

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL AKCİĞER HASARI OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
İNTRATRAKEAL N-ASETİLSİSTEİN, METİLPREDNİZOLON VE VİTAMİN
KOMPLEKSİ UYGULAMASININ AKCİĞERLER ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. IŞIK GÜLDAĞ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. GÖNÜL TEZCAN KELEŞ**

MANİSA 2008

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başta Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Melek Sakarya olmak üzere, tüm öğretim üyelerime, tez çalışmamın her aşamasında tüm sabır ve fedakarlığı ile daima yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Gönül Tezcan Keleş'e, tezimin ortaya çıkmasında büyük emeği olan Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyelerinden Doç. Dr. Seda Vatansever'e ve Arş.Gör.Dr.Işıl Aydemir'e, deneysel sepsis modelinin oluşturulmasında emeği geçen Mikrobiyoloji A.D. öğretim üyelerinden Doç. Dr. Semra Kurutepe' ye, dört yıllık asistanlık eğitim sürecimde birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım arkadaşlarıma, hayatım boyunca sevgi ve özverilerini benden esirgemeyen, hep yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Işık Güldağ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
III. MATERYAL METOD	24
IV. BULGULAR	30
V. TARTIŞMA	36
VI. SONUÇ	43
VII. ÖZET	44
VIII. SUMMARY	46
IX. KAYNAKLAR	48

KISALTMALAR

AAH: Akut akciğer hasarı

ADH: Vazopressin

AP-1: Aktivatör protein -1

ASSS: Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu

ÇOY: Çoklu organ yetmezliği

CINC: Sitokinlerle indüklenen nötrofil kemoattractan molekülleri

DAH: Difüz alveolar hasar

EDRF: Endotel kaynaklı gevşeme faktörü

ELAM-1: Endotelial lökosit adhezyon molekülü-1

FMA: Forbol miristat asetat

GM-CSF: Granülosit- makrofaj koloni stimüle edici faktör

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HOCl: Hipoklorik asit

ICAM-1: İntrasellüler adezyon molekülü-1

IFN- γ : İnterferon γ

IL-1 ra: İnterlökin-1 reseptör antagonisti

LipNAC: Lipozomal NAC

Lip α -Tok: Lipozomal α - Tokoferol

LPS: Lipopolisakkarit

LTB₄: Leukotrien - B₄

MCP-1: Monosit kemotaktik protein – 1

MIP - 1 α : Makrofaj inflamatuvar protein -1 α

MIP-2: Makrofaj inflamatuvar protein

NAC: N–Asetilsistein

NF - κ B: Nükleer Faktör - κ B

NO: Nitrik oksit

O₂⁻: Süperoksid anyon radikalleri

OH⁻: Hidroksil radikalleri

ONOO⁻: Peroksinitrat

PAF: Platelet aktive edici faktör

PMNL: Polimorf nüveli lokosit

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell expressed and secreted

SİYS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

SLPI: Sekretuar lökosit proteaz inhibitörü

SOR: Serbest oksijen radikalleri

STNFR: Solubl TNF reseptörü

TNF- α : Tümör nekrozis-alfa

α -TOC: α -Tokoferol

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

I.GİRİŞ

Endotoksemi veya sepsis , infeksiyona cevap sistemik inflamatuvar bir yanıttır. Bu durum, ciddi şok ve çoklu organ yetmezliğine sebep olabilir (1) ve yoğun bakım hastalarında önemli ölüm nedenlerinden biridir (2). Değişik etyolojilere bağlı akut akciğer hasarı (AAH) ve onun daha ciddi formu olan Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu (ASSS) ' da , yoğun bakım hastalarında sık görülen, yüksek mortaliteye sahip ciddi bir klinik problemdir (3). Altta yatan hastalığın tedavisi ve mekanik ventilasyon ile akciğer koruyucu tedavi stratejileri, başarılı klinik sonuçlar sağlamaktadır (4). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, endotoksemiye bağlı AAH patogenezinde, akciğerde nitrik oksit (NO), serbest oksijen radikalleri ve sitokin üretiminin rolü olduğunu göstermiştir.

Serbest oksijen radikalleri, septik şok patofizyolojisinde ve onunla ilişkili doku hasarında merkezi bir rol oynar (5-7). İnsanda gelişen septik şokta , antioksidan mekanizmada azalma, serbest radikal konsantrasyonunda artmayla beraber oksidan-antioksidan dengede bozulma olduğu düşünülür (5). Serbest radikaller sepsisle ilişkili ASSS, septik şok ve çoklu organ yetmezliği gibi geniş bir hastalık spektrumunda bulunur.

Akciğer hasarını azaltmaya yönelik denemeler, artmış inflamatuvar sitokin/kemokin üretiminin sinyal iletim yollarının yeniden düzenlenmesi ve oksidatif hücre hasarını sınırlamaya yönelik oksidan/antioksidan dengenin onarımı üzerine odaklanmıştır.

N-Asetilsistein (NAC) antioksidan bir maddedir.Yoğun bakımda serbest radikal yakalayıcısı olarak yeni bir yaklaşım getirmiştir. Potansiyel yararlı etkilerini iki yoldan gerçekleştirir. Bunlardan biri hipoklorik asit, hidroksil radikalleri ve hidrojenperoksit gibi serbest radikallerin primer yakalayıcısı olması, diğeri endotelial kökenli gevşetici faktör (NO) ve glutatyon için sülfidril grubu donörü olmasıdır (8,9).

Metilprednizolon oral veya parenteral yoldan antiinflamatuvar ve immünsüpresif olarak kullanılan glukokortikoidlerdir. Kortikosteroidler (KS) IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF α ve granülosit- makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi inflamatuvar olaylara aracılık eden sitokinlerin transkripsiyonunu inhibe eder (10). Kortikosteroidler NF – κ B ve aktivatör protein (AP)- 1 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşir (11-13). AP-1 ve /veya NF – κ B, IL-1, 2, 3, 6, 8, TNF α , GM-CSF ve RANTES (regulated upon Activation, Normal T-cell expressed and secreted) gibi inflamasyonda merkezi rol oynayan gen ürünlerinin yeniden düzenlenmesini sağlar. Kortikosteroidler bu genlerin ekspresyonunu inhibe edebilir.

Vitaminler vücutta birçok metabolik süreç için az miktarlarda gerekli olan organik maddelerdir. Vücutta hiç sentezlenmezler ya da yetersiz ve çok az miktarlarda sentezlenirler. E vitamini, temel fonksiyonu bir antioksidan olarak hücre metabolizmasında bazı temel moleküllerin oksidasyondan korunması ve hücre membranlarının stabilizasyonudur. A vitamini ve karotenleri oksidasyondan korur. C vitamini, hidrojen iyonlarının transferine ve intraselüler oksidasyon – redüksiyon potansiyelinin düzenlenmesine katkıda bulunur. Ayrıca bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmasında ve antikor sentezinde görev alır.

NAC , Metilprednizolon ve Vitamin Kompleksinin her üçünde karşılaştıran bir çalışma yoktur. Biz bu çalışmamızda deneysel model olarak intraperitoneal E.Coli standart suşu enjeksiyonu yapılarak sepsis tablosu oluşturulan sıçanlarda, intratrakeal yolla uygulanan NAC, Metilprednizolon ve Vitamin Kompleksinin akut akciğer hasarı üzerine olan etkilerini araştırmayı planladık. İntratrakeal ilaç uygulamasına bağlı akciğer histolojik kesitleri ve TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyleri ölçülerek AAH tedavisine etkisi yorumlanacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II. A. SEPSİS

Sepsis, yıllar boyunca tıp dünyasının tedavisi güç ve mortalitesi yüksek sorunlarının başında yer almıştır. Son yıllarda, organ destek sistemlerinde ilerleyen teknolojiye ve bu teknoloji sayesinde sepsis fizyopatolojisinin daha da iyi aydınlanmasına karşın, yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) hastalarda önde gelen mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Günümüzde sepsis, YBÜ'lerindeki en sık ölüm nedenidir. Sepsis ve septik şoka bağlı mortalite %30-70 arasında değişmektedir. Özellikle şok belirtilerinin tabloya eklendiği durumlarda, en iyi merkezlerde bile mortalite halen çok yüksektir (14).

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. Bunda klinik tablonun tanımında görüş birliği olmamasının yanında, hastalığın bildirim zorunlu bir hastalık olmamasının da rolü büyüktür. Bu nedenle gerçek rakamlar vermek mümkün değildir. Ülkemizde sepsis ile ilgili en geniş çalışma Hacettepe Üniversitesi'nde yapılmıştır. 1983-1989 yılları arasındaki yedi yıllık dönemdeki gram negatif bakteriyemi olguları değerlendirilmiş, yatan hastalar arasında insidansı 4.2/1000 ve mortalitesi %45 olarak bulunmuştur (15).

Sepsis, hastanede gelişen (nazokomiyal) ve hastane dışında gelişen sepsis olarak ikiye ayrılabilir. Nazokomiyal sepsislerde en sık etkenler ; S.aureus ve E.coli' dir. S.aureus için en sık giriş kapısı deri, yumuşak doku ve solunum yollarıdır. E.coli sepsisi ise en sık üriner sistem infeksiyonlarından kaynaklanmaktadır (16)

Etiyoloji

Sepsis tablosu; bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitlerden kaynaklanabildiği gibi, ağır travma veya pankreatit gibi noninfeksiyöz olaylarda da gelişebilmektedir. Olguların yarısında etken gösterilememesine karşın, bu grubun çoğunluğunun antibiyotik tedavisine yanıt vermesi, bu hastalarda da etkenin bakteriyel olduğunu düşündürmektedir (17).

Sepsise neden olan mikroorganizmaların sıklığı, sepsisin hastane içi ya da hastane dışında gelişmiş olmasına göre değişiklik gösterir. Toplumda kazanılmış sepsis olgularında en sık rastlanan etken mikroorganizmalar; E.coli, S.pneumoniae ve S.aureus'tur. Hastane içinde gelişen sepsise neden olan mikroorganizmalar ise yıllara göre bazı değişiklikler göstermiştir. Antibiyotiklerin kullanım alanına girmesinden önceki 1950'li yıllarda gram pozitif bakteriler ön sırada olup sıklıkla S.aureus ve S.pyogenes etken olarak saptanmakta idi. Ancak antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile bu gram pozitif bakterilerin neden olduğu hastalıklar tedavi edilebilir hale gelmiş ve 1960,70 ve 80'li yıllarda gram negatif bakteriler gittikçe artan oranda (olguların %50'sinden fazlasında) sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır (18).

Fizyopatoloji

Sepsisin patogenezi oldukça karmaşık bir olaydır. Bakterinin organizmaya yerleşmesi, konak savunması etkileşmesi sonucu hastalık ortaya çıkar. Hastalığın ortaya çıkışını; konağın immun sisteminin durumu ve bakteriyel virülans faktörleri belirler.

1. Konağa Ait Faktörler ve İnfeksiyonun Giriş Kapısı : İnfeksiyona karşı konağı koruyan savunma mekanizmalarının (anatomik bariyerler, hücrel immunite, spesifik ve nonspesifik humoral immunite) bozulması, lokal ve sistemik infeksiyonlara zemin hazırlar. (18).

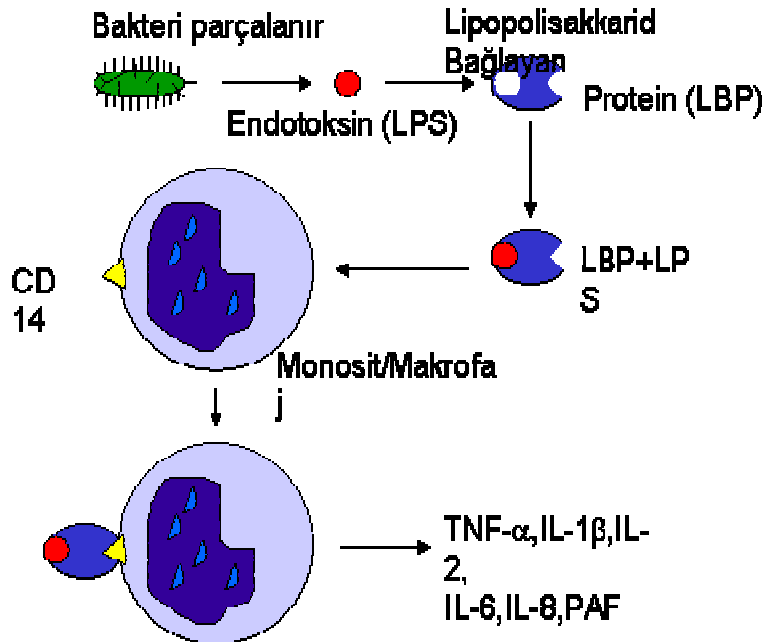
Sepsis gelişen hastalarda bakteriyemi aşağıdaki klinik durumlardan biri şeklinde başlar :

- A.** İmmun sistemi sağlam, sağlıklı kişilerde lokal infeksiyonun (peritonit, abse veya kolanjit gibi) yayılması.
- B.** Yeni doğanlarda, immun sistemi baskılanmış hastalarda küçük bir infeksiyon odağından (sellülit, follikülit gibi) kaynaklanabilir. Bazen de infeksiyon odağı belirlenemez.
- C.** Bakteri damariçi kateter, intravenöz mayi ile lokal bariyeri aşarak direkt dolaşıma geçer.
- D.** S.pneumoniae, H.influenzae, N.meningitidis ve S.aureus gibi bazı mikroorganizmalar, genellikle belirlenebilen herhangi bir infeksiyon odağı olmadan bakteriyemi yapabilir.
- E.** Gram negatif basiller ise predispozan faktörlerden biri olmadan nadiren bakteriyemiye neden olurlar.

2. Mikrobiyal Faktörler : Sepsis etkeni olan bakterilerin çoğunluğu endojen floradan kaynaklanmaktadır. Enfeksiyonun gelişmesinde bakteriyel virülans faktörleri (adherans, seruma direnç, antifagositik yüzey, hücre içinde canlılığını koruma, enzim ve toksinler gibi) rol oynar. Sepsiste klinik tablonun oluşmasında, bakteriyel invazyon ile beraber bakteriyel hücresel yapıların ve toksinlerin de önemli rolü vardır. Bu hücresel yapı ve toksinler organizmada değişik biyolojik sistemleri aktive ederek, sepsisteki fizyopatolojik değişikliklerden sorumlu endojen mediyatörlerin açığa çıkmasını sağlar.

Bu bakteriyel hücresel yapı ve toksinler arasında etkisi en iyi bilinen yapı gram negatif bakterilerin hücre duvarında yer alan Lipopolisakkarit (LPS) yapısındaki endotoksinlerdir. Endotoksin dışında; TSST-1, pirojenik ekzotoksin A, ekzotoksin A, gram pozitif bakteri veya mantar hücre duvarı yapıları, virüs ve mantar antijenleri de sepsis kaskadını başlatabilir.

Septik şoku tetikleyen ilk olay, bakterilerin lizisi sonucu LPS veya diğer toksik hücre duvarı komponentlerinin dolaşıma salınmasıdır. Bu aşamadan, dolaşım sisteminin kollapsına kadar ne gibi olayların geliştiği halen basit bir mekanizma ile açıklanamamış değildir. Şekil 1’de sepsiste gelişen fizyopatolojik olaylar şematik olarak özetlenmeye çalışılmıştır (19).



Şekil 1. Sepsis Fizyopatolojisi

Parçalanmış gram negatif bakterilerden dolaşıma salınan LPS ilk olarak özel plazma proteinleri (LPS-Binding Proteinler) tarafından bağlanır. Daha sonra bu kompleksin, monosit ve makrofaj yüzeyindeki CD14 reseptörleri ve endotel hücreler gibi diğer bazı konak hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşimi söz konusudur.

LPS'in konak hücreleri ile etkileşimi sonucu en azından üç mekanizma tetiklenmektedir:

1. Monosit, makrofaj ve diğer hücreler tarafından sitokinlerin (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , PAF) üretimi ve bunların da prostaglandin ve lökotrienlerin üretimini uyarması,
2. Kompleman sisteminin aktivasyonu,
3. Koagülasyon sisteminin aktivasyonu.

Sepsiste Endojen Mediyatörler: Sepsiste rol oynayan proinflatuar ve antiinflatuar mediyatörler arasındaki etkileşim, zıt etkiler arasında bir savaşım olarak değerlendirilebilir.

- Eğer mediyatörler birbirini dengeler ve infeksiyon baskılanabilir ise homeostazis sağlanır.
- Eğer başlangıçtaki etkileşim ve doku zedelenmesi çok şiddetli ise direkt olarak SİYS ve çoklu organ yetmezliğini (ÇOY) indükleyebilir.
- Başlangıçtaki doku zedelenmesinden sonra yaşamını sürdürebilen pek çok hastada ise proinflatuar ve antiinflatuar etkiler arasında bir denge kurulamaz ve masif sistemik inflamatuvar yanıt ve/veya antiinflatuar reaksiyon ortaya çıkabilir.

Sitokin İndüksiyonu

TNF- α : LPS veya diğer sitokinlere cevap olarak mononükleer makrofajlar tarafından üretilir. Monositler ve makrofajlar TNF- α proteininin ana kaynağı olmakla birlikte aynı zamanda beyin glial hücreleri, karaciğer Kupffer hücreleri, deri keratinositleri, mast hücreleri, N-K lenfositleri, T lenfositleri ve B lenfositleri tarafından da imal edilmektedir. TNF- α 'nın LPS'le meydana gelen sepsis sendromunda, sitokin basamaklarını uyararak etki gösteren ana mediyatör madde

olduğu tesbit edilmiştir ; IL-1, kemotaktik sitokinlerden IL-8, nötrofilik kemoatraktanlardan IL-6, genel hipotansiyon, pulmoner hipertansiyon ve miyokardiyal depresyondan sorumlu nitrik oksit (NO), araşidonik asit metabolizması ve mikrotrombüs teşekkülünden sorumlu sitokinlerin sentezini uyarmaktadır. Bulgular, TNF- α nın organizmaya giren bakteriye karşı meydana gelen cevapta konakçının bütünlüğünün sağlanmasında esas olduğunu göstermiştir. Ancak, katabolik bir mediatör olup aşırı TNF- α sekresyonu konakçının ölümüne yol açmaktadır. Solubl TNF reseptör düzeyi (sTNFR) sepsiste TNF düzeyinden yüksek olup , aradaki fark yaşam oranı ile paraleldir.

IL-1 β : TNF- α ile benzer fonksiyonel ve biyolojik karekteristiklere sahiptir. Yeterli konsantrasyonu konakçı direnci için önemlidir. Ancak, yüksek konsantrasyonları ölüme yol açmaktadır. Aynen TNF- α gibi sepsis sendromunda sekonder mediatörler için kuvvetli bir uyarıcıdır. TNF- α , IL-1, IL-8, monosit kemoatraktan protein-1 ,IL-2, IL-6, araşidonik asit metabolitleri, integrin ekspresyonu ve NO sentezini uyarır.

İntravenöz LPS verilen insanlarda, IL-1 β dan 100 kez fazla serum interlökin-1 reseptör antagonisti (IL-1 ra) olduğu tesbit edilmiştir. Konakçıda sepsis esnasında homeostazisin sağlanmasında IL-1 β regülasyonu önemlidir.

IL-6 : Monosit, makrofaj , lenfosit ve fibroblastlar tarafından IL-6 sentezi, B hücreleri tarafından immünoglobulin sentezi, T hücre proliferasyonu, N-K hücreleri aktivasyonu ve sitotoksitesi ile karaciğerden akut faz protein sekresyonunu uyarır. Bir çok çalışmada, septik şoklu hastalarda serum IL-6 düzeyi ile mortalitenin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir.

IL-10 : Monosit, makrofaj, T lenfositleri, B hücreleri ve nötrofiller tarafından sentezlenen süpresif bir sitokin olan IL-10 konakçının gram negatif sepsiste organ yetmezliği ve ölümden korunmasında kritik bir rol oynar. IL-10, koruyucu aktivitesini IL-1 β , TNF- α , IL-8, interferon- γ , NO, IL-6 ve prostaglandin metabolitleri gibi inflamasyon mediatörlerini inhibe ederek gösterir . IL-10, immün cevabın önemli bir regülatörüdür.

IL-8 : LPS, IL-1 veya TNF- α uyarısına cevap olarak monosit, makrofaj, lenfosit , endotelial hücreler, fibroblastlar ve epitelial hücreler tarafından sentezlenir. Lokalize bakteriyel enfeksiyonlarda inflamatuvar odağa nötrofillerin

akümülyasyonu için gereklidir. Sepsisteki hastada yüksek serum IL-8 konsantrasyonu , yüksek mortalite ve multipl organ disfonksiyonu ile birlikte dir.

Interferon γ (IFN- γ) : IFN- γ ile aktive edilmiş hücreler, gram negatif ve gram pozitif bakteriler dahil olmak üzere bir çok patojene karşı dirençlidir. IL-1 β ve TNF- α tarafından uyarılan sekonder mediatörlerden araziidonik asit metabolitleri arasında platelet aktive edici faktör (PAF) ve lökotrien - B4 (LTB4) en önemlileridir.

PAF : Monosit ve endoteliyal hücreler tarafından LPS'e cevap olarak sentezlenen PAF, IL-1 β , TNF α , NO ve doku faktörleri üretimi ile lökosit aderens ve aktivasyonu, platelet agregasyonu ve pulmoner hipertansiyona yol açar. PAF reseptör antagonistleri gram negatif sepsisli hastalarda yaşam süresini artırmaktadır.

LTB4: Bakteriyel patojenlere cevap olarak sentezlenir; nötrofil kemotaksisi ve aktivasyonunda etkilidir. Sepsisteki hastalarda dolaşımda yüksek konsantrasyonda LTB4 bulunması, sitokin sekresyonu, vasküler endoteliyal disfonksiyon ve ölümlle orantılıdır.

Nitrikoksit (NO) : Vasküler tonosite regülyasyonu, platelet agregasyonu ve lökosit adezyonu inhibisyonu yapar. İndüklenebilir NO, sepsiste vasküler düz kas hücreleri ve endoteliyal hücrelerde sentezlenir, LPS le uyarılan hipotansiyondan büyük ölçüde sorumludur. NO inhibitörlerinin ise sepsiste hipotansiyonu düzelttiği tesbit edilmiştir. Ancak, organ kan akımının azalmasına ve multipl organ disfonksiyonunun olasılığının artmasına yol açar. İnsanlarda sepsiste NO sentez inhibisyonu periferal vasküler direnci artırır, kan basıncını yükseltir, kardiyak debiyi ise azaltır. Bir serbest radikal olan NO, endotel kaynaklı gevşeme faktörünün (EDRF) yapısında yer alır. NO sentezi, sepsiste geç bir olay olup vazodilatasyondan sorumludur.

Komplemanlar : Kompleman sistemi ya antijen-antikör kompleksi ile ya da yöneldiği hedef molekül tarafından aktive edilir. Letal dozda gram negatif bakteri ve ürünleri verilen konakçılarda kompleman düzeyi 5-13 kat aktive edilirken , yaşayan bireylerde kompleman düzeyinin 2-3 defa arttığı görülmüştür.

LPS 'den sonra, hücre adezyonunda aracılık yapan hücre yüzey proteinlerinden aktif nötrofil ve endoteliyal hücre tarafından ekspresyonu yapılan integrin, endoteliyal hücreler tarafından eksprese edilen ve nötrofile bağlanarak ,

onu inflamasyon odağına yönlendiren intrasellüler adhezyon molekül-1 (ICAM-1) ve endotelial lökosit adhezyon molekülü-1 (ELAM-1), granülosit aktivasyonunu gösteren antibakteriyel protein, defensin-3 sentez edilir.

Sepsiste belirleyici moleküllerin fonksiyonu :

Bu moleküller; sepsis gelişiminin önceden anlaşılması, sepsisteki hastanın belirlenmesi, mortalite ve morbiditenin önceden tahmin edilmesi ve tedavi girişimlerinin zaman ve hedeflerinin tasarlanması amacı ile kullanılmaktadır. Sepsiste belirleyici molekülleri iki ana grupta toplamak mümkündür :

1. İnflamasyon mediatör ve modülatörleri : Bunlar arasında en önemlilerinden biri endotoksindir. Gram negatif sepsiste bulunan hastanın dökümanite edilmesi, ARDS gelişme riski bulunan septik hastanın tesbit edilmesi, septik şokta ve sepsis sendromunda bulunan hastanın belirlenmesinde kullanılır.

Sepsiste kompleman, TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 belirleyici moleküller olarak ölçülmektedir, ancak, tek tek ölçülen mediatörlerden ziyade **LPS-sitokin skoru** sepsiste mortalite ile daha doğrudan ilişki göstermektedir. Bu sonuç, gram negatif ve gram pozitif sepsiste geçerlidir.

2. İnflamatuvar hücre aktivasyon molekülleri: Sepsiste nötrofil aktivasyonunu gösteren spesifik ve sensitif bir belirleyici tesbit edilememiştir. Ancak, sepsiste vasküler endotelin disfonksiyonu en önemli bozukluklardan biridir. Uyarılmış endotel hücreleri bazı aktif moleküller sentezlemektedir. E-Selektin ve ICAM-1 in ekspresyonu artar ve plazma düzeyleri yükselir. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SİYS) ve organ yetmezliği bulunanlarda E-selektin düzeyi, sadece SİYS olanlara nazaran daha çok yükselir.

Bu endojen mediyatörlerin en önemlileri TNF- α , IL-1, 2, 6 ve PAF' dır. Bu mediyatörlerin salınımından sonra, arakidonik asit; lökotrienlere, tromboksan A2, PGE₂, PGI₂'ye metabolize olur. IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive eder. IFN- γ , IL-2, IL-4 ve GM-CSF oluşur. Ayrıca mast hücrelerinden salınan Histamin ve aktive trombositlerden salınan Serotonin de vazoregülatör maddelerdir.

Son yıllarda sepsiste güçlü vazoregülatör rol oynayan iki yeni mediyatör tanımlanmıştır; NO ve Endotelin-1. NO düz kası gevşetir, Endotelin-1 ise güçlü vazokonstriktördür (20).

Bu vazoaktif mediyatörlerin etkisi ile sistemik damar direnci azalır; bu da dokulara giden kan akımının azalmasına neden olur. Sepsisin bir diğer mediyatörü olan Myocardial Depressant Substance (myokardı deprese eden madde); ventriküler dilatasyon, miyokarda depresyon ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda azalma yapar. Diğer mediyatörler de kalbi etkiler; TNF- α miyokardı deprese eder, PAF kalp üzerinde negatif inotropik etkilidir ve arteriyel kan basıncını düşürür, Lökotrien C4-D4-E4 koroner ve miyokard kan akımını azaltır, IL-2 de kardiyovasküler fonksiyon bozukluğuna yol açar (17).

Kompleman Sisteminin Aktivasyonu: Aktive kompleman komponentlerinden C3a ve C5a da endotelial doku üzerinde etkilidir. Özellikle C5a, PMNL'lerin kan damarlarının duvarına yapışarak lizozomal enzimlerini ve toksik oksijen radikallerini salması ve damar duvarını hasara uğratmasına neden olmaktadır. PMNL'lerin C5a'ya yanıt olarak damar duvarı boyunca migrasyonu, aynı zamanda vasküler permeabilite artışı sonucu damar dışına sızıntıya da katkıda bulunmaktadır. Tüm bu etkiler sonucu vasküler mikrotrombüs oluşumu kolaylaşmakta ve başlamaktadır (19).

Koagülasyon Sisteminin Aktivasyonu : Endotoksin, TNF- α , IL-1 ve diğer endojen mediyatörler, kontakt ve koagülasyon sistemini aktive eder. Hageman faktör (Faktör XII)'ün aktivasyonu sonucu plazminojen plazmine dönüşür ve intrinsik koagülasyonu başlatır. Fibrinojen fibrine dönüşür. Bunu pıhtılaşma izler. Fibrinolitik aktivite de artar.

SEPSİSTE SPESİFİK ORGAN TUTULUMLARI

Sepsiste bütün organlarda patolojik değişiklikler görülebilir. En fazla organ hasarı akciğerler, karaciğer, böbrekler, kalp ve GİS'de görülür.

Akciğerler:

ASSS, şoklu hastalarda sık ölüm sebeplerinden birisidir. "Nonkardiyojenik pulmoner ödem" olarak da adlandırılabilir. Sepsiste gelişen yaygın endotel

zedelenmesi sonucu; akciğerlerde de gaz alışverişinin gerçekleştirildiği alveolokapiller membranda zedelenme olur. Bu tablodan muhtemelen koagülasyon ve kompleman sistemlerinin aktivasyonu sorumludur (21,22). Sepsisteki akciğer hasarının önemi, bu organın geniş mikrovasküler yüzey alanından kaynaklanmaktadır.

Kapiller endotelinin ve alveollerin Tip I epitel hücrelerinin zedelenmesi sonucu; vasküler permeabilite artar ve alveol içine fibrinden zengin kan sıvısı sızar. Tip II alveol hücrelerinin zedelenmesi sonucu sürfaktan sentezi azalır; ayrıca alveol içine sızan sıvıdaki fibrin de önceden mevcut olan sürfaktanı inaktive eder; sonuçta alveoller proteinden zengin bir ödem sıvısı ile dolar. Gaz alışverişi ve akciğer kompliyansı bozulur. Fibrinin organizasyonu ile hyalen membranlar oluşur; böylece yüzey gerilimi azalan alveoller kollabe olmaya başlar ve yer yer atelektazik alanlar ortaya çıkar. Ancak bu atelektazik alanlarda kan akımı devam ettiği için ventilasyon/perfüzyon uyumsuzluğu olur; oluşan sağ-sol şantlar sonucu venöz kan yeterince oksijen alamadan arteriyel dolaşıma geçer. Arteriyel hipoksemi, progresif hipoksi ve hiperkapni ile ağır bir solunum yetersizliği tablosu gelişir.

II. B. AKUT AKCİĞER HASARI

Akut akciğer hasarı (AAH) ve onun ciddi formu Akut sıkıntılı solunum sendromu (ASSS), ilk olarak 1967' de Ashbaugh tarafından tanımlanmış olup, difüz pulmoner infiltratların varlığında akut başlangıçlı ciddi hipoksemiyle karakterizedir. Bu infiltratlar radyolojik olarak , artmış pulmoner vasküler permeabilite sonucu gelişen pulmoner ödemi gösterir . Bütün yaş grupları etkilenebilir ve genellikle tetikleyici olaydan kısa bir süre sonra gelişir. AAH' nın gelişme olasılığı bazı predispozan faktörlere bağlıdır; bazı faktörler (örn, ciddi sepsis) akciğer hasarına ilerleme olasılığı daha yüksektir. AAH gelişimi, hasta özelliklerine de bağlıdır. Örneğin alkolizm predispozan bir faktördür ve veri genetik predispozisyon ihtimalini destekler. AAH nedenleri direkt veya indirekt olarak ayrılırsa, sonuçlar yaş, altta yatan kronik hastalık , akciğer dışı hastalığın ciddiyeti ve gaz değişim anormalliklerinin kontrolü açısından her iki grupta benzerdir (23).

AAH/ ASSS' da saatler ve günler içerisinde alveolokapiller membran yapıları ve hücrelerindeki yaygın hasar gelişir. Radyolojik olarak bilateral yaygın akciğer infiltratları ve bozulmuş PaO₂ / FiO₂ (AAH ' da ≤ 300mmHg ve ASSS'da ≤ 200

mmHg) oranları ile tanımlanan bir akut solunum yetmezliğidir (24). AAH/ASSS, pnömoni, aspirasyon, toksik inhalasyon, boğulma, akciğer kontüzyonu gibi direkt akciğer hasarı ve sepsis, pankreatit, jinekolojik sorunlar (ablasyo plesenta, amniyon embolisi, eklampsi), masif kan tranfüzyonu gibi indirekt mekanizmalar gibi değişik etyolojiye sahip kritik hastalıkların sonucu olarak meydana gelir (25). AAH / ASSS 'nun insidansı günümüzde hala tam olarak bilinmemektedir. Yılda 1.5-75/ 100.000 kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir (23). ASSS ile ilgili mortalite oranları geçen 20 yıl içerisinde % 90 ' lardan günümüzde % 30- 40 'lara düşmüştür (26).

AAH / ASSS , daha öncede belirtildiği gibi yoğun bakım hastalarında sık görülen bir komplikasyon olup ciddi morbidite ve mortalite nedenidir (27,28). Altta yatan hastalığın tedavisi ve mekanik ventilasyonda akciğer koruyucu tedavi stratejileri ile destek tedavisi, başarılı klinik sonuçlara katkıda bulunmaktadır (29). Altta yatan hastalığa rağmen , AAH / ASSS 'da klinik ve patolojik belirtiler benzerdir (27,30). Aslında bu sendromlar, düzensiz akut inflamatuvar cevabın sonucu olarak pulmoner endotel ve epitelin bariyer özelliklerinin bozulması ve fonksiyon kaybına neden olan ciddi akciğer hasarını yansıtır (31).

Bu hipotez ile, tetikleyici faktör (sepsis, şok, travma, çoklu transfüzyonlar, pankreatit vb.) sistemik seviyede akut inflamatuvar cevabı başlatır. En erken belirtilerinden biri, pulmoner mikrovasküler sahadaki nötrofillerin masif sekestresyonunu sağlayan kemokin ve sitokin üretimi, adezyon moleküllerinin artması ve pulmoner endotel ve makrofajlarının (alveolar ve interstisyel) aktivasyonudur. Bu hücreler endotel ve epiteli geçerek alveolar boşluğa göç eder ve proteolitik enzimler, serbest oksijen radikalleri (SOR), nitrojen ürünleri, katyonik proteinler, lipid medyatörler, inflamatuvar sitokinler gibi farklı sitotoksik ve proinflamatuvar bileşikler salgılar (31). İnflamatuvar hücrelerin daha fazla toplanması , sitotoksik medyatörlerin daha çok üretilmesi ile kısır döngü yaratmakta , alveolo-kapiller membran harabiyeti ve pulmoner yetmezliği derinleştirmektedir. En aşikar başlangıç semptomları akciğere ait olsada, AAH / ASSS, Çoklu Organ Yetmezliği olarak tanımlanan kalp, böbrek, karaciğer, kas, barsak ve beyin gibi çeşitli organlarda mikrovasküler yapıdaki bozulmayı içeren sistemik bir sürecin parçasıdır (32).

II. B. 1. Akciğer Hasar Mekanizması

Adım 1: Bakteriyel infeksiyon sonucu lipopolisakkarit (LPS) üretimine ilk cevap, pulmoner makrofajların ve endotelin aktive hale gelmesi ve adezyon moleküllerinin yüzey ekspresyonunun artması (EAM-1, ICAM-1).

Adım 2: Nötrofil adezyonu ve intravasküler alandan alveolar alana göçü.

Adım 3: Aktive nötrofillerin OH⁻ ve O₂⁻ gibi serbest oksijen radikalleri, nitrik oksit (NO), sitokinler, kemokinler, proteazlar ve katyonik proteinler gibi inflamatuvar medyatör üretmesi.

Aktive nötrofillere ek olarak alveolar üniteyi yapan pulmoner monosit ve makrofajlar, pulmoner endotel ve epitel hücreleri gibi diğer hücrelerde, inflamatuvar medyatör üretimine katkıda bulunur. Nötrofiller, AAH/ASSS' da serbest oksijen radikal üretiminin majör kaynağıdır.

II. B. 2. Oksidanlar ve Akciğer Hasarı

ASSS' nun orijinal tanımından önceki 30 yıl boyunca, araştırmacılar risk altındaki hastalarda, akciğer hasarı ve ÇOY' ni önleme ve iyileştirmede gerekli tedavi metodlarını geliştirebilmek için, akciğer hasarını düzenleyen mekanizmaları aydınlatmaya çalışmışlardır. AAH / ASSS, özellikle moleküler oksijenin indirgenmiş ürünleri olan serbest oksijen radikalleri ile gelişen akciğer dokusunun oksidatif hasarıdır (33-36).

Biyolojik olarak önemli SOR' leri süperoksit anyon radikalleri (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalleri (OH⁻) ve hipoklorik asittir (HOCl). Reaktif nitrojen ürünleri, peroksinitrat (ONOO⁻) içeren nitrik oksit (NO) ürünleri, lipid ve proteinlerin oksidasyonu (nitrasyon) sonucunda oluşmaktadır (37).

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, çeşitli mekanizmalarla hücre hasarına neden olmaktadır. Bu mekanizmalar;

1. DNA zincirinde kırılmalar ve nokta mutasyonları ile direkt DNA hasarı
2. Tromboxan gibi vazoaktif ve proinflamatuvar moleküllerin oluşumu ile lipid peroksidasyonu

3. Protein aktivitesini değiştiren, antioksidan- antiproteaz enzimlerin inaktivasyonu ve proteazların salınımına yol açan proteinlerin özellikle sülfidril gruplarının oksidasyonu

4. Proinflamatuvar genlerin ekspresyonunda artmaya yol açan Aktivatör protein -1 (AP-1) ve Nükleer Faktör -κB (NF -κB) gibi transkripsiyon faktörlerinin değişmesi.

Normal metabolizma sürecinde üretilen SOR' lerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak ve serbest radikalleri nötralize etmek için, hücreler süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidanları açığa çıkarır. Bu antioksidanlar akut inflamatuvar cevap sürecinde hızlı bir şekilde istila edilirler.

AAH / ASSS'da gezcici ve sabit lökositler (nötrofil, monosit ve makrofaj), parankim hücreleri (epitelyal ve endotelyal hücreler, fibroblastlar, monositler) , dolaşımda oksidan üreten enzimler (Ksantin Oksidaz), sıklıkla mekanik ventilasyonda kullanılan yüksek konsantrasyonda oksijen ile inhale edilen gazlarında içeren çok sayıda SOR kaynağı vardır.

AAH / ASSS'da oksidanlar ve oksidatif hasarın rolü olduğunu destekleyen çok sayıda deneysel kanıt vardır. Bu kanıtın fizyolojik nemi AAH / ASSS'ı olan hastalarla yapılan çalışmalarla pekiştirilmiştir (34,38-40). Örneğin ASSS olan hastaların ekspiryum sonu solunum havasında H₂ O₂ seviyelerinin arttığı tesbit edilmiştir (41,42). Dahada önemlisi bu hastaların bronkoalveolar lavaj sıvısı , glutatyon gibi antioksidan moleküllerin rölatif eksikliği ile birlikte , fazla miktarda oksidatif olarak modifiye protein içermektedir (43-46). Antioksidan savunmanın oluşturduğu sistemde birçok engel ve dengeler olmasına rağmen, AAH / ASSS'da oksidatif hücre hasarına izin veren, endojen antioksidan üretiminden çok daha fazla SOR retimi vardır.

II. B. 3. Oksidanların Kaynağı

Lökositler , özellikle nötrofil ve makrofajlar SOR ' lerinin önemli kaynağıdır (47,48). Lökositler, NADPH Oksidaz (49) ve nitrik oksit sentetaz (NOS) (50,51) gibi önemli miktarda reaktif ürünler üretebilen iki enzim sistemine sahiptir. AAH/ASSS 'da akciğerde SOR' lerinin temel kaynağı aktive nötrofillerdir. AAH/ASSS 'da LPS ' ler, artan sitokinler, kemokinler, kompleman faktörleri,

pıhtılaşma faktörleri, lipid medyatörler gibi farklı proinflamatuvar bileşikler, SOR üretiminde nötrofilleri aktive etme yeteneğine sahiptir.

Endotel (52,53), epitel (54), fibroblastlar (55), düz kas hücreleri' de (56) fizyolojik olarak önemli miktarda SOR' i üretebilmektedir. Mitokondriyal elektron transport zinciri (57), Sitokrom P450 (58) ve Ksantin Oksidaz 'da (59) SOR' lerinin diğer bir kaynağıdır. Son olarak, mekanik ventilasyonda kullanılan yüksek oksijen konsantrasyonları içeren inhale oksidanlar, SOR üretimine katkıda bulunmaktadır.

II. B. 4. AAH / ASSS 'da Oksidanların Potansiyel Hedefleri

Hücre membranı, sitozol, nükleer lipid ve proteinler gibi değişik hücre elemanları, oksidatif değişikliklere maruz kalabilir. Hücre membranı ve özellikle plasma membranı SOR' lerinin primer hedefidir. Membran fosfolipidlerinin serbest yağ asit yan zincirleri, oksidatif stres altında peroksidasyona uğrar (60). Membran akışkanlığı plazma membranınin lipid kompozisyonuna bağlıdır. Oksidasyona bağlı membran yapısındaki değişiklikler membran fonksiyonlarını etkiler.

Akut inflamasyon varlığında endotelial ve epitelial plazma membran bileşenlerinin oksidasyonu, bu hücrelerin bariyer fonksiyonlarının bozulmasıyla akciğere nötrofil ve vasküler alana kemokin ve diğer kemoatraktan moleküllerin geçişini kolaylaştırır. Oksidatif maruziyet lokosit adezyonunu arttırmaktadır. Bunu, endotelial plazma membran bileşenlerinin direkt oksidasyonu veya endotelial ve hücreler arası adezyon moleküllerinin (EAM-1, ICAM-1) yüzey ekspresyonu ve afinitesinin artması yoluyla sağlamaktadır (61).

Oksidanlar tarafından başlatılan sitozolik ve nükleus yapısındaki değişiklikler inflamatuvar zedelenmeye katkıda bulunmaktadır. Örneğin, farklı etyolojilerle gelişen akciğer hasarında, TNF- α , İnterlökin IL -1 β , IL-2, IL-6, IL-8 gibi sitokin ve kemokinlerin yükselmesi alışılmış bir gerçektir. Sitokinlerin ekspresyonu primer olarak transkripsiyonel seviyede düzenlenmektedir.

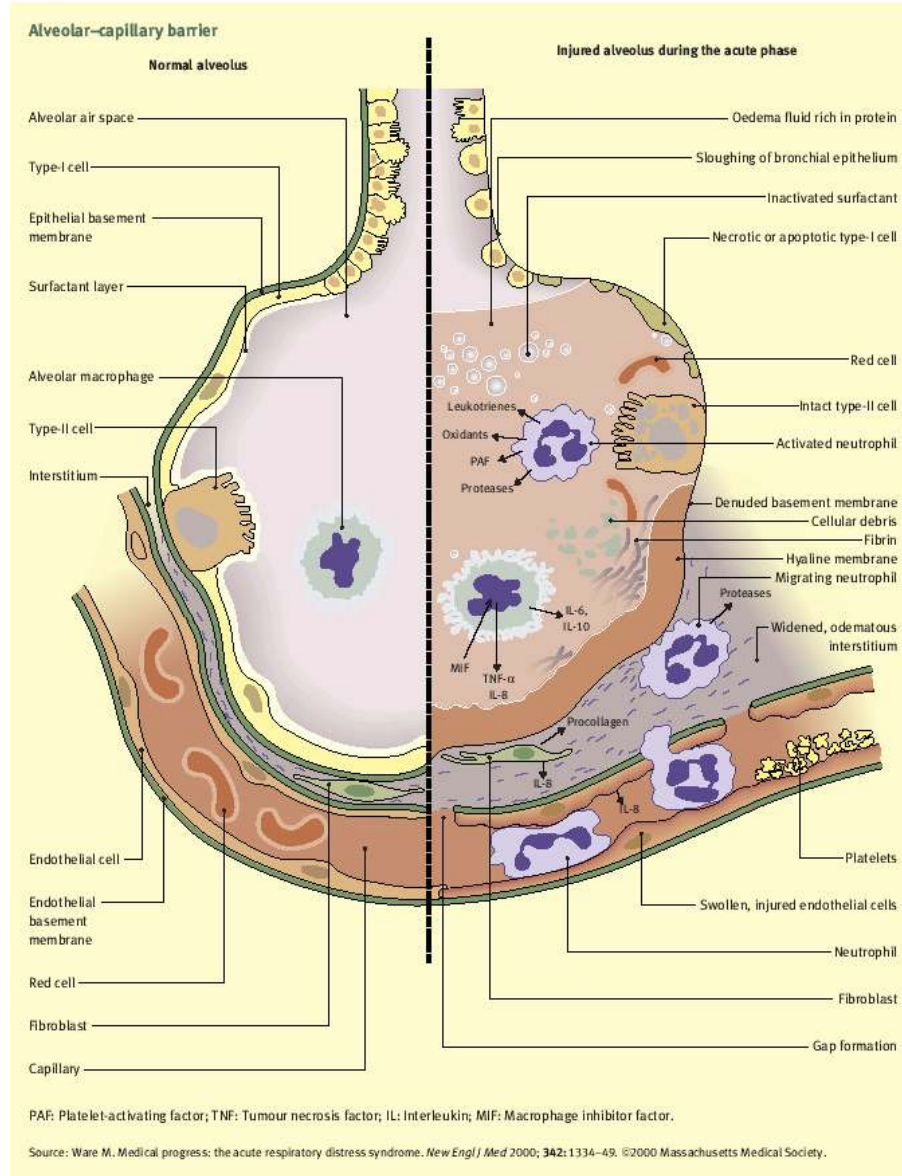
NF- κ B, AAH ve ASSS' da aktive olan DNA- bağlanma faktörüdür. Bu faktör, akut inflamasyon varlığında birçok farklı sitokinin transkripsiyonunu stimüle eder. NF- κ B, normalde sitozolde bulunan, I- κ B' ye bağlı bir heterodimerdir. Stimülasyon sonrası, I- κ B fosforile olur ve NF - κ B' den ayrılır. Serbest NF - κ B,

nükleusa geçer ve spesifik genlerin promoter bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu sağlar. Sonuçta, NF- κ B AAH /ASSS' u varlığında aktive olur ve oksidanlara bağlı I- κ B ekspresyonundaki değişikliklerle regüle edilir.

II. B. 5. AAH / ASSS' u Histopatolojik Değişiklikleri

AAH/ ASSS' nun patofizyolojik sonuçları artmış pulmoner şantta olduğu gibi, değişmiş pulmoner kapiller permeabilite ve alveolar difüzyon kapasitesi ile ilişkilidir. Endotelyal zedelenme ve vasküler permeabilite artışının AAH / ASSS' da rolü iyi tanımlanmış olup, bazı çalışmalar nötrofillerin sadece zedelenme mekanizmasında değil, savunma rolü olduğunda desteklemektedir (62). Epitelyal zedelenme AAH / ASSS' nin sadece gelişiminde değil tamir sürecinde de önemli rol oynar. Difüz alveolar hasar (DAH) denilen, major Tip I pnömositlerin nekrozu, difüz mikrovasküler hasar ve interstisyuma proteinöz sıvı ve inflamatuvar hücre geçişi ile karakterizedir (63). Epitelyal bütünlüğün kaybı ve Tip II alveolar hücrelerin yıkımı, normal sıvı transportunu etkileyerek alveolar alandan sıvının uzaklaştırılmasında bozulmaya yol açar. Tip II pnömositlerin zedelenmesi sürfaktan üretiminde azalma ve bunun klinik sonucu olarak atelektazi ve gaz değişiminde bozulmaya yol açar. Epitelyal tamir genellikle yetersiz olup, fibrozisle sonuçlanır.

AAH/ ASSS ' da hem inflamatuvar cevabı başlatan ve arttıran pro-inflamatuvar mediatörler, hemde sitokinler arasında kompleks otokrin ve parakrin ilişkiler vardır. Hücresel cevap, hem PMNL' lerin marjinasyon ve migrasyonunu ,hemde endotelyal adezyon moleküllerinin (EAM-1) ekspresyonunu içerir. Ayrıca sitokin, lipid medyatörler, proteazlar, oksidanlar, büyüme faktörleri (örn.TGF), nitrik oksit, nöropeptitler, nükleer faktör- κ B gibi hücrelerden bağımlı veya bağımsız, humoral cevaplarda bulunmaktadır (64).



Şekil 2.

II. B. 6. AAH / ASSS' da Klinik

AAH / ASSS 'da klinik süreç, yukarıda tanımlanan çeşitli başlangıç olayları sonrası sinsi veya akut olarak gelişebilir. Siyanoz, dispne, takipne, kuru öksürük, retrosternal rahatsızlık hissi ve ajitasyon tipik semptomlarıdır.

Hastada hemorajik balgam, akciğer oskültasyonunda kaba raller ve bronşiyal solunum sesleri duyulur. Arteriyel kan gazı analizleri normal veya azalmış PaCO₂ ile beraber, ciddi hipoksemi varlığını gösterir.

Pulmoner arteriyel kateter ile sol ventrikül dolmuş basıncının ölçümü, pulmoner infiltratın kardiyojenik ödeme neden olan yüksek hidrostatik basınç sebebiyle mi, yoksa bozulmuş alveolo-kapiller membran permeabilitesi ile mi geliştiğini ayırt edebilir (AAH/ASSS, normal pulmoner arteriyel uç basıncı ile beraber). Endotrakeal tüpten yapılan ödem sıvısı örnekleme, kardiyojenik ödeme göre daha fazla protein konsantrasyonu içerir.

AAH/ASSS' lı hastalarda ödemin patofizyolojik sonucu, hiperkapniye neden olan ventilatör yetmezlikten çok, derin hipoksemiye sonuçlanan intrapulmoner şantla beraber bozulmuş gaz değişimidir. AAH/ASSS, yüksek sağ ventriküler gerilim ve sağ ventrikül yetmezliğine neden olan pulmoner hipertansiyon ile beraber olabilir.

Radyolojik görünüm, normal kardiyotorasik indeks, periferik dağılımlı bilateral pulmoner infiltratlar ve santral pulmoner vaskülaritede artışı içerir. Kardiyojenik ödeme karşılaştırıldığında, hava bronkogramları daha alışımlı olup, septal çizgiler daha az görülür.

II. C. AAH / ASSS' da farmakolojik yaklaşım

Akciğer hasarını azaltmaya yönelik farmakolojik girişimler, proinflamatuvar sitokinlerin azaltılması, nötrofil infiltrasyonunun bloke edilmesi ve oksijen radikal üretiminin inhibe edilmesi gibi farklı şekillerde uygulanabilir.

Serbest oksijen radikalleri, septik şok patofizyolojisinde ve onunla ilişkili doku hasarında merkezi bir rol oynar (65-66). İnsanda gelişen septik şokta, antioksidan mekanizmada azalma, serbest radikal konsantrasyonunda artmayla beraber oksidan-antioksidan dengede bozulma olduğu düşünülür (67). Serbest radikal varlığı sepsisle ilişkili ASSS , septik şok ve çoklu organ yetmezliği gibi geniş bir hastalık spektrumunda bulunur.

İnflamatuvar durumların patogezinde olduğu gibi, AAH/ASSS 'da da oksidan ve antioksidan dengedeki bozulma önemlidir (68,69). ASSS' lu hastaların expiryum solunum havasında hidrojen peroksit seviyelerinde artış (70,71), plazmasında α - tokoferol, askorbat, β -karoten seviyelerinde dikkate değer azalma ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artma olduğu gösterilmiştir (72-75). AAH' lı hastaların distal hava yollarında suda çözünen antioksidan (ürat, glutatyon ve askorbat)

seviyelerinde azalma bulunur (76). Septik hastalarda serbest radikal üretimi eikosanoid metabolizması, mitokardiyal elektron transport zinciri değişiklikleri, nötrofil aktivasyon ve salınımı ile respiratuar patlama, artmış nitrik oksit sentezi gibi çeşitli kaynaklardan sağlanabilir. Bu sistemler arası sinerjizm SOR üretimini daha da arttırır. SOR' lerin potansiyel toksik etkisi çok sayıdaki sitoprotektif enzim ve antioksidanla ters etkilidir.

Kumar ve ark.' ları (75), ASSS tanısı alan hastalarda lipit peroksit seviyelerinin, ASSS riski olan ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu kanıtlamışlardır. Ayrıca, hem ASSS 'u olan hemde ASSS riski altında olan hastalarda, esansiyel yağ asit eksikliği hastalığına benzer şekilde poliansatüre yağ asitlerinde dikkate değer azalma olduğunu göstermiştir (77).

Kumar ve ark.' ları, ASSS 'lu hastalarda nitrik oksit seviyelerinde azalma olduğunu göstermiştir. Bu hastalarda, hem protektif etkisi hemde peroksinitrit (78) prekürsörü olarak pro-oksidan etkisi ile NO, zararlı ve yararlı etki gösterebilir (79).

AAH' nın gelişiminde nötrofil birikimi önemli rol oynar. Nötrofillerin konak savunmasındaki fizyolojik rolü, sadece SOR' lerinin üretim ve salınımı değil, aynı zamanda patojen proteazların salınımıdır (80). Antioksidanlarla (glutasyon) ve antiproteazlarla (α -1 antitripsin, α -2 makroglobülin) nötrofil proteazlarının ve serbest radikallerin efektif nötrolizasyonu, akciğer hasarını önler. Proteaz-antiproteaz ve oksidan – antioksidan dengedeki bozulma, ASSS patogenezinde önemli rol oynar (81).

II. C. 1. N- Asetilsistein

N–Asetilsistein kistik fibroziste mukolitik bir ajan olarak ve parasetamol toksisitesinde hepatotoksisiteyi azaltmak amacıyla kullanılmaktadır (82,83). Asetilsistein, doğal bir aminoasit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. NAC yoğun bakımda serbest radikal yakalayıcısı olarak yeni bir yaklaşım getirmiştir. Potansiyel yararlı etkilerini iki yoldan gerçekleştirir. Bunlardan biri, hipoklorik asit, hidroksil radikalleri ve hidrojenperoksit gibi serbest radikallerin primer yakalayıcısı olması, diğeri endotelial kökenli gevşetici faktör (NO) ve glutasyon için sülfidril grubu donörü olmasıdır (84,85).

Solunum yollarında mukolitik ve ekspektoran etkileri vardır. Asetilsistein, sahip olduğu sülfhidril grubu ile mukus glikoproteini içerisindeki disülfid bağlarını parçalayarak mukusun DNA fibrillerini depolimerize edici etki gösterir. Mukusun viskozitesini bu mekanizmayla azaltır. Solunum yollarında toplanan balgamın yoğunluğunu ve yapışkanlığını azaltır, akıcı hale getirir. Bronşial sekresyonların atılımını ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Ayrıca yapısındaki reaktif SH grubu kimyasal radikallere bağlanarak detoksifiye edici etki gösterebilmektedir. Asetilsistein antioksidan bir maddedir. Asetilsistein, akciğer ve karaciğerde glutatyon sentezine katılır ve sistein vererek glutatyon sentezini arttırır. Asetilsistein ve glutatyon, özellikle akciğerde enfeksiyonlar esnasında nötrofillerin oluşturduğu, sigara dumanı ve diğer zararlı maddelerin solunmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini bağlar ve muhtemel hücre hasarını önleyerek koruyucu etki gösterir.

Zararlı maddelerin detoksifikasyonunda önemli bir faktör olan glutatyon sentezini arttırmakta olması, parasetamol entoksikasyonundaki antidot etkisini açıklamaktadır. Parasetamol, normal şartlarda karaciğerde metabolize edilirken az bir bölümü sitokrom P- 450 enzim sistemi üzerinden reaktif bir ara metabolite dönüşür. Bu ara metabolit de glutatyon ile konjuge edilir ve idrar ile atılır. Parasetamolün yüksek dozlarda alındığı durumlarda bu reaktif ara metabolitin oluşumu artar; glutatyonun azalmasıyla ara metabolitinin aktivasyonu da azalır. Bu durumda uygulanan asetilsistein, karaciğer hücrelerinde glutatyonun normal düzeylerine çıkmasını sağlar ve glutatyon reaktif metabolite bağlanarak olası hücre hasarını önler.

Farmakokinetik

Asetilsistein oral uygulamadan sonra hızla absorbe edilir ve portal sirkülasyon ile karaciğere geçer. Karaciğerde yoğun bir şekilde ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Asetilsistein plazma ve akciğerlerde hem serbest hem de disülfid köprüleri ile proteine geri dönüşümlü bağlanmış halde bulunur. Oral uygulama sonrası 0.5–1saat içinde doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır. Yaklaşık %50'si plazma proteinlerine bağlanan asetilsistein' in plazma eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 6 saattir. Vücutta birikmez, dokularda özellikle akciğer dokusunda yüksek

konsantrasyonda bulunur. Karaciğerde metabolize edilir ve böbrek, karaciğer ve akciğer dokusundan atılır.

Endikasyonları

- Akut ve kronik bronkopulmoner hastalıklar (örneğin; pnömoni, bronşit, amfizem, trakeobronşit, kronik astmatik bronşit, tüberküloz, bronşiektazi, akciğerin primer amiloidozu).
- Mukus tıkaçı nedeni ile oluşmuş atelettazi.
- Kardiyovasküler ve pulmoner toraks cerrahisine bağılı olan pulmoner komplikasyonlar.
- Enfeksiyona bağılı veya sigaranın ve solunum ile alınan diğer kimyasal ajanların akciğerde meydana getirdiği oksidatif hasarın önlenmesinde.
- Yüksek doz parasetamol alımına bağılı olarak ortaya çıkan karaciğer yetmezliğinin önlenmesinde.

NAC terapötik kullanımı

Sepsis ve ÇOY' nin altta yatan kesin mekanizmaları bilinmemesine rağmen inflamatuvar bir süreç temel rol oynar. NAC 'ın antioksidan özelliklerinden ayrı inflamasyonun diğer basamaklarında da etkili olmaktadır. Bazı çalışmalar TNF üretimini süprese ettiğini ve trombosit ve nötrofil agregasyonunu inhibe ettiğini desteklemektedir. NAC ile yapılan insan ve hayvan çalışmalarının çoğunda sepsis ve ASSS' daki klinik etkileri araştırılmıştır. NAC' ın protektif etkilerini ASSS 'da , serbest oksijen radikallerinin yakalayıcısı olması ile ilişkili gibidir.

Cuzzocrea ve ark.' ları (86), ratlarda zymosanın indüklediği peritonitte intraperitoneal NAC kullanmışlar, peritonit gelişiminin, morfolojik yıkımın ve nötrofil infiltrasyonunun, peroksinitrit üretiminin azaldığını ve peroksinitrit yakalanması ve nötrofizasyonunun arttığını göstermişlerdir. NAC' in potent antiinflamatuvar etkileri göstermişlerdir .

Koch ve arkadaşları , bir hayvan çalışmasında NAC tedavisi sonrası septik tavşanlarda gronüositlerin bakteri öldürmesini bozduğu göstermiştir (87). Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, NAC ile ön tedavi , kanda E.Coli dağılımını geciktirir ve karaciğer, akciğer ve böbrekte daha yüksek kolonizasyonla sonuçlanır. PMNL'

de oksidatif patlamayı baskılar. Mikroorganizmalara karşı bakterisidal mekanizmada önemli olan oksidatif patlamanın baskılanması, yoğun bakım hastalarında NAC tedavisi ile konak savunmasını bozabilir. Prospektif, randomize, plasebo kontrollü bir çalışmada heterojen yoğun bakım hastalarında, NAC tedavisi ile herhangi bir mortalite artışı gösterilememiştir (88).

II. C. 2. Metilprednizolon

Metilprednizolon oral veya parenteral yoldan antiinflamatuvar ve immünsüpresif olarak kullanılan glukokortikoidlerdir. Moleküler ağırlığı 374.48, kimyasal formülü $C_{22}H_{30}O_5$ 'dir.

Kortikosteroidler IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, $TNF\alpha$ ve granülosit- makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi inflamatuvar olaylara aracılık eden sitokinlerin transkripsiyonunu inhibe eder (89). Kortikosteroidler NF- κ B ve aktivatör protein (AP)-1 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşir (90-92). AP-1 ve /veya NF - κ B, IL- 1, 2, 3, 6, 8, $TNF\alpha$, GM-CSF ve RANTES (regulated upon.Activation, NormalT-cell expressed and secreted) gibi inflamasyonda merkezi rol oynayan gen ürünlerinin yeniden düzenlenmesini sağlar. Kortikosteroidler bu genlerin ekspresyonunu inhibe edebilir. IL-2' nin transkripsiyonu aktive T hücrelerinin nüklear faktörü tarafından regule edilir ki bu faktör AP-1' e bağlanma yoluyla IL-2 gen transkripsiyonun inhibe edebilirler (93). Kortikosteroidlerin ayrıca IL-1 β , IL- 6 ve GM - CSF' ü kodlayan mRNA' da yıkımı arttırdığı da tespit edilmiştir (94,95).

İnflamatuvar hücreler içinde , platelet aktive eden faktör AP- 1 bağlanmasını aktive eder. Bu steroidler tarafından inhibe edilir. Kortikosteroidler ayrıca endotelin-1 sentezini inhibe eder. Endotelin-1 akciğer ve havayolu epitel hücrelerinde bronkokonstriktör etkili bir peptiddir.

Kortikosteroidler intraselüler adezyon molekülü-1 (İCAM-1) ve E-selektin gen transkripsiyonunu inhibe eder (96,97). İCAM-1 ekspresyonu NF- κ B aktivasyonuna bağlıdır (98). Kortikosteroidler hava yolu epitel hücrelerinde sekretuar lökosit proteaz inhibitörü (SLPI) ' nün sentezini artırır. SLPI 'nün havayollarında

predominant antiproteaz olduğu ve havayolu inflamasyonunu azaltmada önemli olduğu düşünülür (99).

Kortikosteroidler IL-1 yüzey reseptörüne etkiyle IL-1' in aktivitesini inhibe ederler (100,101). Kortikosteroidlerin selüler etkileride vardır. Steroidler, sirküle eden nötrofillerin kemik iliği üretimini stimüle ederek ve vasküler endotele adherensi bozarak, artmasına neden olur. Kortikosteroidler lizozomları stabilize eder, lizozomal enzim salınımını inhibe eder. Bu çalışmalarda yüksek doz steroid kullanılmış olup, farmakolojik ve fizyolojik olarak anlamlı değildir (102).

MNL hücreler (mononükleer), eozinofiller ve bazofiller steroid uygulanımı sonrası azalır. Makrofajlar tarafından salınan IL-1 ve TNF α , kortikosteroidlerle inhibe edilir (103). Steroidler tarafından makrofaj inflamatuvar protein-1 α (MIP-1 α) ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP) gen kodlaması inhibe edilmiştir (104,105). Kortikosteroidler eozinofillerden medyatör salınımı üzerine direkt inhibitör etkilidir ve eozinofil yaşamını uzatan IL-3 , IL-5 ve GM-CSF gibi sitokinlerin aktivasyonunu önler (106). T lenfositler için büyüme faktörü olarak davranan IL-1 β ve IL-2 steroidler tarafından azaltılır.

Glukokortikoidler tarafından değişik hücre tiplerinde IL-1, IL-2, IL-4, IFN $-\gamma$, GM-CSF ve TNF- α reseptörlerinde artış tespit edilmiştir (107). Glukokortikoidler doku hasarı ve enfeksiyona akut faz cevabı olarak IL-1 ve IL-6 tarafından indüklenen akut faz proteinlerini güçlü bir şekilde potansiyelize eder. Bu lokal veya sistemik inflamasyonun sınırlandırılmasında önemlidir (107). Kortikosteroidlerin immün cevabı nasıl optimize ettiği ve sitokin reseptörlerini arttırırken, sitokin üretimini azaltmada paradoksal etkinin anlaşılmasında ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

II. C. 3- Multivitamin preparatı

Vitaminler vücutta birçok metabolik süreç için az miktarlarda gerekli olan organik maddelerdir.Vücutta hiç sentezlenmezler ya da yetersiz ve çok az miktarlarda sentezlenirler.

Her flakonda: 3500 IU Vit A, 220 IU (5.5 μ g) Vit D₃ , 11.2 IU (10.2 mg) Vit E,125 mg Vit C, 3.51 mg Vit B₁, 4.14 mg Vit B₂, 3.53 mg Vit B₆, 0.006 mg Vit B₁₂

, 0.414 mg Folik asit, 17.25 mg Pantotenik asit, 0.069 mg Biotin, 46 mg Nikotinamid bulunur.

A VİTAMİNİ: Hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunda, görme ve üreme fonksiyonlarında ve steroid metabolizmasında görev alır. Normalde karaciğerde 10-300µ/ gA vitamini içerir.

D VİTAMİNİ : Fosfor ve kalsiyum homeostazisinde rol alır.Barsak , kemikler ve böbrekteki spesifik transport mekanizmalarını stimüle eder ve serum kalsiyum, fosfor seviyelerini artırır. D vitaminin başlıca etkileri arasında kalsiyum ve fosforun barsaktan aktif transportunun stimülasyonu , kalsiyum ve fosforun kemikten rezorpsiyonlarının stimülasyonu ve kalsiyumun renal reabsorpsiyonunun stimülasyonu bulunmaktadır.

Vitamin D (Kalsiferol) iskelet oluşumu ve mineral homeostazisi için gereklidir.

E VİTAMİNİ: Temel fonksiyonu bir antioksidan olarak hücre metabolizmasında bazı temel moleküllerin oksidasyondan korunması ve hücre membranlarının stabilizasyonudur. A vitamini ve karotenleri oksidasyondan korur. Eritrositlerdeki hemoglobin molekülünün "HEM" bölümünün sentezinin düzenlenmesinde rol alır.

B 1 VİTAMİNİ (tiamin): Oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır. Enerji metabolizmasındaki reaksiyonlar için gereklidir. Aktif şekli tiamin pirofosfat (TPP) karbonhidrat metabolizması ve nöral iletimde görev alır.

B 2 VİTAMİNİ (riboflavin): Hücresel enerji üreten enzimatik reaksiyonlarda görev alırlar.(Krebs döngüsü , solunum zinciri ,yağ asitlerinin ve pürin metabolizması)

NİASİN (nikotinik asit) : Aktif şekli ; nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) isimli koenzimdir. Bu iki koenzim hidrojen alıcısı ve vericisi olarak görev yapar. Karbonhidratların , lipidlerin ve proteinlerin sentez ve degradasyonunda görev alırlar.

BIOTİN : Karbonhidratların ,lipidlerin ve proteinlerin ara metabolizmalarında önemli göreve sahiptir.

B 12 VİTAMİNİ: Pirimidin ve DNA sentezi için gereklidir.

FOLİK ASİT : Tek başına biyolojik aktiviteye sahip değildir. Biyolojik aktif şekli indirgenmiş şeklidir. Methiyonin ,pürin ve nükleik asitlerin sentezinde görev alır.

C VİTAMİNİ: Hidrojen iyonlarının transferine ve intraselüler oksidasyon – redüksiyon potansiyelinin düzenlenmesine katkıda bulunur. Amino asit , kollajen ,

ilaçların mikrozomal metabolizması , adrenerjik hormonların üretimi ve metabolizması ve folat metabolizması için gereklidir. Ayrıca bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmasında ve antikor sentezinde görev alır.

III. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel tez çalışması, CBÜ Hayvan Etik Kurul'unun 2007/018 protokol numaralı onayı alındıktan sonra, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi Laboratuvarında, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, Wistar albino cinsi, 40 erişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

Deneysel model olarak intraperitoneal E.Coli standart suşu enjeksiyonu yapılarak SİYS (sistemik inflamatuvar yanıt sendromu) tablosu oluşturulan sıçanlarda, intratrakeal yolla uygulanan NAC, Metilprednizolon ve Vitamin Kompleksinin akut akciğer hasarı üzerine olan etkilerinin araştırılması planlandı. İntratrakeal ilaç uygulamasına bağlı akciğer histolojik kesitleri ve TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyleri ölçüldü.

Çalışma modeline başlamadan önce her grup için sıçanlarda trakeostomi açılması ve solutulma koşullarının değerlendirmek üzere her grup için örnek çalışmalar yapıldı.

Araştırma kapsamında 4 farklı deneysel sıçan grubu oluşturuldu. Her biri 7 adet 250-300 gr olan sıçanlara standart sedasyon ve analjezi uygulandıktan sonra, tüm gruplara intraperitoneal standart E.Coli suşu (No: ATCC25922) 0.5 Mcfarland (1 ml) enjekte edilerek deneysel sepsis modeli oluşturuldu. Sepsisin organlar üzerine oluşturduğu bilinen etkilerinin akciğer hasarı oluşturduğu kabul edildi.

Deneysel akciğer hasar modeli oluşturulması için intraperitoneal E.coli enjeksiyonundan sonra 3 saat beklendi ve ardından 4. saatte intratrakeal ilaç uygulaması için Albino sıçanlara trakeotomi açılması planlandı. İntraperitoneal 66 mg / kg Ketamin ve 7 mg / kg Ksilazin anestezisi altında steril koşullarda uygulandı. Anestezi etkisi 5 dakika içinde gözlemlendi. Sıçanlar cerrahi masasına supin pozisyonda yatırıldı. Ekstremitelerinden fiksasyon uygulandı. Boyun ön kısmındaki tüyler kesilip, cerrahi işlem için cilt povidon iyodin solüsyonu ile temizlendi.

Orta hatta longitudinal 2-3 mm 'lik cilt insizyonu sonrası , longitudinal boyun kasları (sternohyoid ve longus coli) disseke edildi. Trakea ortaya çıktıktan sonra, trakeal halkalar arasından transvers insizyon yapıldı. 1.5 cm uzunluğunda daha önceden bu işlem için hazırlanmış olan 18 G epidural tough iğnesi aplikatörü trakeotomi kanülü olarak yerleştirildi. 0.5 cm' lik kısım dışarıda kalacak şekilde bırakıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu) (n=7) sepsis modeli oluşturulduktan sonra trakeostomi kanülü yerleştirildi. Herhangi bir tedavi verilmedi. 4. saat sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer dokuları alındı.

Grup 2 (Steroid grubu) (n=7) sepsis modeli oluşturulduktan sonra trakeostomi kanülü yerleştirildi ve intratrakeal (2mg / kg) 0.15 ml içinde 0.5 mg Metilprednisolon verilerek yaklaşık 30dk spontan solunumda beklendi ve daha sonra balon-valv desteği ile 20 kez solutuldu. 30 . dk sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer dokuları alındı.

Grup 3 (NAC grubu) (n=7) sepsis modeli oluşturulduktan sonra trakeostomi kanülü yerleştirildi ve intratrakeal (10 mg / kg) 0.15 ml içinde 2 mg NAC verilerek yaklaşık 30dk spontan solunumda beklendi ve daha sonra balon-valv desteği ile 20 kez solutuldu. 30 . dk sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer dokuları alındı.

Grup 4 (Vitamin grubu) (n=7) sepsis modeli oluşturulduktan sonra trakeotomi kanülü yerleştirildi ve intratrakeal (10 mg / kg) 0.15 ml içinde (2.5 mg Vit E, 875 IU Vit A, 55 IU (1.37 µg) Vit D₃ , 31 mg Vit C, 0.87 mg Vit B₁, 1.03 mg Vit B₂, 0.88 mg Vit B₆, 0.0015 mg Vit B₁₂ , 0.103 mg Folik asit, 4.31 mg Pantotenik asit, 0.017 mg Biotin, 11.5 mg Nikotinamid) vitamin kompleksi verildi. Uygulama sırasına göre 2. ve 6. sıçanlar intratrakeal ilaç uygulamasından sonra solunum sayıları ve hacimleri azaldı. Trakeostomi kanülünden balon-valf ventilasyon desteği ile solunumları asiste edildi. Yaklaşık 10-12 solutmanın ardından spontan solunumlarının sayı ve tidal volüm olarak yeterli şekilde geri döndüğü izlendi. Tüm sıçanlar 30 dk spontan solunumda bekledi. 30. dk sonunda balon-valv desteği ile 20 kez solutuldu. Ardından sıçanlar sakrifiye edilerek akciğer dokuları alındı. Bu gruptaki akciğer dokuları makroskopik olarak diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha ödemli ve hemorajik olarak izlendi.

III. A. Histolojik Değerlendirme

Akciğer dokuları direkt %10' luk formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve alınan kesitler dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin ile boyanır iken, diğer kesitler TNF- α , IL-6 ve IL-10 dağılımlarını göstermek amacı ile indirekt immünohistokimya tekniği ile incelendi.

Parafin doku takibi: Tespit edilen akciğer 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 1).

Tablo 1: 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	

Hematoksilen-Eozin boyaması: Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5µ' 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, Peterborough, 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 2).

Tablo 2: 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	

İndirek İmmunohistokimya boyaması: Alınan akciğer 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 H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS; ile yıkanan kesitler 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti- TNF- α , (HP8001-3421P18, Hycult Biotechnology, Uden, NL), anti-IL-6 (AB6672, Abcam,) ve anti-IL-10 (R&D Systems,) 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 (KP500 DBS Universal HRP İmmunostaining Kit) 30'ar dakika boyandı. Her bir ikincil antikor 3 defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla kesitler diaminobenzidin (DAB) kromojeni ile 5 dk boyandı. Boyalı kısımlar kahverengi olarak gözlenir. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumumu (00-8030 Hismount mountain Solution, San Francisco, USA) ile kapatıldı (Tablo 3). İmmunohistokimyasal değerlendirme iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek elde edildi. Boyanma şiddeti negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirildi.

Tablo 3: İndirek immunohistokiyasal 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	TNF- α : 1/10 dilüsyon	18 saat, 4° de
	IL-6: 1/400 dilüsyon	
	IL-10: 1/5 dilüsyon	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Kapatma maddesi	

III. B. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Mean±SEM olarak verilen değerlendirmelerin karşılaştırılmasında p< 0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

IV. A. Histokimyasal İnceleme

Alınan örneklerin H-E ile boyanmış kesitler üzerinde histokimyasal inceleme sonucunda ;

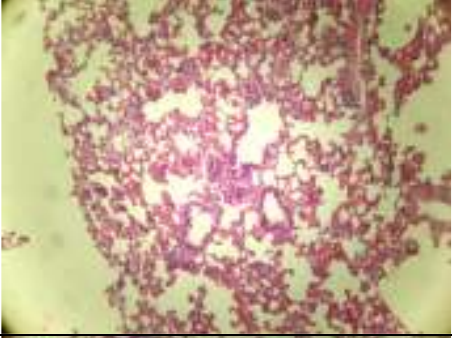
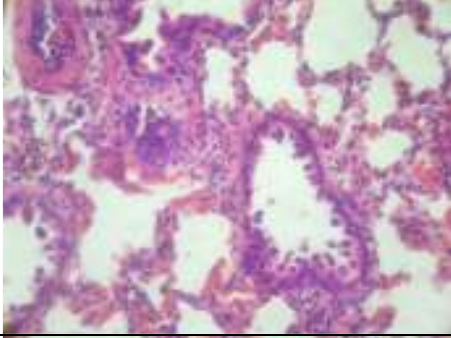
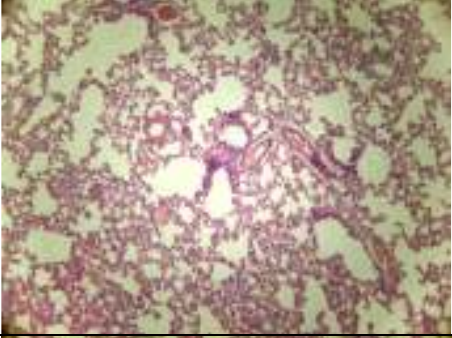
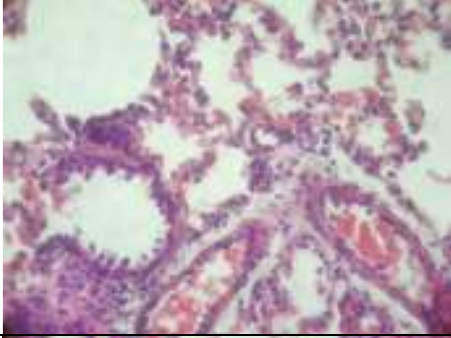
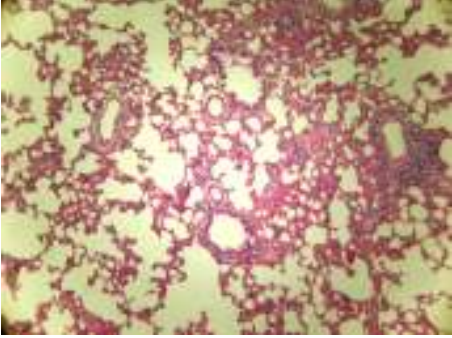
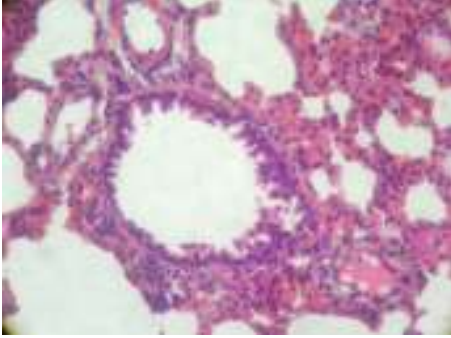
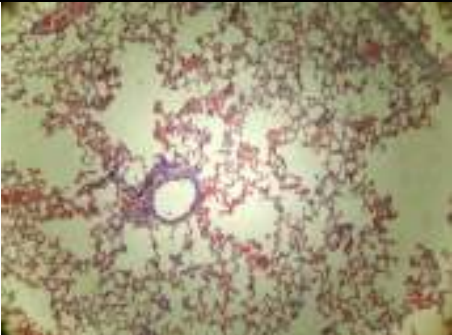

İlaç verilmeyen kontrol grubunda (Grup 1) akciğer dokusunda PMNL infiltrasyonun gözlendiği, yer yer kanama odaklarının bulunduğu ve periferde yer yer ise atelektazik alveolar görünüm izlendi. PMNL infiltrasyonunun daha çok damarlar etrafında olduğu, interalveolar septumda daha az olduğu saptandı.

Metilprednizolon uygulanan (Grup 2) grupta eritrosit infiltrasyonun daha az olduğu, PMNL infiltrasyonunda damarsal bölgelerde daha fazla olmak üzere yer yerde interalveolar bölgelerde olduğu izlendi. Akciğer dokusunun ne periferinde nede merkezi kısımlarında atelektazik görünüm saptanmadı.

NAC uygulanan (Grup 3) grupta PMNL infiltrasyonunun daha çok damar çevrelerinde kümelenmeler şeklinde yoğunlaştığını, interalveolar septumun yer yer kalın olduğu ve atelektazik değişikliklerin olmadığı gözlendi.

Vitamin Kompleksi uygulanan (Grup 4) grupta interalveolar septumda daha yaygın olmak üzere eritrosit infiltrasyonun olduğu ve bu kanama odaklarının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptandı. PMNL infiltrasyonu ise esas olarak damar etrafında gözlenir iken interalveolar alanda daha az idi. Atelektazik görüntülerin periferde daha fazla olmakla birlikte yer yer merkezi bölgelere doğru ilerlediği gözlendi. İnteralveolar septumlar diğer gruplara oranla daha azalmış olarak saptandı.

Tüm gruplarda tip I, tip II alveolar hücreler ile respiratuar ve terminal bronşoller histolojik olarak normal olarak değerlendirildi. (Resim 1)

Gruplar	X100	X400
İlaçsız grup		
Steroid		
NAC		
Vitamin		

RESİM 1: Tüm grupların akciğer dokularından alınan kesitlerin Hemotoksilen-Eozin (H-E) boyası ile değerlendirilmesi. X100, X400.

IV. B. İmmunohistokimyal İnceleme

İndirekt immünohistokimya tekniği kullanılarak TNF- α , IL-6 ve IL-10 dağılımları indirekt immünohistokimya tekniği ile incelendi. Her üç markırın dağılımları esas olarak hücre infiltrasyonu gözlenen damar etrafında ve yer yer interalveolar septumda gözlemlendi. Pozitif olarak boyanmalar özellikle infiltrate hücre veya akciğer dokusunda enfeksiyon sonucu aktive olmuş hücrelerin sitoplazmalarında kahverengi renkte boyalı olarak tespit edildi. Tip I, tip II alveolar hücreler ile respiratuar ve terminal bronşioleleri oluşturan epitel hücrelerinde boyanma gözlemlenmedi.

TNF- α dağılımı: İlaçsız ve NAC uygulanan gruplarda TNF- α immunoreaktivitesinin orta şiddete olduğu gözlemlenirken, metilprednizolon uygulanan grupta orta şiddette immunoreaktivite gözlenmesine rağmen yer yer immunoreaktivitenin kuvvetli pozitif olduğu gözlemlendi. Vitamin grubunda ise TNF- α immunoreaktivitesinin yer yer negatif, yer yer zayıf şiddette olduğu izlendi.

IL-6 dağılımı: İlaçsız ve NAC uygulanan gruplar karşılaştırıldığında IL-6 immunoreaktivitesinin benzer olduğu ve orta şiddete olduğu gözlemlenirken, vitamin grubunda yer yer negatif ve yer yer zayıf şiddette, metilprednizolon uygulanan grupta ise negatif olarak gözlemlendi.

IL-10 dağılımı: NAC ve metilprednizolon uygulanan grupta IL-10 immunoreaktivitesi zayıf şiddete gözlemlenirken, vitaminli ve ilaç verilmeyen grupta yer yer zayıf şiddete iken, yer yer negatif olarak saptandı.

Tablo 6: TNF- α , IL-6 ve IL-10 dağılımlarının indirek immünohistokimyasal karşılaştırılması

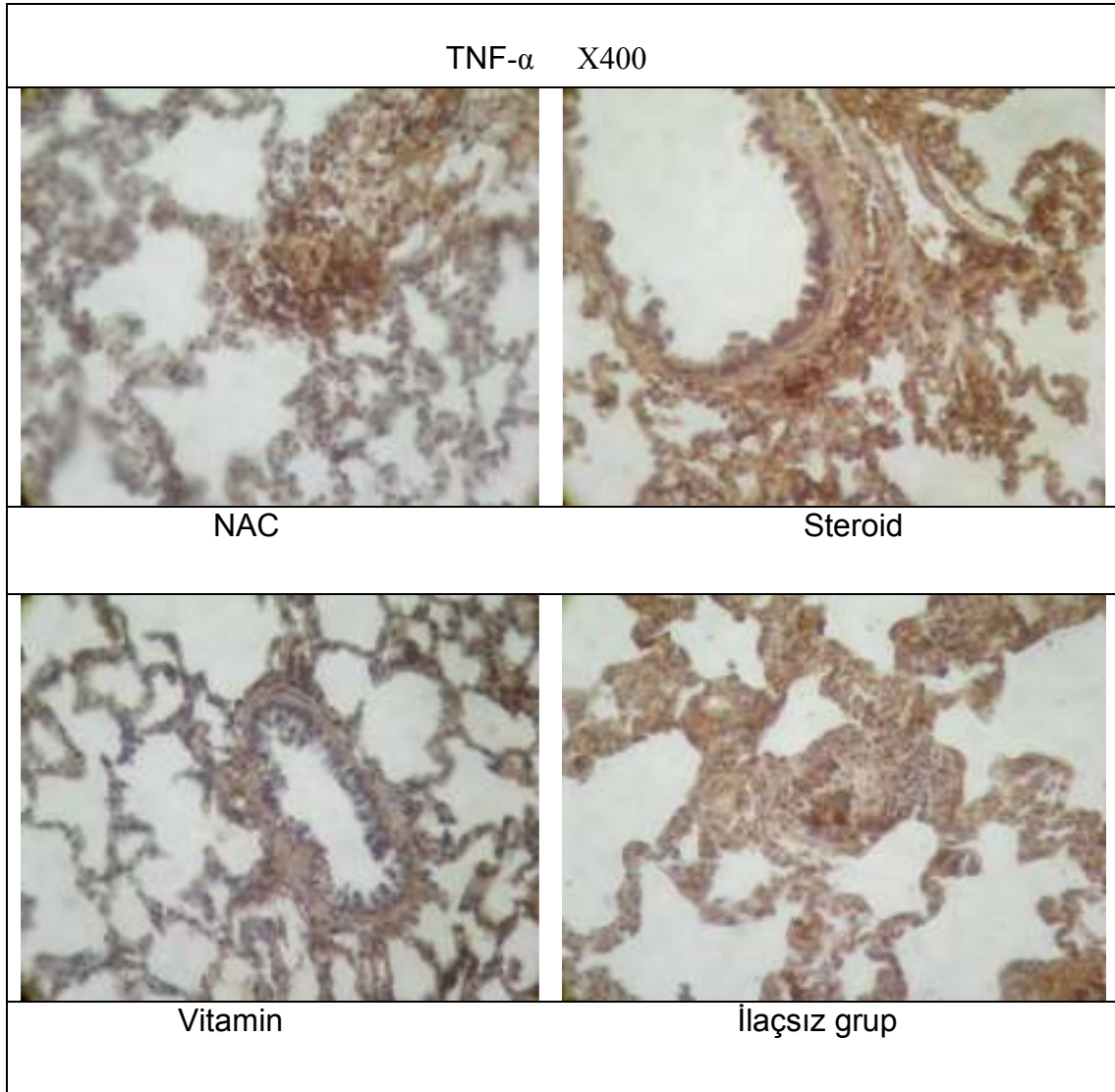
Gruplar	TNF- α	IL-6	IL-10
NAC	++	++	+
METİLPREDNİZOLON	++/+++	-	+
VİTAMİN	-/+	-/+	-/+
İLAÇSIZ GRUP	++	++	-/+

Gruplar	TNF- α	IL-6	IL-10
NAC	1.8 \pm 0.20	1.6 \pm 0.16	0.8 \pm 0.13
METİLPREDNİZOLON	2.7 \pm 0.15	*0.4 \pm 0.16	0.8 \pm 0.13
VİTAMİN	*0.5 \pm 0.17	**0.7 \pm 0.16	0.4 \pm 0.16
İLAÇSIZ GRUP	1.6 \pm 0.16	1.7 \pm 0.15	0.6 \pm 0.16

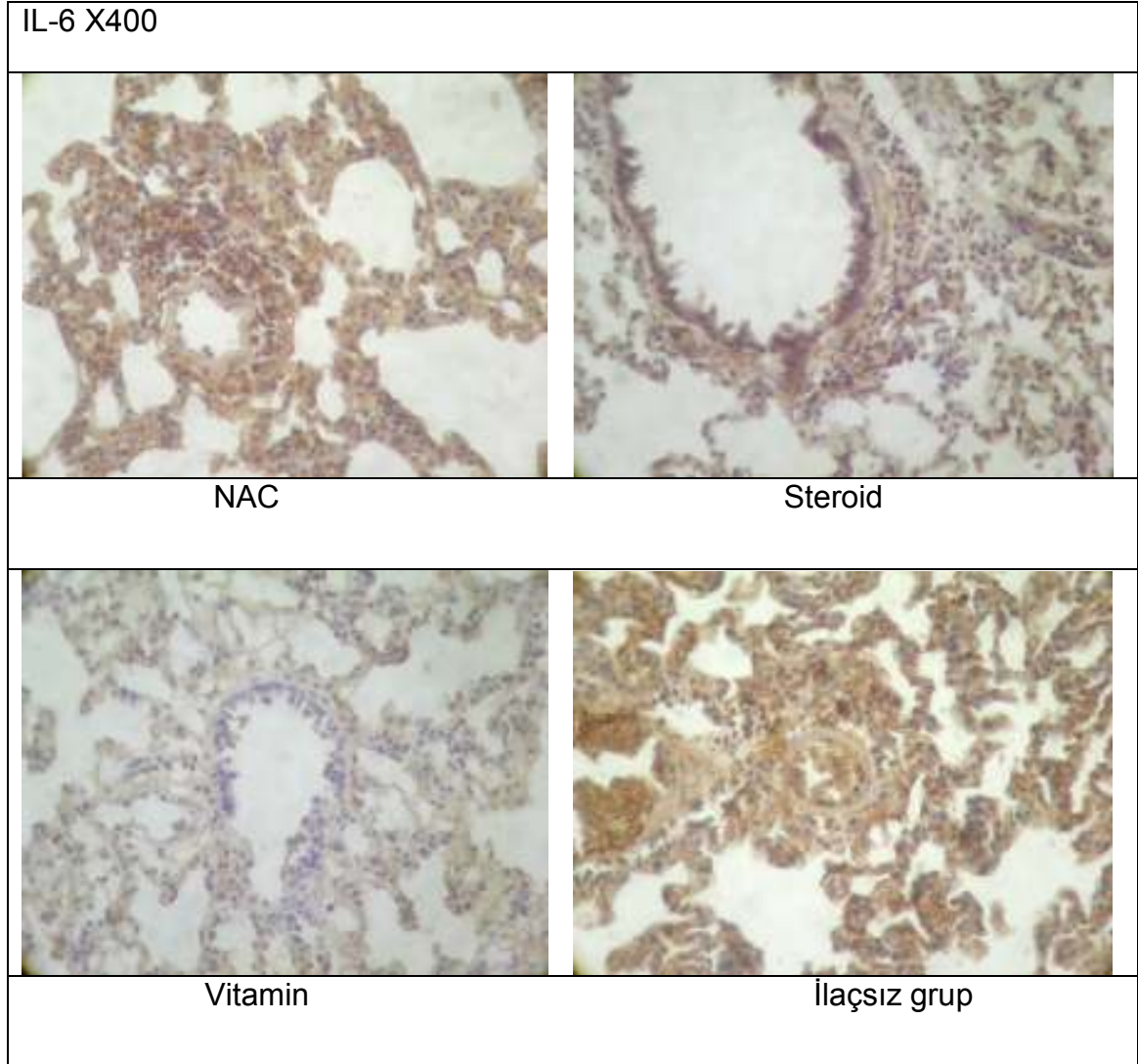
** P<0.01 vitamin kompleksi grubu NAC ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

* P<0.001 metilprednizolon grubu, NAC ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

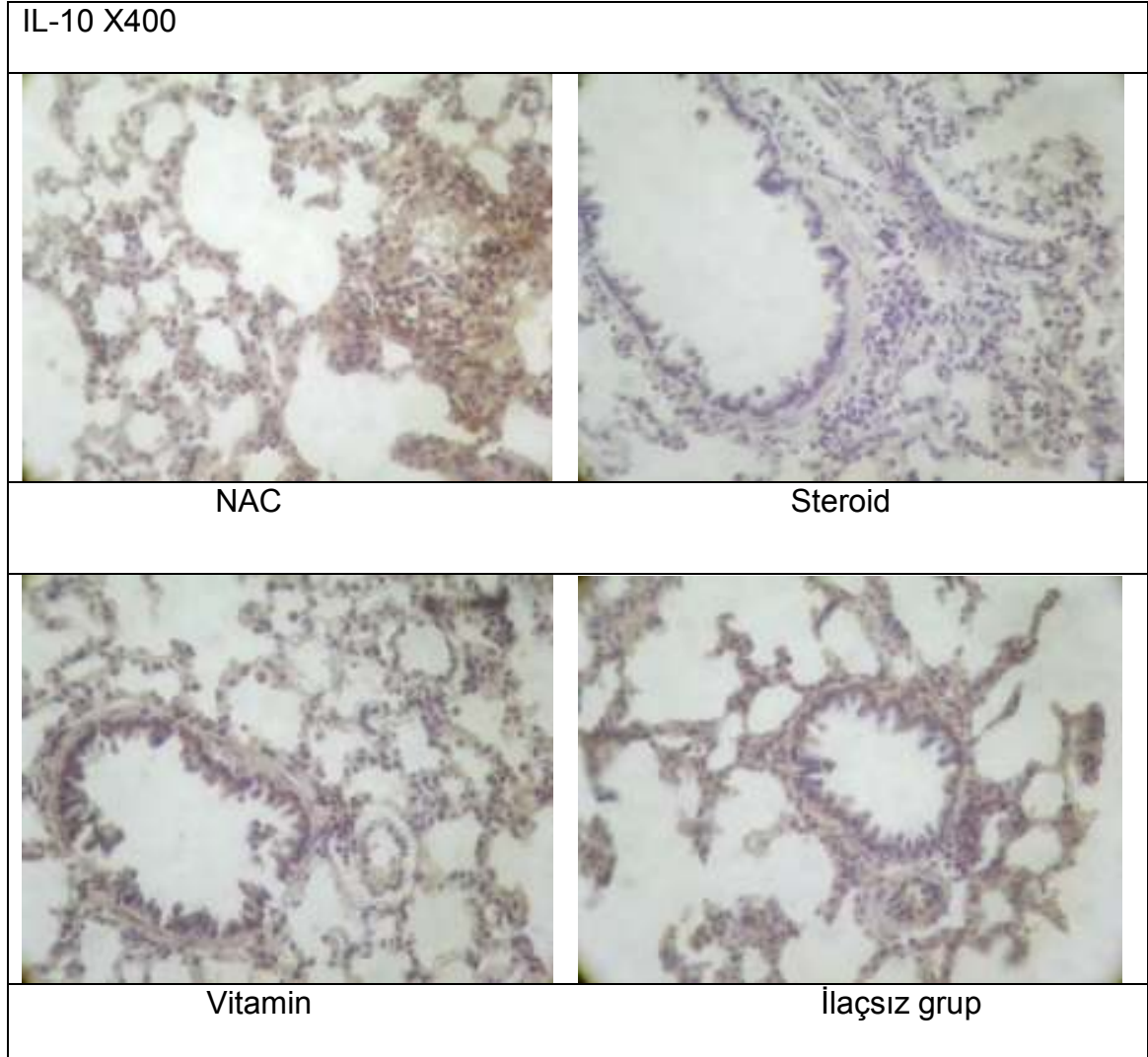
* P<0.001 vitamin kompleksi grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında



RESİM 2: NAC, Metilprednizolon, Vitamin ve ilaç uygulanmayan grupların akciğer dokularından alınan kesitlerde TNF- α dağılımı. X400.



RESİM 3: NAC, Metilprednizolon, Vitamin ve ilaç uygulanmayan grupların akciğer dokularından alınan kesitlerde IL-6 dağılımı. X400.



RESİM 4: NAC, Metilprednizolon, Vitamin ve ilaç uygulanmayan grupların uygulanan akciğer dokularından alınan kesitlerde IL-10 dağılımı. X400.

V. TARTIŞMA

Akciğerlerde nötrofil sekestrasyonu, ASSS' nun patogenezinde önemli rol oynar. PMNL birikiminin enfeksiyöz/ nonenfeksiyöz uyarılarla başlatılan hücresele olayların bir sonucu olduğu düşünülür. Akciğer interstisyumunda ve alveollerinde bulunan hücrelerin, özellikle makrofajların lokal aktivasyonu, bazı proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IL-1) ve kemokinlerin (IL-8 ve MIP-2) yüksekliğine aracılık eder. Bu medyatör moleküller, SOR' u ve proteolitik enzimlerle inflamasyon ve zedelenme alanında, endotelial hücre adezyon molekülünün ekspresyonuyla PMNL sekestrasyonunu ve interstisyal / alveolar alana PMNL migrasyonunu artırır (108).

Biz deneysel sepsis ile oluşturduğumuz akut akciğer hasarı modelinde NAC, metilprednizolon ve vitamin kompleksini intratrakeal uyguladık. Kontrol grubuna herhangi bir medikasyon uygulamadık. Histokimyasal değerlendirmede ilaç verilmeyen grupta akciğer dokusunda PMNL infiltrasyonun gözleendiği, yer yer kanama odaklarının bulunduğu ve periferde ise atelektazik alveolar görünüm izlendi. Metilprednizolon uygulanan grupta, eritrosit infiltrasyonun daha az olduğu, akciğer dokusunun periferinde ve merkezi kısımlarında atelektazik görünüm saptanmadı. NAC uygulanan grupta ise interalveolar septumun yer yer kalın olduğu ve atelektazik değişikliklerin olmadığı gözleendi. Vitamin Kompleksi uygulanan grupta ise interalveolar septumda daha yaygın olmak üzere eritrosit infiltrasyonun olduğu ve bu kanama odaklarının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptandı. Atelektazik görüntülerin periferde daha fazla olmakla birlikte yer yer merkezi bölgelere doğru ilerlediği gözleendi. Tüm gruplarda PMNL infiltrasyonu ise esas olarak damar etrafında gözlenir iken interalveolar alanda daha az idi. Kontrol grubu dışında tüm tedavi grupları PMNL oluşumunu önlemede etkili bulundu.

NAC uygulanan grupta TNF- α ve IL-6 immunoreaktiviteleri kontrol grubu ile benzer olmasından dolayı, NAC uygulanmasının akut akciğer hasarında terapötik

etkinliği anlamlı olmayabilir. Bununla beraber IL-10 immunoreaktivitesinin NAC grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında zayıfda olsa artmış olduğu gözlemlendi. IL-10, koruyucu aktivitesini IL-1 β , TNF- α , IL-8, interferon- γ , NO, IL-6 ve prostaglandin metabolitleri gibi inflamasyon mediatörlerini inhibe ederek gösteren, immün cevabın önemli bir regülatörüdür. Bu nedenle, NAC' ın inflamatuvar sürecin tedavisinde olumlu etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Metilprednizolon TNF- α ' ın kontrol grubuna göre artmış olarak izlenmesi TNF- α ' yı baskılamada yetersiz olsada, IL-6' yı azaltması ve IL-10' nun artmış immünreaktivitesi nedeniyle akciğer hasar mekanizmasında koruyucu etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Vitamin kompleksi verdiğimiz hastalarda, IL-10 immünreaktivitesi gözlenmesede , TNF- α ve IL-6 azalması bu amaçla tedavide kullanımını anlamlı olduğunu düşündürmektedir. İntratrakeal uygulanan ilaç gruplarının akciğer hasarında salınan sitokinler üzerinde farklı mekanizmalarla olumlu etkileri izlenmiştir.

Travma sonrası hemorajik şokun ASSS patogenezine immün sistem aracılığıyla katkıda bulunduğu ve inflamatuvar stimulusa cevap organ hasarını arttırdığı düşünülür (109).

Jie Fan ve ark. (110), şok sonrası gelişen akciğer hasarında NAC' i resüsitasyon sıvısında ve lipozomal formda NAC / α -Tokoferölü intratrakeal olarak kullanmıştır. Bu model ile, artmış lökosekestrasyon ve akciğer hasarına cevap olarak sitokinlerle indüklenen nötrofil kemoattractan moleküllerinin (CINC) ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Oksidanlar aracılığıyla oluşan bu hasarlanma mekanizmalarında , resüsitasyon sıvısında antioksidan etkili NAC kullanımı, CINC' da artışı ve PMNL sekestrasyonunu önlemiş ve akciğer hasarını imkansız hale getirmiştir. Çalışmada lipozomal NAC ve lipozomal α - tokoferol kullanılmış, parenteral NAC kullanımıyla LPS ile indüklenen akciğer hasarında geçici koruma sağlanmış, düşük doz intratrakeal lipozomal antioksidanlar, şok sonrası ASSS 'da uzun süreli koruma sağlamıştır. Bu çalışmada birkaç farklı antioksidan formül test edilmiştir. NAC çok sayıda fonksiyona sahip hidrofilik bir antioksidandır. NAC' nin antioksidan aktivitesi, sistein gruplarını vermesi ve endojen intraselüler glutatyon seviyelerini arttıran bir substrat olarak

davranmasından kaynaklanır (111). NAC ayrıca direkt SOR yakalayıcısı olarak da fonksiyon görür.

Literatüre bakıldığında multivitamin preparatları ile çalışılmamıştır. En çok vitamin E ile yapılan çalışmalar mevcuttur. Vitamin E' nin major komponenti α -Tokoferol' ün, SOR yakalayıcısı ve poliansatüre yağ asitlerini içeren membranların stabilizasyonunda etkileri olduğu gösterilmiştir (112-113). α -Tokoferol yağda çözünen bir moleküldür ve akciğerlere direkt dağılılabılır. α -Tokoferol lipozomlar içinde yer aldığı anda, akciğerlere dağılımı daha yüksek oranda olur. Jie Fan ve ark. (110), lipozomal kapsülle çevrili antioksidanların, NAC ve α -Tokoferol' ün, ASSS' da etkili koruma sunduğu gösterilmiştir. Bunu, düşük doz intratrakeal direkt dağılım ile yapıyor gibi görünmektedir. Bu sistem, major travma sonrası akciğerde diğer antiinflamatuvar tedavilerle ve antioksidan dağılımında etkili bir terapötik yaklaşım sunmaktadır.

α -TOC (veya Vit E) yakın zamanda bir çalışmada tanımlandığı gibi, düşük konsantrasyonlarda bütün hücre membranlarında bulunan doğal antioksidandır (114). SOR' larını yüksek oranda yakalayabilme yeteneği ile hücre membranlarında lipid peroksidasyonu azaltan sitoprotektif etkilere sahiptir (115,116). Hipoksiye bağlı AAH' ı geliştirilen bir rat modelinde (117), Lip α -Tok uygulaması, akciğer dokusunda lipid peroksidasyonu inhibe etmiş ve akciğerin fosfolipid kompozisyonunu normal kontrol seviyelerine döndürmüştür. Bu etkiler oksijenizasyon ve akciğer mekaniklerindeki düzelmeyele ilişkilidir.

Rocksén ve ark. (114), inhale LPS' e bağlı AAH' da tedavide terapötik bir ajan olarak α -TOC' ün rolünü çalışmışlardır. LPS maruziyetini takiben intraperitoneal verilen Lip α -Tok, akciğer hasarına karşı ciddi koruma sağlamıştır. LPS maruziyeti sonrası uygulanan α -TOC' ün yararlı terapötik etkiler sunduğu rapor edilmiştir. Bunun dışında, α -TOC glukokortikoidlerden farklı mekanizmayla koruyucu etkiler sunmaktadır. α -TOC' ün yararlı etkileri, sitokin ve kemokin transkripsiyonu ve ekspresyonu üzerine olan etkilerden bağımsızdır.

Chung-Wai Chow ve ark. (118) yaptıkları çalışmada, aerolize LPS, SOR' leri ve inflamatuvar sitokin üretiminin eşlik ettiği alveolar alana nötrofil göçünü gösteren bir inflamatuvar cevabı indüklemiştir. LPS maruziyetini takiben düşük dozlarda bile uygulanan α -TOC tedavisi, alveolar alana nötrofil göçünü ve nötrofil SOR üretimini

önemli ölçüde azaltmıştır. Sentetik bir glukokortikoid olan deksametazonla karşılaştırıldığında, α -TOC ayrı ve additif mekanizma üzerinden koruyucu etkilerini gösterdiği gözlenmiştir. Deksametazonun aksine, α -TOC inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonel regülasyonu veya ekspresyonu, NF- κ B transkripsiyonu üzerine hiçbir etkisi olmamıştır. Şaşırtıcı olan, α -TOC tedavisi, periferik nötrofil ve pulmoner vasküler alana nötrofil sekestrasyonunu etkilemesede, LPS' e bağlı alveolar nötrofil göçünü ve alveolar nötrofiller tarafından oksidan üretimini önlemiş olmasıdır. Aerolize LPS' in akciğer hasarı sonucu güçlü bir pulmoner inflamatuvar cevabı indüklemesine rağmen, bu deney modeli sepsis ve septik şokla ilişkili insan AAH/ASSS' unun kompleks spekturumunu yansıtmaz. Ayrıca, fare ve insan nötrofilleri arasında, inflamatuvar doku hasarlanma patogenezinde önemli olan, NO üretiminin tanınması ve savunma yetersizliği gibi, önemli farklılıklar vardır. Bu ve diğer sebeplerle, hayvan çalışmalarında büyük gelecek vaad eden tıbbi yaklaşımlar, ASSS'da antioksidanların kullanımını da içeren insan çalışmalarında karışık sonuçlar verebilir (119-120).

Shang Jyh Jao ve ark. (121), LPS' lerin indüklediği AAH' da anestezi altındaki ratlarda NAC' in etkinliği göstermişlerdir. NAC' in bunlar dışında LPS' e bağlı oluşan lökositopeni ve NO (nitrik oksit) üretimini azaltarak sistemik hipotansiyonu düzelttiği, (122,123) , ayrıca sistemik dolaşımdan akciğere lökosit şiftini azaltarak AAH ını düzelttiği gösterilmiştir. Septik ve inflamatuvar durumlarda, endotelial ve epitelyal hücreler, makrofajlar, nötrofiller, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlarda nitrik oksit sentezi aktive edilir (124,125). Shang Jyh Jao ve ark. (121) yaptıkları hayvan deneyinde, NAC endotoksemi sonrası sağkalım oranlarını dikkate değer bir şekilde düzeltmiştir. NAC ' in LPS'e bağlı nitrat / nitrit, hidroksi radikalleri, TNF- α ve IL-1 β ' deki değişiklikleri azalttığını bulmuşlardır. Bu bulgular, NAC ' in sadece bir SOR tutucusu değil, aynı zamanda nitrik oksit sentezi ve sitokin inhibitörü olduğunu destekler. Endotel kökenli NO, serbest radikaller ve sitokinler septik tabloda rol oynar (126-129). NAC'in bunlar üstündeki etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaları NF - κ B, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz, aktivatör protein-1, strese bağlı protein kinaz ve diğer moleküllerin inhibisyonu yoluyla (130-132). Agouridakis ve ark.' ları (133), TNF- α , IL-1, vasküler adezyon molekülü-1 ve solubl interselüler adezyon molekülü-1 gibi

proinflamatuvar sitokin ve adezyon moleküllerinin, ASSS' lu hastaların bronkoalveolar lavaj sıvılarında arttığını göstermişlerdir. Sonuçlar, NAC 'nin endotoksemiye bağlı AAH' nı önlemede iyi bir seçim olabileceğini desteklemektedir.

Bizim çalışmamızda ise NAC uygulaması sonrası TNF- α ve IL-6 üretimi baskılanmamış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark bulunamamıştır.

ASSS' lu hastalarda hastalığın erken döneminde yüksek miktarlarda uygulanan kortikosteroidlerin yararlı etkilerinin olmadığını gösterilmiştir. Buna karşılık ASSS' nun geç dönemi, fibroproliferatif fazda kortikosteroidler faydalı olabilir (134). Hipotalamik-hipofiz-adrenal aks tarafından üretilen kortikostreoidler, IL-4, IL-10, IL-1 ve TNF- α reseptör antagonistleri gibi antiinflamatuvar etkileriyle, konakçı savunmasının düzenlenmesinde de gereklidir (135). Kortikosteroidler, TNF- α , IL-1, IL-2 ve IL-6 ' nın transkripsiyonunu ve birçok seviyede konakçı savunmasını inhibe eder. Ayrıca, fosfolipaz A-2, siklooksijenaz-2 ve nitrik oksit sentaz -1 genlerinin sentezini inhibe ederek, inflamatuvar yolda 3 anahtar molekül olan prostanooidlerin, platelet aktive edici faktör ve nitrik oksitin üretimini azaltırlar. Ek olarak, kortikosteroidler adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve fibrogenesis üstünde inhibitör etkiye sahiptir. Sitokinler, bazı hastalarda konak savunmasını cevabını sınırlamada reseptör bağlanma afinitesini azaltarak, glukokortikoidlere direnç geliştirebilirler (136-137). ASSS' da steroidlerin kullanımı fibroproliferatif fazda daha mantıklı görünmektedir.

Literatürde metilpredizolon ile yapılmış hayvan çalışmalarına rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda metilprednizolon TNF- α ' nın kontrol grubuna göre artmış olarak izlenmesi TNF- α ' yı baskılamada yetersiz olsada, IL-6' yı azaltması ve IL-10' nun artmış immünreaktivitesi nedeniyle akciğer hasar mekanizmasında koruyucu etkileri olabileceğini göstermektedir.

Meduri ve ark. (138), geç dönem ASSS ' lu 9 hastanın plazma ve BAL sitokin seviyeleri üzerine kortikosteroid tedavisinin etkilerini, ölmeden önce sitokin konsantrasyon ölçümleri yapılmış, ASSS' dan kaybedilen 12 hasta ile karşılaştırmışlardır (139). Steroidle tedavi olan 9 hastanın bazal plazma ve BAL sitokin seviyeleri, karşılaştırma grubuna benzer bulunmuştur. Kortikosteroidle tedavi edilen hayatta olan hastaların, plazma ve BAL sıvısında TNF- α , IL-1³, IL-6,

ve IL-8 konsantrasyonlarında dikkate değer azalma olduğunu bulunmuştur. Değişik sitokin seviyelerindeki azalmalar, sadece steroid uygulanmasında 5-14 gün sonra görülmüştür. Steroid tedavisinin uygulanma zamanı ve süreside önemlidir. Deneysel akciğer hasarında, uzun süreli steroid uygulamasını akciğer kollajenini ve ödem oluşumunu azaltmada etkili olmuştur. Steroid çekilmesi sonrası bu pozitif etki hızla azalmıştır (140). Deneysel bir modelde AAH' nın ilk 6 gününe kortikosteroid tedavisinin sınırlandırılması ve tedavinin yarıda bırakılması ile kollajen birikiminin arttığı gösterilmiştir (141). Bu gözlemler, erken dönem ASSS' da steroidlerin kısa süreli kullanımı ve geç dönem fibroproliferatif fazda uzun süreli kullanımındaki yararlı sonuçlar arasındaki farklılığı açıklamaktadır. Buna ek olarak, ASSS' da sonucu değiştirmede patolojik sürecin süreside önemlidir. Meduri ve ark., geç dönem ASSS' lu 12 hastadan metilprednisolone tedavisi öncesi açık akciğer biyopsileri almıştır (142). Tedaviye cevap veren grupta, miks hücreli fibrozis, korunmuş alveolar yapı ve arteriyel subintimal fibroproliferasyona sahip akciğer histolojisini gösterilmiştir. Tedaviye cevapsız grupta, yoğun hücreli fakir fibrozis, bozulmuş alveolar yapı ve arteriyel subintimal proliferasyon vardı. Steroidler fibroproliferatif ASSS tedavisinde tıbbi bir pencere açmada, tedavi son evre fibrozis geliştiği zaman efektif olmayacaktır.

LPS 'in indüklediği akciğer hasarının tanımlanmasında, 4 saat kritik bir süre olarak kabul edilmektedir. Anne-Helene Jansson ve ark. (143) , intratrakeal LPS uygulamasını takiben 4. saatte ciddi havayolu fonksiyon kaybı ve akciğer hasarı tanımlamışlardır. Çalışmalarında, budenosid (inhale antiinflamatuvar kortikosteroid) ve NAC kullanmışlar, TNF α , IL-1, IL-6 ve MCP-1 gibi inflamatuvar medyatörlerin üretimini önlediğini görmüşlerdir (144). Endotelial bariyer disfonksiyonu, doku hasarı ve organ disfonksiyonu gelişiminde önemli ve başlangıç rol oynar (145). LPS, ödem ve organ disfonksiyonu ile sonuçlanan, endotel geçirgenliğini arttıran, sitokin, adezyon molekülü ve doku faktörlerinin salınımını indükleyen güçlü proinflamatuvar bir moleküldür. AAH/ASSS akciğerde doku ödemi, plazma eksudasyonu, damar dışına lökosit kaybı ve inflamatuvar medyatörlerin aşırı üretimi ile karakterizedir (146). Anne-Helene Jansson ve ark.' (143), 4. saatte 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$ LPS sonrası BAL sıvısında lökosit/ nötrofil akışı ve her iki akciğerde ödem tesbit etmişler, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$ ve 5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$ düşük ve yüksek doz LPS dozları ile orta ve ciddi akciğer ödemi ve inflamasyon tanımlamışlardır. LPS' e bağlı pulmoner

ödemin mekanizması net olmasada, LPS' in intra ve ekstraselüler kompartmanlar arası hidrostatik basınçları değiştirmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (147). Budenosid ile ön tedavi, düşük doz LPS sonrası akciğer hasar ve inflamasyonu tamamen önlemiş, yüksek miktarda LPS uygulanımında kısmi fakat dikkate değer etkisi olmuştur. Buna karşılık, NAC her iki grupta akciğer ödemi önlememiştir. LPS 'ler kapiller endotelial bariyerin bütünlüğündeki bozulmayı, NF- κ B aktivasyonu ve hücre apoptozisini takiben kaskat aktivasyonu ile indükler (148). Budesonid ve NAC, antiinflamatuvar ve antioksidan etkilere sahip olmasına ve NF- κ B aktivasyonunu azaltmalarına rağmen (149), NAC nötrofillerde oksidatif patlamayla ilişkili proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmada yetersizdir (150). Anne-Helene Jansson ve ark. (143), NAC ile ön tedavinin , düşük doz LPS sonrası TNF- α ve MIP-2 (makrofaj inflamatuvar protein) üretimini kısmen önlediğini, budesonid ön tedavisi ile TNF α , IL-1,IL-6 ve MCP-1 üretimini düşük ve yüksek doz LPS uygulanımını takiben tamamen önlediğini göstermişlerdir. Sonuçta çalışma, budesonid ve NAC' in tıbbi etkilerinin hastalığın ciddiyetine bağlı olduğunu göstermiştir. Benzer bulgular, LPS' a bağlı AAH 'ında deksametazon ön tedavisiyle başka çalışmalarda not edilmiştir (151).

Bu çalışmalar doğrultusunda, çalışmadaki deneysel sepsis modeli için intraperitoneal E.Coli enjeksiyonundan sonra 3 saat beklendi. 4. saat boyunca oluşturulan sepsise bağlı akciğer hasarı olduğu kabul edilerek intratrakeal çalışma ilaçları uygulandı.

Vitamin kompleksi TNF- α ve metilprednizolon uygulaması IL-6 oluşumunu azaltmaktadır. Dolayısıyla AAH erken döneminde iyi prognoz açısından uygulamaya sokulması planlanabilir. IL-10 düzeylerinde istatistiksel fark olmamakla birlikte NAC ve metilprednizolon koruyuculuğu daha önde görülmektedir.

Metilprednizolonun IL-10' nu arttırması ve IL-6 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmasından dolayı TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyleri değerlendirildiğinde NAC ve Vitamin kompleksine göre intratrakeal uygulamalarda tercih edilebileceği kanısına varılmıştır.

VI. SONUÇ

Endotoksemi veya sepsis , infeksiyona cevap olarak gelişen sistemik inflamatuvar yanıttır. Bu durum , ciddi şok ve çoklu organ yetmezliğine sebep olabilir ve yoğun bakım hastalarında önemli ölüm nedenlerinden biridir. Değişik etyolojilere bağlı akut akciğer hasarı (AAH) ve onun daha ciddi formu olan Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu (ASSS) da, yoğun bakım hastalarında sık görülen, yüksek mortaliteye sahip ciddi bir klinik problemdir. Akciğer hasarını azaltmaya yönelik denemeler, artmış inflamatuvar sitokin/ kemokin üretiminin sinyal iletim yollarının yeniden düzenlenmesi ve oksidatif hücre hasarını sınırlamaya yönelik oksidan/antioksidan dengenin onarımı üzerine odaklanmıştır.

NAC , Metilprednizolon ve Vitamin Kompleksinin her üçünde karşılaştıran bir çalışma yoktur. Biz bu çalışmamızda deneysel model olarak intraperitoneal E.Coli standart suşu enjeksiyonu yapılarak sepsis tablosu oluşturulan sıçanlarda, intratrakeal yolla uygulanan NAC, Metilprednizolon ve Vitamin Kompleksinin akut akciğer hasarı üzerine olan etkilerini araştırmayı planladık. İntratrakeal ilaç uygulamasına bağlı akciğer histolojik kesitleri ve TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyleri ölçülerek AAH tedavisine etkisi yorumlandı.

Vitamin kompleksi TNF- α ve metilprednizolon uygulaması IL-6 oluşumunu azaltmaktadır. Dolayısıyla AAH erken döneminde iyi prognoz açısından uygulamaya sokulması planlanabilir. IL-10 düzeylerinde istatistiksel fark olmamakla birlikte NAC ve metilprednizolon koruyuculuğu daha önde görülmektedir.

Metilprednizolonun IL-10' nu arttırması ve IL-6 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmasından dolayı TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeyleri değerlendirildiğinde NAC ve Vitamin kompleksine göre intratrakeal uygulamalarda tercih edilebileceği kanısına varılmıştır.

VII. ÖZET

Endotoksemi veya sepsis , infeksiyona cevap olarak gelişen sistemik inflamatuvar yanıttır. Bu durum , ciddi şok ve çoklu organ yetmezliğine sebep olabilir ve yoğun bakım hastalarında önemli ölüm nedenlerinden biridir . Değişik etyolojilere bağlı akut akciğer hasarı ve onun daha ciddi formu olan akut sıkıntılı solunum sendromunda , yoğun bakım hastalarında sık görülen, yüksek mortaliteye sahip ciddi bir klinik problemdir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, endotoksemiye bağlı akut akciğer hasarı patogenezinde, akciğerde nitrik oksit, serbest oksijen radikalleri ve sitokin üretiminin rolü olduğunu göstermiştir.

Akciğer hasarını azaltmaya yönelik denemeler, artmış inflamatuvar sitokin/kemokin üretiminin sinyal iletim yollarının yeniden düzenlenmesi ve oksidatif hücre hasarını sınırlamaya yönelik oksidan/antioksidan dengenin onarımı üzerine odaklanmıştır.

Bu çalışmada deneysel model olarak intraperitoneal E.Coli standart suşu enjeksiyonu yapılarak SİYS tablosu oluşturulan sıçanlarda, akut akciğer hasarı oluşum mekanizmaları ve intratrakeal yolla uygulanan NAC, Metilprednizolon ve Vitamin Kompleksinin akut akciğer hasarı üzerine olan etkileri araştırıldı.

Araştırma kapsamında 4 farklı deneysel sıçan grubu oluşturuldu. İntraperitoneal E.coli enjeksiyonu sonrası deneysel akciğer hasarı oluşturuldu. 4. saat sonunda intratrakeal NAC, Metilprednizolon ve Vitamin Kompleksi uygulandı. Alınan kesitlerde doku morfolojisi ve TNF- α , IL-6 ve IL-10 dağılımları incelendi.

Araştırma sonunda vitamin kompleksi ve metilprednizolonun IL-6' yı azalttığı izlendi. Dolayısıyla AAH' ı erken döneminde, iyi prognoz açısından uygulamaya sokulabileceği düşünüldü. Vitamin kompleksi grubu, NAC ve kontrol gubuyla karşılaştırıldığında IL-6' yı anlamlı şekilde azaltmıştır (P< 0.01). Metilprednizolon, NAC ve kontrol gubuna göre IL-6' yı anlamlı şekilde azaltmıştır (P< 0.001). IL-10 düzeylerinde istatistiksel fark olmamakla birlikte, NAC ve metilprednizolon

koruyuculuk açısından daha anlamlı grnmektedir. Vitamin kompleksi grubu, TNF- α ' yı diğer gruplarla karşılaştırdığında belirgin olarak azaltmıştır (P< 0.001).

IL-6' nın azalması ve IL-10 düzeylerindeki artış değerlendirildiğinde, metilprednizolonun NAC ve vitamin kompleksine göre intratrakeal uygulamalarda tercih edilebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcük: Akut akciğer hasarı, sepsis, NAC, metilprednizolon, vitamin kompleksi, TNF- α

VIII. SUMMARY

The Investigation Of The lung Effects Of N-Acetylsistein, Methylprednisolone And Vitamine Complex Administration On Experimental Acute Lung Injury In Rats

Endotoxaemia, or sepsis, is a heterogeneous class of syndromes caused by a systemic inflammatory response to infection. This condition may lead to severe shock and multiple organ failure and is one of the leading causes of death in critically ill patients. Acute lung injury (ALI) or acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a serious clinical problem with high mortality and frequency. At last advertisements, it was shown that has been the role of NO, reactive oxygen species and cytokine on the pathogenesis of endotoxin-induced acute lung injury.

Attempts to attenuate lung injury have focused on modulation of the signaling pathways leading to increased inflammatory cytokine/chemokine production, and on restoration of the oxidant/antioxidant balance to limit the degree of oxidative cell damage.

In the present study, intraperitoneally standart E.Coli injected rats were examined for the formation mechanisms of ALI and the effects of intratracheal administration of NAC, methylprednisolone and vitamine complex on ALI. We formed four experimental rat groups on this study. After intraperitoneal injection of E.Coli, ALI has formed. At the end of the four hour, intratracheal NAC, methylprednisolone and vitamine complex have been applied. Tissue morphology and the distribution of TNF- α , IL-6 and IL-10 have been examined in the lung sections.

At the end of the study, it's seen that vitamine complex and methylprednisolone reduced IL-6. Thus, both applications were considered to be when used with good prognose in the early stage of ALI.

When vitamine complex group compared with NAC group and control group, it reduced IL-6 levels significantly ($P < 0.01$). Methylprednisolone reduced IL-6 levels when compared with NAC group and control group. Although there has not been any istatically important difference on IL-10 levels, the application of NAC methylprednisolone seems to be more significant for providing protection. Vitamine complex group reduced TNF- α levels significantly when compared with other groups ($P < 0.001$). As methylprednisolone reduces IL-6 and increases IL-10 levels, when compared with NAC group and control group, it is considered that methylprednisolone can be preferred in the intratracheal administrations.

Keywords: Acute lung injury, sepsis, NAC, metylprednisolon, vitamine complex, TNF- α

XI. KAYNAKLAR

1. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 207–14.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 2001; 29: 1303–10.
3. Chen HI, Kao SJ, Wang D, Lee RP, Su CF. Acute respiratory distress syndrome. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10: 588–92.
4. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342:1301–1308.
5. Ogilvie A C, Groeneveld A B J, Straub J P et al. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med* 1991; 17: 40d44.
6. Goode H F, Webster N R. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21: 1770d1776.
7. Goode H F, Cowley H C, Walker B E et al. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995; 23: 646d651.
8. Aruoma O I, Halliwell B, Hoey B M et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Rad Biol Med* 1989; 6: 593d597.
9. Suttorp N, KaK stle S, Neuhof H. Glutathion redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hypoxia. *Lung* 1991; 196: 203d214.
10. Barnes, P. J.. 1996. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: S21-S27 .
11. Ray, A., and K. E. Prefontaine. 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 752-756 .

12. Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, K. K. Park, A. C. Cato, S. Gebel, H. Ponta, and P. Herrlich. 1990. Anti-tumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62: 1189-1204.
13. Yang-Yen, H. F., J. C. Chambard, Y. L. Sun, T. Smeal, T. J. Schmidt, J. Drouin, and M. Karin. 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62: 1205-1215.
14. Hines DW, Bone RC. Septic Shock. In : Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). *Infectious Diseases. Second Edition.* W.B. Saunders Co.,Philadelphia, 1992; 544-48.
15. Doğanay M. Sepsis. Willke A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları Kitabı'nda.* İstanbul : Nobel Tıp Kitabevi, 1996; 473-85.
16. Uzun Ö. Sepsiste Empirik Tedavi Yaklaşımı. Akalın HE, Kanra G (editörler). *Empirik Antibiyotik Tedavisi Kitabı'nda.* Ankara : Güneş Kitabevi, 1994; 175-86.
17. Uzun Ö, Akalın HE, Hayran M, Ünal S. Factors influencing prognosis in gram-negative bacteraemia : Evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 866-73.
18. Young LS. Sepsis Syndrome. In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth Edition.* Churchill Livingstone Penn, 2000; 806-19.
19. Septic Shock. In: Salyers AA, Whitt DD (eds). *Bacterial Pathogenesis : A Molecular Approach.* ASM Press, Washington DC, 1994; 56-60.
20. Akpınar S, Tekeli E. Septik Şok : Klinik Yaklaşım-Patogenez-Terapötik Yaklaşım. Şahinoğlu AH (ed). *Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri Kitabı'nda.* Ankara : Türkiye Klinikleri Tıp Kitabevi, 1992; 567-74.
21. Luce JM. Pathogenesis and management of septic shock. *Chest*, 1987; 91: 883.
22. Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, et al. Endotoxin-induced organ injury. *Crit Care Med*, 1993; 21: S19.
23. *Arthur P Wheeler, Gordon R Bernard; Lancet* 2007; 369: 1553–65
24. Bernard, G.R.,Artigas, A., Brigham, K.L.,Carlet, J.,Falke, K.,Hudson,L., Lamy, M.,Legal,J.R., Morris, A.,Sprag, R.,1994. The American–European consensus conference on ARDS: definitions,mechanismsrelevant outcomes,clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*,149 (3 Pt 1):818-824

25. Ware, L.B., Matthay, M.A., 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 342(18):1334-1349.
26. Milberg, J.A., Davis, D.R., Steinberg, K.P., Hudson, L.D., 1995. Improved survival of patients acute respiratory distress syndrome (ARDS). *JAMA* , 273(4):306-309
27. Ware, L. B., and M. A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342:1334–1349.
28. Lesur, O., et al. 1999. Acute respiratory distress syndrome: 30 years later. *Can. Respir. J.* 6:71–86.
29. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342:1301–1308.
30. Lee, W. L., and G. P. Downey. 2001. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr. Opin. Crit. Care* 7:1–7.
31. Khadaroo, R. G., and J. C. Marshall. 2002. ARDS and the multiple organ dysfunction syndrome. Common mechanisms of a common systemic process. *Crit. Care Clin.* 18:127–141.
32. Schraufstatter, I. U., S. D. Revak, and C. G. Cochrane. 1984. Proteases and oxidants in experimental pulmonary inflammatory injury. *J. Clin. Invest.* 73:1175–1184.
33. Bunnell, E., and E. R. Pacht. 1993. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:1174–1178.
34. Rahman, I., and W. MacNee. 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* 16:534–554.
35. Terada, L. S., et al. 1992. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 263:L394–L401.
36. Ischiropoulos, H. 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 356:1–11.
37. Matthay, M. A., et al. 1999. Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 27:2028–2030.

38. Carpenter, C. T., P. V. Price, and B. W. Christman. 1998. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 114:1653–1659.
39. Quinlan, G. J., et al. 1997. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:479–484.
40. Baldwin, S. R., et al. 1986. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1:11–14.
41. Kietzmann, D., et al. 1993. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* 19:78–81.
42. Gole, M. D., et al. 2000. Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278:L961–L967.
43. Sittipunt, C., et al. 2001. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:503–510.
44. Pacht, E. R., et al. 1991. Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 100:1397–1403.
45. Lenz, A. G., et al. 1999. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur. Respir. J.* 13:169–174.
46. Brigham, K. L. 1986. Role of free radicals in lung injury. *Chest* 89:859–863.
47. Rinaldo, J. E. 1986. Mediation of ARDS by leukocytes: clinical evidence and implications for therapy. *Chest* 89:590–593.
48. Babior, B. M., J. D. Lambeth, and W. Nauseef. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 397:342–344.
49. Filep, J. G., et al. 1998. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* 161:5656–5662.
50. Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2:907–916.

51. Terada, L. S. 2002. Oxidative stress and endothelial activation. *Crit. Care Med.* 30:S186–S891.
52. Van Heerebeek, L., et al. 2002. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J. Clin. Pathol.* 55:561–568.
53. Banfi, B., et al.. 2002. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J. Biol. Chem.*
54. Rey, F. E., et al. 2002. Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation* 106:2497–2502.
55. Sorescu, D., et al. 2002. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105:1429–1435.
56. Kirkinezos, I. G., and C. T. Moraes. 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12:449–457.
57. Nieto, N., S. L. Friedman, and A. I. Cederbaum. 2002. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 277:9853–9864.
58. Meneshian, A., and G. B. Bulkley. 2002. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 9:161–175.
59. Li, C., and R. M. Jackson. 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282:C227–C241.
60. Nachbar, F., and H. C. Korting. 1995. The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J. Mol. Med.* 73:7–17.
61. Feldhaus, M. J., et al. 2002. Ceramide generation in situ alters leukocyte cytoskeletal organization and beta 2-integrin function and causes complete degranulation. *J. Biol. Chem.* 277:4285–4293.
62. Ware, L.B., Matthay, M.A., 2000.The acute respiratory distress syndrome. *N.E ngl. J. Med.*, 342(18):1334-1349.
63. Tomashefsk, J.F.,1990. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Chest. Med.*, 11(4):593-619sh, c.j.,Mullen, p.g., Cook, d.j.,Fisher, B.J., Blocher, C.R., Leeper- Woodford, S.K.,Sugerman, H.J.,Fowler, A.A.,3rd ,1993.

- 64.** Windsor, A.C., Walsh C.J., Mullen, P.G., Cook, D.J., Fisher, B.J., Blocher, C.R., Leeper-Woodford, S.K., Sugerman, H.J., Fowler, A.A., 3rd, 1993.
- 65.** Ogilvie A C, Groeneveld A B J, Straub J P et al. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med* 1991; 17
- 66.** Goode H F, Webster N R. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21
- 67.** Goode H F, Cowley H C, Walker B E et al. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995; 23
- 68.** Zhang, H.; Slutsky, A. S.; Vincent, J. L. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intens. Care Med.* 26:474– 476; 2000.
- 69.** Lang, J. D.; McArdle, P. J.; O'Reilly, P. J.; Matalon, S. Oxidant/antioxidant balance in acute lung injury. *Chest* 122:314S– 320S; 2002.
- 70.** Sznajder, J. I.; Fraiman, A.; Hall, J. B.; Sanders, W.; Schmidt, G.; Crawford, G.; Nahum, A.; Factor, P.; Wood, L. D. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 96:606– 612; 1989.
- 71.** Baldwin, S. R.; Simon, R. H.; Grum, C. M.; Ketai, L. H.; Boxer, L. A.; Devall, L. J. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1:11 – 14; 1986.
- 72.** Richard, C.; Lemonnier, F.; Thibault, M.; Couturier, M.; Auzepy, P. Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 18:4 – 9; 1990.
- 73.** Metnitz, P. G.; Bartens, C.; Fischer, M.; Fridrich, P.; Steltzer, H.; Druml, W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intens. Care Med.* 25:180– 518; 1999.
- 74.** Quinlan, G. J.; Lamb, N. J.; Evans, T. W.; Gutteridge, J. M. Plasma fatty acid changes and increased lipid peroxidation in patients with adult respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 24:241– 246; 1996.
- 75.** Kumar, K. V.; Rao, S. M.; Gayani, R.; Mohan, I. K.; Naidu, M. U. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clin. Chim. Acta* 298:111– 120; 2000.

- 76.** Bowler, R. P.; Velsor, L. W.; Duda, B.; Chan, E. D.; Abraham, E.; Ware, L. B.; Matthay, M. A.; Day, B. J. Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Crit. Care Med.* 31:2309– 2315; 2003.
- 77.** Gutteridge, J. M. C.; Quinlan, G. J.; Yamamoto, Y. Are fatty acid patterns characteristic of essential fatty acid deficiency indicative of oxidative stress? *Free Radic. Res.* 28:109–114; 1998.
- 78.** Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ye, Y. Z.; Kelly, D. R.; Beckman, J. S. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1250– 1254; 1995
- 79.** Anggard, E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 343:1199– 1206; 1994.
- 80.** Lee, W. L.; Downey, G. P. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr. Opin. Crit. Care.* 7:1 –7; 2001.
- 81.** Gadek, J. E.; Pacht, E. R. The interdependence of lung antioxidants and antiprotease defense in ARDS. *Chest* 110:273S– 277S; 1996.
- 82.** Flannagan R J, Meredith T J. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am J Med* 1990; 264: S131dS139.
- 83.** MoldeH us P, Cotgreave I A. N-Acetylcysteine. *Meth Enzymol* 1994; 234: 482d492.
- 84.** Aruoma O I, Halliwell B, Hoey B M et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Rad Biol Med* 1989; 6: 593d597.
- 85.** Suttorp N, KaK stle S, Neuhof H. Glutathion redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hypoxia. *Lung* 1991; 196: 203d214.
- 86.** Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E et al. Protective effect of N-acetylcysteine on multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Crit Care Med* 1999; 27: 1524d1532.
- 87.** Koch T, Heller S, Heia(ler S et al. Effects of N-acetylcysteine on bacterial clearance. *European J of Clin Invest* 1996; 26: 884d892.

- 88.** Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo controlled study. *Crit Care Med* 1999; 27: 1100d1104.
- 89.** Barnes, P. J., 1996. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: S21-S27.
- 90.** Ray, A., and K. E. Prefontaine. 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 752-756 .
- 91.** Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, K. K. Park, A. C. Cato, S. Gebel, H. Ponta, and P. Herrlich. 1990. Anti-tumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62: 1189-1204 .
- 92.** Yang-Yen, H. F., J. C. Chambard, Y. L. Sun, T. Smeal, T. J. Schmidt, J. Drouin, and M. Karin. 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62: 1205-1215 .
- 93.** Paliogianni, F., A. Raptis, S. S. Ahuja, S. M. Najjar, and D. T. Boumpas. 1993. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J. Clin. Invest.* 91: 1481-1489 .
- 94.** Shaw, G., and R. Kamen. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659-667 .
- 95.** Kern, J. A., R. J. Lamb, J. C. Reed, R. P. Daniele, and P. C. Nowell. 1988. Dexamethasone inhibition of interleukin-1 β production by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 81: 237-244 .
- 96.** Cronstein, B. N., S. C. Kimmel, R. I. Levin, F. Martiniuk, and G. Weissmann. 1992. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9991-9995
- 97.** Van de Stolpe, A., E. Caldenhoven, J. A. M. Raaijmakers, P. T. van der Saag, and L. Koenderman. 1993. Glucocorticoid-mediated repression of intercellular

adhesion molecule-1 expression in human monocytes and bronchial epithelial cell lines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8: 340-347 .

98. Van de Stolpe, A., E. Caldenhoven, B. G. Stade, L. Koenderman, J. A. Raaijmakers, J. P. Johnson, and P. T. van der Saag. 1994. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone: functional analysis of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 269: 6185-6192

99. Abbinante-Nissen, J. M., L. G. Simpson, and G. D. Leikauf. 1995. Corticosteroids increase secretory leukocyte protease inhibitor transcript levels in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 12: L601-L606 . 32. Colotta, F., F. Re, M. Muzio, R. Bertini, N. Polentarutti, M. Sironi, J. G. Giri, S. K. Dower, J. E. Sims, and A. Mantovani. 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261: 472-475

100. Re, F., M. Muzio, M. De Rossi, N. Polentarutti, J. G. Giri, A. Mantovani, and F. Colotta. 1994. The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J. Exp. Med.* 179: 739-743

101. Schleimer, R. P.. 1990. Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: S59-S69

102. Lane, S. J., J. R. W. Wilkinson, G. M. Cochrane, T. H. Lee, and J. P. Arm. 1993. Differential *in vitro* regulation by glucocorticoids on monocyte-derived cytokine generation in glucocorticoid-resistant bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 690-696

103. Van Otteren, G. M., T. J. Standiford, S. L. Kunkel, J. M. Danforth, M. D. Burdick, L. V. Albruzzo, and R. M. Strieter. 1994. Expression and regulation of macrophage inflammatory protein-1 α by murine alveolar and peritoneal macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10: 8-15

104. Poon, M., J. Megyesi, R. S. Green, H. Zhang, B. J. Rollins, R. Safirstein, and M. B. Taubman. 1991. *In vivo* and *in vitro* inhibition of JE gene expression by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 266: 22375-22379

- 105.** Lamas, A. M., G. V. Marcotte, and R. P. Schleimer. 1989. Human endothelial cells prolong eosinophil survival: regulation by cytokines and glucocorticosteroids. *J. Immunol.* 142: 3978-3984
- 106.** Laitinen, L. A., A. Laitinen, and T. Haahtela. 1992. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and of a β_2 -agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 32-42
- 107.** Wilckens, T., and R. De Rijk. 1997. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today* 18: 418-424
- 108.** Downey GP, Granton JT. Mechanisms of acute lung injury. *Curr Opin Pulm Med* 1997;3:234-41.
- 109.** Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Sur Clin North Am* 1995;75:257-77.
- 110.** Jie Fan, MD, Pang N. Shek. Liposomal antioxidants provide prolonged protection against acute respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000;128:332-8.
- 111.** Staal FJ, Anderson MT, Staal GE, Herzenberg LA, Gitler C, Herzenberg LA. Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:3619-22.
- 112.** Burton GW, Ingold KV. Vitamin E as an in vivo and in vitro antioxidant. *Ann N Y Acad Sci* 1989;570:7-22.
- 113.** Suntres ZE, Shek PN. In: Shek PN, editors. Liposomes in biomedical applications. London, England: Harwood Academic Publishers; 1995. p. 179-98.
- 114.** Rocksén, D., et al. 2003. Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28:199–207.
- 115.** Chow, C. K. 1991. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 11:215–232.
- 116.** Traber, M. G., and L. Packer. 1995. Vitamin E: beyond antioxidant function. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1501S–1509S.
- 117.** Minko, T., A. Stefanov, and V. Pozharov. 2002. Selected contribution: Lung hypoxia: antioxidant and antiapoptotic effects of liposomal alpha-tocopherol. *J. Appl. Physiol.* 93:15
- 118.** Chung-Wai Chow, Maria Teresa Herrera Abreu, Tomoko

- Suzuki and Gregory P. Downey. Oxidative Stress and Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 29, pp. 427-431, 2003
- 119.** Bernard, G. R., et al. 1984. Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J. Clin. Invest.* 73:1772–1784.
- 120.** Suter, P. M., et al. 1994. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest* 105:190–194.
- 121.** Shang Jyh Jao, David Wang, Hen I Lin and Hsing I Chen. *N-Acetylcystein abrogates acute lung injury induced by endotoxin. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2006) 33, 33–40
- 122.** Lee RP, Wang D, Lin NT, Chen HI. Physiological and chemical indicators for early and late stages of sepsis in conscious rats. *J. Biomed. Sci.* 2002; 9: 613–21.
- 123.** Lee CC, Lin NT, Hsu YH, Chen HI. Inducible nitric oxide synthase inhibition potentiates multiple organ dysfunction induced by endotoxin in conscious rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2005; 45: 396–403.
- 124.** Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta *in vivo*. *FEBS Lett.* 1995; 363: 235–8.
- 125.** Camussi G, Ronco C, Montrucchio G, Piccoli G. Role of soluble mediators in sepsis and renal failure. *Kidney Int. Suppl.* 1998; 66: S38–42.
- 126.** Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis: An overview. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1999; 43: 275–88.
- 127.** Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med.* 2000; 26: 474–6.
- 128.** Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals: For worse and for better. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 23–5.
- 129.** Taniguchi T, Kanakura H, Yamamoto K. Effects of posttreatment with propofol on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. *Crit. Care Med.* 2002; 30: 904–7.
- 130.** Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular

adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 2003; 31: 2574–8.

131. Rota C, Bergamini S, Daneri F, Tomasi A, Virgili F, Iannone A. *N*-Acetylcysteine negatively modulates nitric oxide production in endotoxin-treated rats through inhibition of NF-kappaB activation. *Antioxid. Redox Signal* 2002; 4: 221–6.

132. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60: 6–20.

133. Agouridakis P, Kyriakou D, Alexandrakis MG *et al.* The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. *Respir. Res.* 2002; 3: 25–33.

134. Ashbaugh, D. G., and R. V. Maier. 1985. Idiopathic pulmonary fibrosis in adult respiratory distress syndrome. *Arch. Surg.* 120: 530-535

135. Meduri, G. U.. 1996. The role of the host defense response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiologic correlations and response to glucocorticoid treatment. *Eur. Respir. J.* 9: 2650-2670

136. Almawi, W. Y., M. L. Lipman, A. C. Stevens, B. Zanker, E. T. Hadro, and T. B. Strom. 1991. Abrogation of glucocorticosteroid-mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL-1, IL-6, and IFN- γ . *J. Immunol.* 146: 3523-3527.

137. Kam, J. C., S. J. Szeffler, W. Surs, E. R. Sher, and D. Y. M. Leung. 1993. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J. Immunol.* 153: 3460-3466 .

138. Meduri, G. U., S. Headley, E. Tolley, M. Shelby, F. Stentz, and A. Postlethwaite. 1995. Plasma and BAL cytokine response to corticosteroid rescue treatment in late ARDS. *Chest* 108: 1315-1325

139. Hesterberg, T. W., and J. A. Last. 1981. Ozone-induced acute pulmonary fibrosis in rats—prevention of increased rates of collagen synthesis by methylprednisolone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123: 47-52

140. Hakkinen, P. J., R. L. Schmoyer, and H. P. Witschi. 1983. Potentiation of butylated-hydroxytoluene-induced acute lung damage by oxygen: effects of prednisolone and indomethacin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: 648-651

- 141.** Rylander, R., Beijer, L., 1987. Inhalation of endotoxin stimulates alveolar macrophage production of platelet-activating factor. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 83–86.
- 142.** Meduri, G. U., A. J. Chinn, K. V. Leeper, R. G. Wunderink, E. Tolley, H. T. Winer-Muram, V. Khare, M. El, and Torky. 1994. Corticosteroid rescue treatment of progressive fibroproliferation in late ARDS: patterns of response and predictors of outcome
- 143.** Anne-Helene Jansson, Christina Eriksson, Xiangdong Wang. Effects of budesonide and N-acetylcysteine on acute lung hyperinflation, inflammation and injury in rats. *Vascular Pharmacology* 43 (2005) 101 – 111
- 144.** Wang, X.D., Andersson, R., 1995. The role of endothelial cells in the systemic inflammatory response syndrome and multiple system organ failure. *Eur. J. Surg.* 161, 703–713.
- 145.** Zhao, X., Andersson, R., Wang, X., Dib, M., Wang, X.D., 2002. Acute pancreatitis-associated lung injury: pathophysiological mechanisms and potential future therapies. *Scand. J. Gastroenterol.* 37, 1351–1358.
- 146.** Sue, R.D., Matthay, M.A., Ware, L.B., 2004. Hydrostatic mechanisms may contribute to the pathogenesis of human re-expansion pulmonary edema. *Intensive Care Med.* 30, 1921– 1926.
- 147.** Bannerman, D.D., Goldblum, S.E., 2003. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am. J. Physiol., Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L899– L914.
- 148.** Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M., 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270, 286–290.
- 149.** Blackwell, T.S., Blackwell, T.R., Holden, E.P., Christman, B.W., Christman, J.W., 1996. In vivo antioxidant treatment suppresses Nuclear Factor- κ B activation and neutrophilic lung inflammation. *J. Immunol.* 157, 1630– 1637.
- 150.** Rocksén, D., Lilliehoök, B., Larsson, R., Johansson, T., Bucht, A., 2000. Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 122, 249– 256.

151. O'Leary, E.C., Marder, P., Zuckerman, S.H., 1996. Glucocorticoid effects in an endotoxin-induced rat pulmonary inflammation model: differential effects on neutrophil influx, integrin expression, and inflammatory mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15, 97– 106.