığını artırarak, myokardiyal kontraktileti artırarak hemodinamik parametreleri en uygun hale getireceği ve ayrıca splanknik perfüzyonu iyileştirebileceği düşünülmektedir. Barraud ve ark. (113) yaptıkları çalışmada, levosimendanın sistolik ve diyastolik kardiyak fonksiyonları iyileştirdiğini, milrinon ve dobutaminin sadece sistolik fonksiyonda iyileşme sağladığını göstermişlerdir.

Levosimendanın pozitif inotropik etkilerine ek olarak myosit ve vasküler düz kas hücrelerinde ATP bağımlı potasyum kanallarını açarak sistemik vasküler yatakta vazodilatasyona yol açtığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (94). Bu vazodilatasyonun sistemik vasküler direnci düşüreceği ve bunun da hipotansiyona neden olacağı açıktır. Yapılan

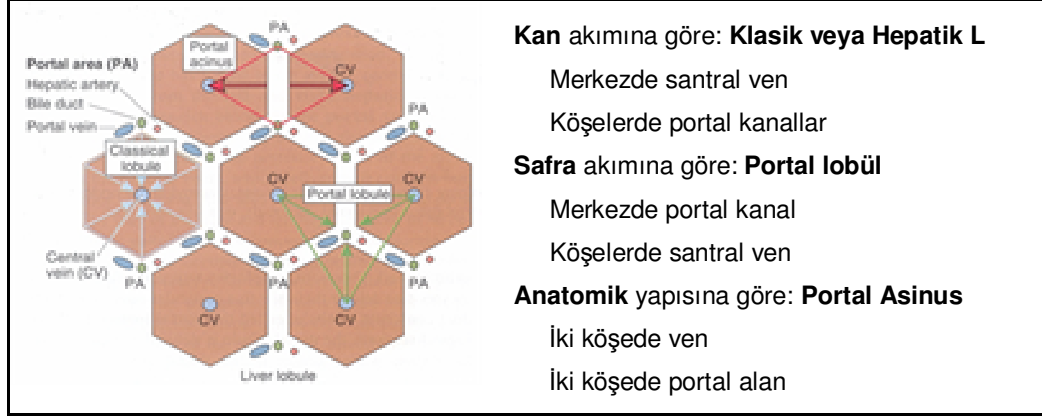
bir çalışmada, endotoksinde önce başlanan levosimendan infüzyonunun sistemik vasküler direnç indeksinde yaklaşık % 37'lik ve ortalama arteriyel basınçta da yaklaşık % 22'lik azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (6). Dubin ve ark.'larının (114) yaptıkları bir başka çalışmada da, levosimendan infüzyonu sonrası sistemik hipotansiyon gelişmiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmalarla benzer olarak, levosimendan verilen gruplarda, yükleme dozundan sonra OAB'da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma geliştiği görüldü. Ancak OAB değerleri yine de normal sınırları içinde kaldı.

Karaciğer insan vücudunda kanlanması en fazla olan organdır. Vücut ağırlığının sadece %2.5'ini oluşturmakla beraber kalp debisinin %25'ini alır. Bunun yanında iki ayrı damardan kanlanması nedeniyle de karaciğer benzersiz bir organdır. Normal karaciğer kan akımı, erişkinde 1550 ml kadar olup gelen kanın yaklaşık %80'i portal venden ve %20'si hepatik arterdendir.

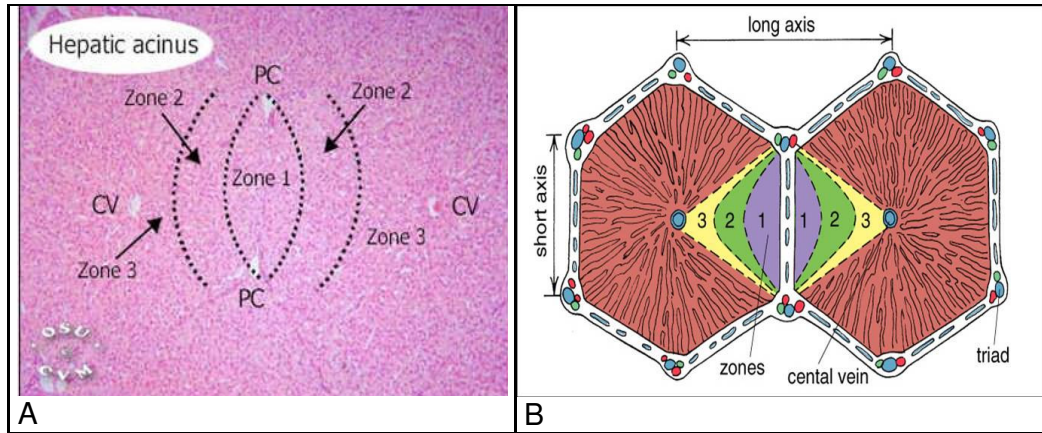
Karaciğer dokusunun histolojik yapısı incelendiğinde, kan akımına, safra akımına ve anatomik yapıya göre lobülasyonlar içerir. Kan akımına göre yapılan sınıflamada merkezde santral ven ve köşelere portal triad bulunan klasik veya hepatik lobülden oluşmuştur. Bununla beraber kan akımına göre yapılan bu sınıflama yanı sıra klasik lobül zonlara ayrılmıştır. Zon 1 en fazla kan akımının olduğu zondur, o nedenle besin ve toksik maddeler bu zonda daha fazla depolanır. Safra kanalı tıkanıklığında ilk morfolojik değişiklik burada gözlenir. Zon 2 esas olarak glikojenin depolandığı yerdir. Zon 3 ise en az kan sirkülasyonu olduğu zondur ve en az besin de bu zondadır. İskemik nekroz ve yağ depolanması ilk olarak bu zonda gözlenir. Toksik içerikten ve safra tıkanıklığında en son etkilenen kısımdır (Şekil-3, Şekil-4).

Karaciğer, sepsis sırasında sistemik inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde ve metabolizmada merkezi rol oynar. Sepsis sırasında arteriyel kan basıncında azalmayla birlikte karaciğer kan akımının bozulması hepatik disfonksiyona neden olabilir.





**Şekil-3: Hepatik lobülasyonlar**



**Şekil-4: A- Hepatik asinus histolojik görüntüsü, B- Hepatik asinus şematik görüntüsü**

Sıçanlarda hepatic ve sinüzoidal kan akımına, endotoksinin etkilerini inceledikleri çalışmada Secchi ve ark. (8) sıçanlara saatte 2 mg/kg/sa'dan endotoksin infüzyonu vermişler, endotoksin infüzyonu başladıktan sonra 1. ve 2. saatte portal kan akımını ve sinüzoidal kan akımını ölçmüşler, portal kan akımını portal venin etrafına yerleştirdikleri ultrasonik akım probu, sinüzoidal kan akımını da sol karaciğer lobunda in vivo videomikroskopla ölçmüşlerdir. Sonuçta hem portal kan akımının hem de sinüzoidal kan akımının endotoksemi sırasında azaldığını göstermişlerdir.

Başka bir çalışmada Croner ve ark. (115) ÇLP ile sepsis oluşturdukları sıçanlarda portal kan akımını incelemişler ve sıçanlara çalışma süresince (20 saat) ketamin ve pentobarbital infüzyonu ile anestezi vermişlerdir. Portal kan akımının ÇLP sonrası 1. saatte azaldığını ve bunun 20. saate kadar devam ettiğini göstermişlerdir.

Krejci ve ark. (116), anestezi altında mekanik ventilasyon uyguladıkları endotoksin infüzyonu ile septik şok oluşturdukları domuzlarda vazopressinin portal kan akımına etkilerini incelemişler ve sonuç olarak septik grupta portal kan akımının azaldığını, septik vazopressin grubunda ise portal kan akımının daha çok azaldığını göstermişlerdir. Vazopressine bağlı portal kan akımındaki bu azalmanın vazopressin infüzyonuna dobutamin infüzyonu eklenmesiyle önlenebileceğini gösteren yayınlar da mevcuttur (117).

Martikainen ve ark. nın (118), endotoksik şokta portal kan akımına vazopressin ve norepinefrinin etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada, endotoksin ile septik şok oluşturulduktan sonra vazopressin ve norepinefrin infüzyonları başlanmış ve infüzyona 4 saat devam edilmiştir. Sonuçta vazopressinin portal kan akımını azalttığı fakat norepinefrinin anlamlı değişiklik yapmadığını göstermişlerdir. Aynı grup 2005 yılında yaptıkları çalışmada, epinefrin ve norepinefrinin portal kan akımına etkisini incelemişler. Çalışmada önceki çalışmada olduğu gibi endotoksin ile septik şok oluşturmuşlar ve sonrasında bir gruba epinefrin diğer gruba norepinefrin vermişlerdir. Epinefrin verilen grupta altı hayvandan beşinde portal kan akımı azalmış, norepinefrin grubunda ise portal kan akımının anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir (119).

Levosimendanın portal kan akımına etkisini gösteren, literatürde bir çalışma mevcuttur (6). Bu çalışmada levosimendan 200 µg/kg yükleme dozundan sonra 200 µg/kg/sa dozunda verilmiş ve 30 dk. sonra endotoksin infüzyonu ile septik şok oluşturulmuştur. Sonuçta ön tedavi olarak verilen levosimendanın portal kan akımını iyileştirdiğini göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda da düşük doz levosimendan verdiğimiz grupla diğer gruplar (I,II,III,V ve VI) karşılaştırıldığında portal kan akımının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu yükseklik istatistiksel olarak da anlamlıdır.

Yüksek doz levosimendan verilen grupta ise kan akımı I.,II. ve VI. gruptan yüksek, III. gruptan ise düşük bulundu; fakat bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Oldner ve ark ile aynı dozu kullandığımız bu grupta (Grup V) portal kan akımının düşük doz kullanılan gruptaki gibi yüksek olmaması bizim çalışmamızdaki ilaç uygulama zamanının daha geç olması ve yüksek doz ile var olan periferik dirençteki azalmanın daha da artmış olması ile açıklanabilir.

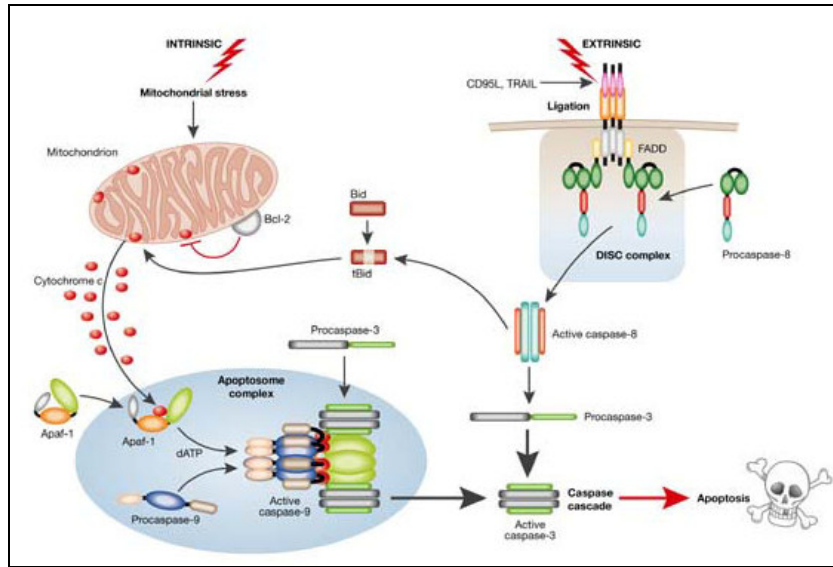
Sıklıkla programlı hücre ölümüne eşdeğer olarak kabul edilen apoptozis, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (62). Yunanca’da “ağaçların yapraklarını dökmesi” anlamına gelen apoptozis, ilk kez biyomedikal literatürde 1972 yılında Kerr tarafından “mitozun karşit anlamı” olarak kullanılmıştır (120). Apoptozis, intrasellüler bir olay olup, inflamatuvar bir yanıt oluşturmaksızın nükleer degradasyonla hücre ölümü gerçekleşir. Birçok yola apoptozise yol açabilir. Bununla birlikte, hücre içinde apoptozise yol açan, iyi bilinen 2 yola vardır: a. intrinsik (mitokondriyal) yol, b. ekstrinsik yol.

İntrinsik yol; irradyasyon, toksine maruziyet veya DNA hasarına bağlı mitokondriyal stres gibi hücrede stres yaratan faktörlerle başlatılır. Bu stres kaynakları Bcl-2 ailesinin mitokondri membranını stabilize veya destabilize eden pro-apoptotik (Bax, Bad, Bid) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-XL) üyelerini etkiler. Mitokondri membranının bütünlüğünün bozulması sitokrom C’nin sitoplazmaya çıkmasına yol açar (Sitokrom C mitokondri içinde antioksidan gibi görev yapar. Sitokrom C’nin mitokondriden sitoplazmaya salınması ile elektron transport zinciri kesintiye uğrar ve mitokondriden aşırı süperoksit üretilmesine neden olur). Sitokrom C Apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)’e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP’nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9’un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3’ü aktive eder. Aktive kaspaz’lar ise

DNAase enzimini aktive ederek DNA'nın parçalanmasına yol açar (121) (Şekil-5).

Ekstrinsik yol ise; ekstrasellüler ligandların (Fas-ligand [FasL], tümör nekrozis faktör [TNF]- $\alpha$ , ) hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere (Fas, TNF reseptörleri) bağlanması ile aktive olur. Bu aktive olan kompleks reseptörün sitoplazmik yüzeyinde bulunan FADD (Fas-associated death domain) ile interaksiyona girerek prokaspaz-8 aktifleştirerek kaspaz 3'ü aktive eder. Aktive kaspaz'lar ise DNAase enzimini aktive ederek DNA'nın parçalanmasına yol açar. Ayrıca aktive kaspaz 8 Bid'in kırılmasına neden olarak mitokondri membranında sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasını sağlar (Şekil-5) (122).

### Şekil-5. Apoptoz mekanizması



Deneyisel sepsis modelinde, Buchman ve ark. (123) tarafından ilk kez domuz endotel hücre kültüründe endotoksin ile oluşturulan sepsiste, apoptozisin karakteristik özelliği olan DNA parçalanması ile hücre ölümü tanımlanmıştır. Lipopolisakkarid ile indüklenen sepsiste ısı şok yanıtının Bcl-2 gibi apoptozu inhibe eden genlerin ekspresyonunu önleyerek endotel hücresinde apoptoza yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Koskinas ve ark. (124), sepsisten ölen yoğun bakım hastalarında karaciğerde gelişen histopatolojik değişiklikleri incelemişler ve çalışmaya dahil 15 hastadan 10'nunda hepatosellüler apoptozis olduğunu göstermişlerdir.

Hotchkiss ve ark. (125), tarafından MODS tanısı alan 20 hasta üzerinde yapılan postmortem çalışmada, lenfosit ve gastrointestinal epitel hücresinde apoptozisin arttığı; ayrıca bu dokularda Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı ve aktive kaspaz-3'ün arttığı gösterilmiştir. Buna karşın septik olmayan nedenlerden ölen hastalarda hem apoptozis, hemde kaspaz-3 aktivitesinde artış gösterilememiştir.

Deneyisel sepsis modelinde, parankimal dokulardan akciğer, karaciğer, böbrek ve intestinal yapılarda apoptozis artışı ve bu artışın serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ile doğru orantısı saptanmıştır (126). Ayala ve ark. (127) yaptıkları çalışmada, ÇLP ile sepsis oluşturduktan 24 saat sonra fare hepatosit hücrelerinde apoptozisin arttığını göstermişlerdir.

Parissis ve ark. (100) yaptıkları randomize plasebo kontrollü çalışmada, levosimendanın dekompanse kalp yetmezlikli hastalarda soluble apoptoz mediatörü olan Fas-Fas ligand'da anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, ağır kalp yetmezlikli hastalarda levosimendanın sFAS ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (128).

Hipertansif sıçanlarda, TUNEL tekniği ile kardiyomyosit hücrelerinde apoptozisin incelendiği bir çalışmada, levosimendanı oral olarak 7 gün vermişler ve sonuçta levosimendanın doz bağımlı olarak apoptozisi önlediğini göstermişlerdir (129).

Kobayashi ve ark. (130) sıçanlarda endotoksin ile oluşturdukları sepsiste hepatosellüler apoptozisde Bcl-2 ve Bax dağılımını incelemişler. Septik sıçanlarda hepatik parankimal hücrelerde apoptozisin arttığını, Bcl-2'nin azaldığını ve Bax'ın da göreceli olarak arttığını ortaya koymuşlardır.

Jao ve ark. (131) ÇLP ile oluşturdukları polimikrobiyal sepsiste, karaciğerde geç sepsis döneminde Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyonunun azaldığını, Bax ekspresyonunun arttığını, ağır DNA fragmantasyonu olduğunu ve erken ve geç sepsis de hepatik apoptotik hücre sayısının

arttığını, erken ve geç sepsiste PKC alfa ekspresyonunun azaldığını tespit etmişler. Sonuçta sepsis sırasında hepatik apoptozisin düzenlenmesinde PKC alfanın önemli rolü olduğu ve Bcl-2 protein ailesindeki değişikliklerin apoptozis ile yakından ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Maitra ve ark. (132) septik sıçanlarda karaciğerde ÇLP'den sonra kaspaz 3 aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada da sıçanlarda LPS enjeksiyonundan sonra karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısı ve kaspaz 3 aktivitesi incelenmiş, sonuçta kaspaz 3 aktivitesinin ve apoptotik hücre sayısının arttığı gösterilmiştir (133).

Bizim çalışmamızda da TUNEL yöntemi ile apoptozis incelemesinde sepsiste (Grup III) apoptotik hücre sayısının arttığı görülmektedir. Düşük doz levosimendan verilen grupta (Grup IV) apoptotik hücre sayısının azaldığı ancak esas olarak yüksek doz levosimendanın daha etkili olduğu ve bu grupta (Grup V) apoptotik hücre sayısının kontrol gruplarına benzer sayıda olduğu izlendi. Portal kan akımındaki değişikliklerle paralel olmayan bu bulgular, levosimendanın apoptozis üzerine etkilerinin hemodinamik iyileşme dışındaki başka bir yol aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir.

İmmunohistokimyasal olarak TUNEL sonucunda gözlenen TUNEL pozitif hücrelerin apoptotik hücreler olarak değerlendirilmesi sonucunda, oluşturulan sepsis modelinde gelişen apoptotik mekanizmada hangi yolağın (ekstresek ve/veya intresek) aktive olduğunu incelemek için indirekt immunohistokimyasal analiz yapıldı. Apoptotik mekanizmalarda rol oynayan intresek yolakta etkili ve mitokondrinin aktivasyonu sonucu salınımı gözlenen sitokrom-C, ile birlikte anti-apoptotik protein Bcl-2 ve apoptotik protein Bax dağılımı ile birlikte hem intresek hem de ekstresek yolağın son ürünü olan kaspaz-3 dağılımları incelenmiştir.

Sepsis sırasında meydana gelen apoptozisde ekstresek yolak mediatörü olan Fas/FasI ve TNF- $\alpha$ /TNFRI kullanılarak oluştuğunu gösteren birçok yayın mevcuttur. Çalışmamızda sitokrom C'nin sepsiste zayıf olarak salınımı gözlenmiştir. Bu da göstermektedir ki sepsiste mitokondriyel hasar oluşmakta ve meydana gelen apoptozisde az da olsa intresek yolak kullanılmaktadır. Kaspaz 3 salınımının sitokrom C'ye göre daha fazla olması

sepsiste karaciğerde apoptozisde ekstrensek yolağın daha etkin olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda sepsis oluşturulmuş tüm gruplarda Bax oranı Bcl-2 ye oranla daha fazla görülmesi bu dokularda apoptotik mekanizmaların aktive olduğunu desteklemektedir. Bununla beraber bu oranın Grup III'de Bax yönünden daha fazla olması, sepsis oluşturulmuş fakat levosimendan ile tedavi edilmiş gruplarda ise oranın bir miktar azaldığının gözlenmesi ile, sepsis sonucunda aktive olan apoptotik mekanizmaların tedavi ile bir miktar önlenemediği hem TUNEL sonuçları, hem immunohistokimya sonuçları ve hem de Bcl-2/Bax oranı sonuçları ile desteklenmektedir. Bu sonuçlar levosimendanın sepsiste olumlu hemodinamik etkilerinin yanında antiapoptotik etkisinin de olabileceğini düşündürmektedir.

Xie ve ark. (134), endotoksin ile sepsis oluşturdukları farelerde, TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın plazma konsantrasyonlarını araştırdıkları çalışmada; TNF- $\alpha$ 'nın endotoksin infüzyonunun başlamasından 1 saat sonra pik yaptığını ve daha sonra giderek azaldığını ve 5. saatte kontrol ile aynı düzeye geldiğini, IL-6'nın ise 3. saatte pik yaptığını ve 8. saate kadar yüksekliğin devam ettiğini göstermişlerdir.

Zager ve ark. (135), lipopolisakkarit vererek oluşturdukları deneysel sepsiste lipopolisakkarit verildikten 2 saat sonra TNF- $\alpha$ 'nın plazma konsantrasyonunun arttığını, levosimendan ile tedavi sonrası TNF- $\alpha$  plazma konsantrasyonunda anlamlı değişiklik yapmadığını ileri sürmüşlerdir.

Dekompanse kalp yetmezlikli hastalarda levosimendanın ve dobutaminin inflamatuvar ve apoptozis üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; levosimendanın TNF- $\alpha$ 'nın plazma konsantrasyonunu tedaviden 48 saat sonra kontrol ve dobutamin grubu ile karşılaştırdıklarında anlamlı olarak azalttığı, IL-6'nın plazma konsantrasyonunda azalttığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı, apoptotik mediatörlerden sFas ve sFasL'nin plazma konsantrasyonlarında anlamlı azalmanın olduğu gösterilmiştir. (9).

Avgeropoulou ve ark. (101), ağır dekompanse kalp yetmezlikli hastalarda levosimendanın IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'nın plazma konsantrasyonunu azalttığını, fakat TNF- $\alpha$ 'daki bu azalmanın anlamlı olmadığını göstermişlerdir.

Kyrzopoulos ve ark. (102), kronik kalp yetmezlikli hastalarda levosimendan infüzyonunun başlamasından 72 saat sonra IL-6'nın plazma konsantrasyonunun anlamlı azaldığını göstermişlerdir.

TNF- $\alpha$  sepsis patogeneğinde merkezi rol oynar. Endotoksin verilmesi ile TNF- $\alpha$  düzeylerinde belirgin artışla beraber sepsis kliniğinin geliştiği ve ekzojen TNF- $\alpha$  uygulanması ile gram (-) sepsis ve şokun klinik, laboratuvar ve histopatolojik bulgularını taklit eden bir tablonun oluştuğu gösterilmiştir. TNF- $\alpha$ 'ya karşı geliştirilen antikörlerin ise endotoksin uygulanmadan önce verilmesinin mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (57).

Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada, endotoksin infüzyonundan sonra verilen epinefrinin TNF- $\alpha$ 'nın salınımını baskıladığı, IL-10 salınımını ise artırdığı gösterilmiştir (45).

Çalışmamızda ise sepsiste karaciğer dokusunda TNF- $\alpha$  salınımının arttığı ve levosimendan ile tedavi sonucu azaldığı gözlenmiştir. Benzer olarak IL-6 ve IL-10 salınımlarının sepsis grubunda düşük olduğu, levosimendan ile tedavi sonrası salınımlarının artmış olduğu görüldü.



## VI. SONUÇ

Etyopatogenezinde artan bilinenlere ve yoğun bakım tedavilerinde bütün gelişmelere rağmen sepsis halen mortalitesi yüksek bir tablodur. Bunun öncelikli nedenlerinden bir tanesi inflamatuvar yanıtın koordinasyonunda konak immün yanıtın ve hastanın tanısının konulduğu ve tedavinin başladığı zamandaki inflamatuvar yanıtın durumunun bilinmemesidir. İnflamatuvar süreci kontrol edebilir tedavi yöntemleri denenmektedir. Levosimendanın sepsise bağlı myokardiyal depresyonda ve sistemik ve intestinal oksijen sunumunda olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Sepsiste levosimendanın inflamatuvar mediatörler ve apoptozis üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışma henüz yoktur.

Deneyisel sepsis modelinde levosimendanın, karaciğer kan akımı, karaciğer dokusunda inflamatuvar sitokin düzeyi, mitokondriyal disfonksiyona etkisi ve apoptozis ile apoptotik yollara etkilerini incelediğimiz bu çalışmada sonuç olarak:

1. Hemodinamik olarak bilinen ve beklenen etkileri oluşturmuştur.
2. Düşük doz levosimendan ile portal kan akımı artar iken; yüksek doz levosimendan kullanıldığında portal kan akımını arttırıcı etkisi gözlenmemiştir.
3. Karaciğer dokusunda, sepsis kaskadında rol alan proinflamatuvar sitokin TNF- $\alpha$ 'yı azaltır iken; antiinflamatuvar sitokinleri, IL-6 ve IL-10 arttırmıştır.
4. Karaciğer dokusunda sepsise bağlı apoptozisi azaltmıştır. Ancak yüksek doz ile bu azalma daha belirgin olmuştur. Bu da apoptozis üzerine etkisinin portal kan akımındaki artıştan bağımsız olarak gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ayrıca sepsise bağlı apoptozisin ağırlıklı olarak ekstresek yolak üzerinden gerçekleştiği görünmekte; bu da levosimendanın apoptozisi mitokondriyal disfonksiyonu önleyerek değil de; sitokinler üzerindeki olumlu etkileri ile azalttığını düşündürmektedir.

## VII. ÖZET

Bu çalışmada, deneysel sepsis modelinde, levosimendanın karaciğer kan akımı, karaciğer dokusunda inflamatuvar sitokin düzeyi, mitokondriyal disfonksiyona etkisi ve apoptozis ile apoptotik yollara etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Deney, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen Wistar albino cinsi, 38 erişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar randomize olarak 6 gruba ayrıldı. I. ve II. gruba sham operasyonu uygulandı. III., IV. ve V. Grupta çekal ligasyon ve perforasyon tekniği ile sepsis oluşturuldu. VI. gruptaki hayvanlara hiçbir işlem uygulanmadı ve saf kontrol olarak ayrıldı. İşlemlerden 24 saat sonra Grup I ve Grup III'e % 5 dextroz infüzyonu verildi. Levosimendan, Grup II ve Grup IV'e 100 µg/kg 10 dk yükleme dozundan sonra 100 µg/kg/sa idame dozu, Grup V'e 200 µg/kg 10 dk yükleme dozundan sonra 200 µg/kg/sa idame dozu 4 saat verildi. Sıçanların kan basınçları ve kalp atım hızları deney süresince kayıt edildi. İnfüzyon sonrası sıçanların portal kan akımı Doppler USG ile ölçüldü, sonra sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Karaciğer dokuları histolojik inceleme için alındı. Doku morfolojisi hematoksil-eozin boyaması, apoptotik hücre dağılımı TUNEL yöntemi ve TNF-α, IL-6, IL-10, Bcl-2, Bax, sitokrom C ve kaspaz-3 dağılımı indirek immunohistokimya tekniği ile incelendi.

Levosimendan verilen gruplarda (II,IV ve V) yükleme dozundan sonra OAB'ın düştüğü ve kalp atım hızının arttığı görüldü. Karaciğer portal kan akımı düşük doz levosimendan grubunda (Grup IV) diğer gruplardan daha yüksek bulundu. TUNEL incelemesinde; TUNEL pozitif hücre sayısının Grup I'de % 1.9±0.23, Grup II'de % 1.5±0.22, Grup III'de % 11.3±0.73, Grup IV'de % 6.4±0.34, Grup V'de % 2.5±0.22 ve Grup VI'da da 0 olduğu saptandı. Grup I değerinin, Grup II ve Grup V karşılaştırılması ile, Grup II değerinin Grup V ve VI ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel anlam gözlenmez iken (P>0.05), diğer tüm verilerin karşılaştırılmaları istatistiksel olarak anlamlı (P<0.001) bulunmuştur. Grup I'de TNF-α immünoreaktivitesinin zayıf ve yer yer orta şiddette, IL-10 ve Bcl-2 immünoreaktivitesinin zayıf şiddette ve IL-6,

Bax, sitokrom-C ve kaspaz-3 immünoaktivitesinin negatif olduğu gözlemlendi. Grup II'de TNF- $\alpha$ , IL-10 ve Bax immünoaktivitesinin zayıf şiddette ve IL-6, Bcl-2, sitokrom-C ve kaspaz-3 immünoaktivitesinin negatif olduğu gözlemlendi. Grup III'de TNF- $\alpha$  ve kaspaz-3 immünoaktivitesinin kuvvetli pozitif, IL-6, IL-10 ve sitokrom-C immünoaktivitesinin zayıf şiddette, Bax immünoaktivitesinin orta şiddette ve Bcl-2 immünoaktivitesinin negatif olduğu gözlemlendi. Grup IV'de TNF- $\alpha$ , Bax ve kaspaz-3 immünoaktivitesinin orta şiddette, IL-6 ve IL-10 immünoaktivitesinin kuvvetli şiddette ve Bcl-2 ve sitokrom-C immünoaktivitesinin negatif olduğu gözlemlendi. Grup V'de TNF- $\alpha$  ve IL-6 immünoaktivitesinin zon 3'de orta şiddette, zon 2'de zayıf şiddette ve zon 1'de negatif olduğu gözlemlendi. IL-10 immünoaktivitesinin zon 3'de kuvvetli pozitif, diğer zonlarda orta şiddette olduğu, Bax ve kaspaz 3 immünoaktivitesinin orta şiddette olduğu ve Bcl-2 ve sitokrom-C immünoaktivitesinin negatif olduğu gözlemlendi. Grup VI'da TNF- $\alpha$  ve Bax immünoaktivitesinin çok zayıf şiddette, Bcl-2 immünoaktivitesinin zayıf şiddette, IL-10 immünoaktivitesinin yer yer zayıf şiddette ve IL-6, sitokrom-C ve kaspaz-3 immünoaktivitesinin negatif olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak; deneysel sepsis modelinde levosimendanın karaciğer dokusunda, sepsis kaskadında rol alan proinflatuar sitokin TNF- $\alpha$ 'yı azalttığı; antiinflatuar sitokinler IL-6 ve IL-10'u arttırdığı ve sepsise bağlı apoptozisi önlediği gösterildi.

## VIII. SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effects of levosimendan treatment on liver blood flow, inflammatory cytokine levels in liver tissue, mitochondrial dysfunction and apoptosis in an experimental sepsis model.

Thirty-eight adult male Wistar albino rats weighing 220-250 g were included in the study. Rats were randomly divided into 6 groups. Group I and II had the sham procedure. Group III, IV and V contracted intraabdominal sepsis via cecal ligation and puncture. After 24 hours of the procedures %5 dextrose infusion was administered intravenously in Group I and III. Levosimendan was given to Groups II and IV as a loading dose of 100 µgr/kg in 10 min, followed by continuous infusion of 100 µgr/kg/h and to Group V as a loading dose of 200 µgr/kg in 10 min, followed by continuous infusion of 200 µgr/kg/h for 4 hours. Blood pressure and heart rate values of each rat were recorded continuously throughout the experiment. The rats were sacrificed by cervical dislocation after portal blood flow measurement by Doppler USG was monitored at the end of Levosimendan infusion. Hepatic tissues were then dissected to establish histological changes associated with the infusion. Tissue samples were stained with hematoxylin-eosin for examination of morphological alterations and sections were stained via TUNEL method in order to detect apoptotic cells. Hepatic tissue samples were also observed for TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, Bcl-2, Bax, cytochrom C and caspase-3 by using indirect immunohistochemical technique.

Decrease in mean arterial pressure (MAP) and increase in heart rate (HR) after the bolus dose was demonstrated in levosimendan treated groups (II, IV, V). Portal blood flow was higher in Group IV when compared with the other groups. TUNEL positive cells were % 1.9 $\pm$ 0.23, % 1.5 $\pm$ 0.22, % 11.3 $\pm$ 0.73, % 6.4 $\pm$ 0.34, % 2.5 $\pm$ 0.22 and % 0 in Groups I-VI respectively. There was no significant difference neither in comparison of Group I between Group II and V nor Group II compared with Group V and Group VI. ( $p > 0.05$ ) All other data comparisons between groups were observed to be statistically different. ( $p < 0.001$ ) In Group I, immunoreactivity of TNF- $\alpha$  was low, IL-6 and Bcl-2 was moderate and IL-6, Bax, cytochrom C and caspase-3 was

negative. In Group II, immunoreactivity of TNF- $\alpha$ , IL-10 and Bax was low, IL-6, Bcl-2, cytochrom C and caspase-3 was negative. In Group III, immunoreactivity of TNF- $\alpha$  and caspase-3 was highly positive, IL-6, IL-10 and cytochrom C was low, Bax was moderate and Bcl-2 was negative. In Group IV, immunoreactivity of TNF- $\alpha$ , Bax and caspase-3 was moderate, IL-6 and IL-10 was highly positive, Bcl-2 and cytochrom C was negative. In Group V, immunoreactivity of TNF- $\alpha$  and IL-6 was moderate in zone 3, low in zone 2 and negative in zone 3, IL-10 immunoreactivity was moderate except zone 3 that was highly positive, Bax and caspase-3 immunoreactivity was moderate, Bcl-2 and cytochrom C immunoreactivity was negative. In Group VI, immunoreactivity of TNF- $\alpha$  and Bax was extremely low, Bcl-2 was low, IL-10 was low in some of the zones and IL-6, cytochrom C and caspase-3 was negative.

In conclusion, this study demonstrated that in experimental sepsis model levosimendan decreases proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ ; increases anti-inflammatory cytokines IL-6, IL-10 and reduces sepsis-induced apoptosis.

## IX. KAYNAKLAR

1. Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med* 2001;27:19-31.
2. Benjamin E, Leibowitz AB, Oropello J et al. Systemic hypoxic and inflammatory syndrome: An alternative designation for "sepsis syndrome". *Crit Care Med* 1992;20:680-2.
3. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-77.
4. Haupt MT, Gilbert EM, Carlson RW. Fluid loading increases oxygen consumption in septic patients with lactic acidosis. *Am Rev Respir Dis* 1985;131(6):912-6.
5. Packman MJ, Rackow EC. Optimum left heart filling pressure during fluid resuscitation of patients with hypovolemic and septic shock. *Crit Care Med* 1983;11:165-9.
6. Oldner A, Konrad D, Weitzberg E, et al. Effects of levosimendan, a novel inotropic calcium sensitizing drug, in experimental septic shock. *Crit Care Med* 2001;29:2185-93.
7. Versamidis K, Varsamidou E, Mavropoulos G. Doppler ultrasonographic evaluation of hepatic blood flow in clinical sepsis. *Ultrasound Med Biol* 2003;29(9):1241-4.
8. Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, et al. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J Surg Res* 2000;89(1):26-30.
9. Adamopoulos S, Parissis JT, Iliodromitis EK, et al. Effects of levosimendan versus dobutamine on inflammatory and apoptotic pathways in acutely decompensated chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2006;98(1):102-6.

10. Irwin R, Rippe J. Intensive Care Medicine, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2008:163.
11. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001;29:1303-10.
12. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. Crit Care Med 2006;34:344-53.
13. Wichmann MW, Inthorn D, Andress HJ, et al: Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: The influence of patient gender on disease process and outcome. Intensive Care Med 2000;26:167-72.
14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American Collage of Chest Physicans. Society of Critical Care Medicine. Chest 1992;101:1644-55.
15. Hoyert DL, Arias E, Smith BL, et al. Deaths: final data for 1999. Natl Vital Stat Rep 2001;49(8):1-113.
16. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann Intern Med 1990;113:227-42.
17. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-54.
18. Arslan H, Gürdoğan K. Yoğun bakım ünitelerinde gözlenen hastane infeksiyonları. Hastane infeksiyon Derg 1999;3(3):165-70.
19. Yosunkaya A, Tuncer S, Reisli R, ve ark. Reanimasyon ünitemizde 1999-2000 yılları arasında gözlenen hastane infeksiyonları. Hastane infeksiyon Derg 2002;6(2):92-7.
20. Çetin ÇB, Turgut H, Kaleli İ, ve ark. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesinde nozokomiyal infeksiyonlar. Hastane infeksiyon Derg 2002;6(2):98-101.

21. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34(2):344-53.
22. Silva E, Pedro M, Sogayar A, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care* 2004;8(4):251-60.
23. Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 1994;154:26.
24. Kieft H, Hoepelman AI, Zhou W, et al. The sepsis syndrome in a Dutch University Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:2241.
25. Martin MA. Epidemiology and clinical impact of gram-negative sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1991;5:793.
26. Badley AD, Steckelberg JM. Sepsis Syndrome. In: Wilson WR, Sande MA (eds): *Current Diagnosis and Treatment In Infectious Diseases*. New York: McGraw-Hill, 2001:231-9.
27. Lugtenberg B, Van Alphen A. Molecular architecture and function of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1983;737:51-115.
28. Ortatatlı M, Özgüven V, Şengül A. Sepsis ve ağır infeksiyonların tanı ve takibinde yeni bir marker: Prokalsitonin. *Flora* 1999;4:151-5.
29. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115: 457-69.
30. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, et al. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 1994;120:771-83.
31. Guidet B, Barakett V, Vasal T, et al. Endotoxemia and bacteriemia in patients with sepsis syndrome in the intensive care unit. *Chest* 1994;106:1194-201.
32. Saez-Llorenz X, McCracken GH. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology and management. *J Pediatr* 1993;123:497-508.
33. Doğanay M. Sepsis. Yeni tanımlar ve patogenezi. *Flora* 1996;1:3-10.



34. Bauer KA, Cate H, Barzegar S et al. Tumor necrosis factor infusions have a prokoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. *Blood* 1989;74:165-72.
35. Calandra T, Gerain J, Heumann D, et al. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am J Med* 1991;91(1):23-9.
36. Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991;163:1177-84.
37. Levi M, Cate H, Poll T, et al. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 1993;270:975-9.
38. Poll T, Buller HR, Cate H. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 1990;322:1622-7.
39. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207.
40. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997;112:235.
41. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993;21(Suppl 10):447-63.
42. Chapman PB, Lester TJ, Casper ES, et al. Clinical pharmacology of recombinant tumour necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1987;5:1942-51.
43. Selby P, Hobbs S, Viner C, et al. Tumour necrosis in man: clinical and biological observations. *Br J Cancer* 1987;56:803-8.
44. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, et al. Recombinant human tumour necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: Phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J Clin Oncol* 1988;6:344-50.

45. van der Poll T, Buller HR, ten Cate HT, et al. Activation of coagulation after administration to TNF to normal subjects. *N Engl J Med* 1990;322:1622-7.
46. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, et al. Detection of circulating tumour necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988;318: 1481-5.
47. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, et al. Circulating interleukin-1 and tumour necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 1990;160: 79-84.
48. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988;166:147-53.
49. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989;321:280-7.
50. Emerson TE, Lindsey DC, Jesmok GJ, et al. Efficacy of monoclonal antibody against tumour necrosis factor alpha in an endotoxemic baboon model. *Circ Shock* 1992;38:75-84.
51. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, et al. Antibodies to cachexin/tumour necrosis factor reduces interleukin-1 $\beta$  and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989;170:1627-33.
52. Hinshaw LB, Emerson TE, Taylor FB, et al. Lethal *Staphylococcus aureus*-induced shock in primates prevention of death with anti- TNF antibody. *J Trauma* 1992;33: 568-73.
53. Redl H, Schlag G, Ceska M, et al. Interleukin-8 release in baboon septicemia is partially dependent on tumour necrosis factor. *J Infect Dis* 1993;167:1464-6.
54. Munoz C, Misset B, Fitting C, et al. Dissociation between plasma and monocyte associated cytokines during sepsis. *Eur J Immunol* 1991;21:2177-84.
55. Borden EC, Chin P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med* 1994;123:824-9.

56. Dinarello CA. The endogenous pyrogens in host defense interactions. *Hosp Pract* 1989;24:111-28.
57. Blackwell TS, Chirstman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996;77:110-17.
58. Pritts T, Hungness E, Wang Q, et al. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg* 2002;183(4):372-83.
59. Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML. Cytokines, sepsis and immunomodulation. *Br J Surg* 1993;80:289-97.
60. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential role as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med* 2002;30:58-63.
61. Marchant A, Deviere J, Byl B, et al. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* 1994;343:707-8.
62. Alles A, Alley K, Barrett JC et al. Apoptosis: a general comment. *FASEB J* 1991;5:2127-8.
63. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999;107:489-506.
64. Park DS, Stefanis L, Greene LA. Ordering the Multiple Pathways of Apoptosis. *Trends Cardiovasc Med* 1997;7:294-301.
65. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Oncologist* 1999;4(4):332-9.
66. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395-419.
67. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001;322:1536-8.
68. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
69. Hetts SW. To die or not to die. *JAMA* 1998;279:300-7.
70. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *CHEST* 2000;117:1771-7.
71. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001;13:102-7.

72. Vincent JL. International Sepsis Forum. Hemodynamic support in septic shock. *Intensive Care Med* 2001;27 (Suppl 1):80-92.
73. Hoogenberg K, Smit AJ, Girbes ARJ. Effects of low-dose dopamine on renal and systemic hemodynamics during incremental norepinephrine infusion in healthy volunteers. *Crit Care Med* 1998;26:260-5.
74. Lherm T, Troche G, Rossignol M, et al. Renal effects of low-dose dopamine in patients with sepsis syndrome or septic shock treated with catecholamines. *Intensive Care Med* 1996;22:213-9.
75. Bellomo R, Chapman M, Finfer S, et al. Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group. *Lancet* 2000;356(9248):2139-43.
76. Kellum JA, M Decker J. Use of dopamine in acute renal failure: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2001;29(8):1526-31.
77. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008;36(1):296-327.
78. Meier-Hellmann A, Bredle DL, Specht M, et al. The effects of low-dose dopamine on splanchnic blood flow and oxygen utilization in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 1997;23:31-37.
79. Marik PE, Mohedin M. The contrasting effects of dopamine and norepinephrine on systemic and splanchnic oxygen utilization in hyperdynamic sepsis. *JAMA* 1994;272:1354-7.
80. Hannemann L, Reinhart K, Grenzer O, et al. Comparison of dopamine to dobutamine and norepinephrine for oxygen delivery and uptake in septic shock. *Crit Care Med* 1995;23:1962-70.
81. Schreuder WO, Schneider AJ, Groeneveld ABJ, et al. Effect of dopamine vs norepinephrine on hemodynamics in septic shock. *Chest* 1989;95:1282-8.
82. Martin C, Perrin G, Saux P, et al. Effects of norepinephrine on right ventricular function in septic shock patients. *Intensive Care Med* 1994;20:444-7.

83. Levy B, Bollaert PE, Charpentier C, et al. Comparison of norepinephrine and dobutamine to epinephrine for hemodynamics, lactate metabolism, and gastric tonometric variables in septic shock: A prospective, randomized study. *Intensive Care Med* 1997;23:282-7.
84. Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit Care Med* 2004;32(9):1928-48.
85. Woolsey CA, Coopersmith CM. Vasoactive drugs and the gut: is there anything new?. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:155-9.
86. Le Tulzo Y, Seguin P, Gacouin A, et al. Effects of epinephrine on right ventricular function in patients with severe septic shock and right ventricular failure: A preliminary study. *Intensive Care Med* 1997;23:664-70.
87. Zhou SX, Qiu HB, Huang YZ, et al. Effects of norepinephrine, epinephrine, and norepinephrine-dobutamine on systemic and gastric mucosal oxygenation in septic shock. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:654-8.
88. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, et al. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest* 2001;120(3):989-1002.
89. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001;345(8):588-95.
90. Slawsky MT, Colucci WS, Gottlieb SS, et al. Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure. *Circulation* 2000;102:2222-7.
91. Nieminen MS, Akkila J, Hasenfuss G, et al. Hemodynamic and neurohumoral effects of continuous infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1903-12.
92. Singh BN, Lilleberg J, Sandell EP, et al. Effects of levosimendan on cardiac arrhythmias: electrophysiologic and ambulatory electrocardiographic findings in Phase II and Phase III clinical studies in cardiac failure. *Am J Cardiol* 1999;83:6-20.
93. Figgitt DP, Gillies PS, Goa KL. Levosimendan. *Drugs* 2001;61:613-27.

94. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, et al. Levosimendan, a novel Ca<sup>2+</sup> sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat arterial myocytes. *Eur J Pharmacol* 1997;333(2-3):249-59.
95. Michaels AD, McKeown B, Kostal M, et al. Effects of intravenous levosimendan on human coronary vasomotor regulation, left ventricular wall stress, and myocardial oxygen uptake. *Circulation* 2005;111:1504-9.
96. Pataricza J, Hohn J, Petri A, et al. Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52:213-7.
97. Adamopoulos S, Parissis J, Kremastinos D. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3(5):517-26.
98. Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, et al. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2001;103:220-5.
99. Skudicky D, Bergemann A, Sliwa K, et al. Beneficial effects of pentoxifylline in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and carvedilol. *Circulation* 2001;103:1083-8.
100. Parissis JT, Adamopoulos S, Antoniades C, et al. Effects of levosimendan on circulating proinflammatory cytokines and soluble apoptosis mediators in patients with decompensated advanced heart failure. *Am J Cardiol* 2004;93:1309 -12.
101. Avgeropoulou C, Andreadou I, Sophia Markantonis-Kyroudis T, et al. The Ca<sup>2+</sup> sensitizer levosimendan improves oxidative damage, BNP and pro-inflammatory cytokine levels in patients with advanced decompensated heart failure in comparison to dobutamine. *Eur J Heart Fail* 2005;7:882-7.
102. Kyrzopoulos S, Adamopoulos S, Parissis JT, et al. Levosimendan reduces plasma B-type natriuretic peptide and interleukin 6, and improves central hemodynamics in severe heart failure patients. *Int J Cardiol* 2005;99:409-13.

103. Matejovic M, Krouzecky A, Radej J, et al. Successful reversal of resistant hypodynamic septic shock with levosimendan. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005;49:127.
104. Noto A, Giacomini M, Palandi A, et al. Levosimendan in septic cardiac failure. *Intensive Care Med* 2005;31:164-5.
105. Powell BP, De Keulenaer BL. Levosimendan in septic shock: a case series. *Br J Anaesth* 2007;99:447-8.
106. Morelli A, De Castro S, Teboul JL, et al. Effects of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial dysfunction. *Intensive Care Med* 2005;31:638-44.
107. Gheorghide M, Teerlink JR, Mebazaa A. Pharmacology of New Agents for Acute Heart Failure Syndromes. *Am J Cardiol* 2005;96 (suppl):68-73.
108. Abi-Gerges N, Tavernier B, Mebazaa A, et al. Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1196-204.
109. Zhong J, Hwang T-C, Adams HR, et al. Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997;273:2312-24.
110. Liu S, Schreur KD. G protein-mediated suppression of L-type  $Ca^{2+}$  current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995;268:339-49.
111. Wu LL, Liu MS. Altered ryanodine receptor of canine cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism in endotoxin shock. *J Surg Res* 1992;53:82-90.
112. Dong LW, Wu LL, Ji Y, et al. Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism during the hypodynamic phase of sepsis. *Shock* 2001;16:33-39.
113. Barraud D, Faivre V, Damy T, et al. Levosimendan restores both systolic and diastolic cardiac performance in lipopolysaccharide-treated

- rabbits: comparison with dobutamine and milrinone. *Crit Care Med* 2007;35(5):1376-82.
114. Dubin A, Maskin B, Murias G, et al. Effects of levosimendan in normodynamic endotoxaemia: a controlled experimental study. *Resuscitation* 2006;69(2):277-86.
  115. Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, et al. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Crit Care* 2006;10(1):15.
  116. Krejci V, Hildebrand LB, Jakob SM, et al. Vasopressin in septic shock: effects on pancreatic, renal, and hepatic blood flow. *Crit Care* 2007;11(6):129.
  117. Martikainen TJ, Uusaro A, Tenhunen JJ, et al. Dobutamine compensates deleterious hemodynamic and metabolic effects of vasopressin in the splanchnic region in endotoxin shock *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48(8):935-43.
  118. Martikainen TJ, Tenhunen JJ, Uusaro A, et al. The effects of vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics and metabolism in endotoxin shock. *Anesth Analg* 2003;97(6):1756-63.
  119. Martikainen TJ, Tenhunen JJ, Giovannini I, et al. Epinephrine induces tissue perfusion deficit in porcine endotoxin shock: evaluation by regional CO<sub>2</sub> content gradients and lactate-to-pyruvate ratios. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(3):586-92.
  120. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
  121. Hague A, and Paraskeva C. Apoptosis and disease: a matter of cell fate. *Cell Death Differ* 2004;11(12):1366-72.
  122. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, et al. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005;78(2):325-37.
  123. Buchman TG, Abello PA, Smith EH, et al. Induction of heat shock response leads to apoptosis in endothelial cells previously exposed to endotoxin. *Am J Physiol* 1993;265(1 Pt 2):165-70.



124. Koskinas J, Gomatos IP, Tiniakos DG, et al. Liver histology in ICU patients dying from sepsis: a clinico-pathological study. *World J Gastroenterol* 2008;14(9):1389-93.
125. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27(7):1230-51.
126. Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, et al. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 1997;7(4):247-53.
127. Ayala A, Evans TA, Chaudry IH. Does hepatocellular injury in sepsis involve apoptosis? *J Surg Res* 1998;76(2):165-73.
128. Trikas A, Antoniadis C, Latsios G, et al. Long-term effects of levosimendan infusion on inflammatory processes and sFas in patients with severe heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006;8(8):804-9.
129. Louhelainen M, E Vahtola, P Kaheinen, et al. Effects of levosimendan on cardiac remodeling and cardiomyocyte apoptosis in hypertensive Dahl/Rapp rats. *Br J Pharmacol* 2007;150(7):851-61.
130. Kobayashi M, Tsujitani S, Kurisu Y, et al. Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. *Hepatogastroenterology* 2002;49(48):1602-6.
131. Jao HC, Yang RC, Hsu HK, et al. The decrease of PKC $\alpha$  is associated with hepatic apoptosis at early and late phases of polymicrobial sepsis. *Shock* 2001;15(2):130-4.
132. Maitra SR, Shapiro MJ, Bhaduri S, et al. Effect of chemically modified tetracycline on transforming growth factor-beta1 and caspase-3 activation in liver of septic rats. *Crit Care Med* 2005;33(7):1577-81.
133. Hamada E, Nishida T, Uchiyama Y, et al. Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin. *J Hepatol* 1999;30(5):807-18.
134. Xie GQ, Jiang JX, Chen YH, et al. Induction of acute hepatic injury by endotoxin in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1(4):558-64.

135. Zager RA, Johnson AC, Lund S, et al. Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290(6):1453-62.