

T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI


DENEYSEL SEPSİSTE ALFA TOKOFEROLÜN
ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ,
KARACİĞER DEĞİŞİKLİKLERİ ve
SAĞKALIM ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet TULPAR

TEZ DANIŞMANI: Yrd. Doç. Dr. F. Cahit İÇLİ

SİVAS - 1994



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 5.1.1984 tarih ve 84/1 no'lu kararıyla kabul edilen tez yazma yönergesine ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulunun 15.4.1993 tarih ve 93/115 sayılı kararına uygun olarak hazırlanmıştır.

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İşbu çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Bilim Dalı'nda
TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.

.... / / 1994

DEKAN

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
A- SEPSİS VE SEPTİK ŞOK	3
B- ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ	9
C- SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	10
GEREÇ ve YÖNTEM	14
BULGULAR	17
TARTIŞMA	21
SONUÇ	25
ÖZET	26
KAYNAKLAR	27

GİRİŞ

Şiddetli intraabdominal enfeksiyonlar, yanık ve travma nedeniyle cerrahi yoğun bakım ünitelerine yatırılan hastalarda gram negatif sepsis sık görülen bir fenomendir. Sepsise bağlı akut respiratuvar distress sendromu (ARDS) ve multiorgan yetmezliği ise önemli derecede morbidite ve mortalite nedenleridir (1-7). Cerrahi tekniklerdeki gelişmeler, antimikrobik ajanlar, septik odağın non invaziv tanısında ve yoğun bakım ünitelerindeki gelişmeler sepsisli hastaların tedavisine ve sağkalımına oldukça fazla katkı sağlamışlardır. Ancak, gram negatif bakteriyemilerde mortalite oranı %20-30 iken septik şok sonucu ortaya çıkan multiorgan yetmezliğinde bu oran %50-80 olmaktadır (1,2,4-6,8-13).

Sepsiste oluşan hemodinamik değişkenlerin bir çoğunun mekanizması ortaya çıkarılmışsa da bu değişikliklerdeki etiyolojik faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır (1). Septik şokun önemli parçası olan doku iskemisi ve inflamasyon, serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumunda etkili rol oynarlar (9,14-18). Akut iltihabi reaksiyonlarda nötrofillerin, doku iskemisinde ksantin oksidazın oluşturduğu SOR'leri hücre membranlarında lipid peroksidasyonu yaparak membran bütünlüğünü bozar ve endotel hücrelerine etki ederek mikrovasküler permeabilityi değiştirebilirler (2,14,17,19-21).

Çapı 7 mikron olan eritrositler kapillerlerden geçerken 4 mikrona kadar şekil değiştirebilme yeteneğine sahiptirler. Bu mikrosirkülasyonun sürekliliği için gereklidir. Temel fiziksel özellikleri ve oksijen dağılımındaki rolü eritrositleri sepsiste önemli bir hedef yapmaktadır. Sepsiste oluşan SOR'leri eritrosit deformabilitesi değişikliklerinde etyolojik rol oynarlar (1,22-24).

Sepsiste antibiyotik tedavisinin yetersiz kalması son yıllarda

araştırcıların ilgisini SOR'leri üzerine yoğunlaştırmış ve bir antioksidan olan alfa tokoferol kullanılan bir çok çalışmada sağkalım oranlarında önemli artış elde edilmiştir (1,3,9,12,17,21,25,26).

Bu çalışmada ratlarda oluşturulan deneysel E.Coli sepsisinin erken döneminde eritrosit deformabilitesi, karaciğerdeki fonksiyonel ve hücresel değişiklikler değerlendirildi. Alfa tokoferolün eritrosit deformabilitesi, karaciğer değişiklikleri ve sağkalım üzerine etkileri araştırıldı.



GENEL BİLGİLER

A- SEPSİS VE SEPTİK ŞOK

1. TANIM: Sepsis; ateş, lökosit sayısı, kalp ve solunum hızı kriter olmak üzere enfeksiyona karşı sistemik inflamatuvar cevap olarak tanımlanır. Şiddetli sepsiste ek olarak hipoperfüzyon ve hipotansiyon mevcuttur.

Septik şok ise; sıvı tedavisine cevap vermeyen ve kardiyovasküler destek için farmakolojik madde kullanımı gerektiren şiddetli sepsis halidir (10,11).

2. ETİOLOJİ: En sık izole edilen patojenler gram negatif aerob bakterilerdir. Zorunlu gram negatif anaeroblar ve gram pozitif aerob bakteriler ikinci sırada yer alırlar. Bununla birlikte virüsler, parazitler, mantarlar ve riketsiyalar da sepsis ve septik şoka yol açabilirler (10,11,27,28).

Gram negatif bakteriyel sepsisin en sık nedenleri sırasıyla genitouriner sistem enfeksiyonları, solunum yolları enfeksiyonları ve intraabdominal enfeksiyonlardır. Etken mikroorganizmalar sıklıkla gastrointestinal sistemde bulunan bakterilerdir. Bunların başında E.coli gelir. Bacteroides türleri en sık rastlanılan anaerob bakterilerdir. Çoğu kez tek bakteri etken iken, özellikle intraabdominal enfeksiyonların neden olduğu sepsis polimikrobiyal olabilir (26,28).

3. PATOFİZYOLOJİ: Gram negatif bakteriyel sepsis ve septik şoktaki sistemik bulgular endojen mediatörlerin salınımına bağlıdır.

Gram negatif bakterilerin dış mebranında bulunan lipopolisakkarit yapısındaki endotoksin birçok biyolojik reaksiyonun başlamasını sağ-

lar. Mikrosirkülasyondaki bozulmanın yanısıra pıhtılaşma sisteminin ve polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) aktivasyonu ve diğer mediatör sistemler aracılığı ile ortaya çıkan bu reaksiyonlarda iki önemli mekanizmanın rol aldığı kabul edilmektedir (Şekil 1) (10, 12,26, 29).

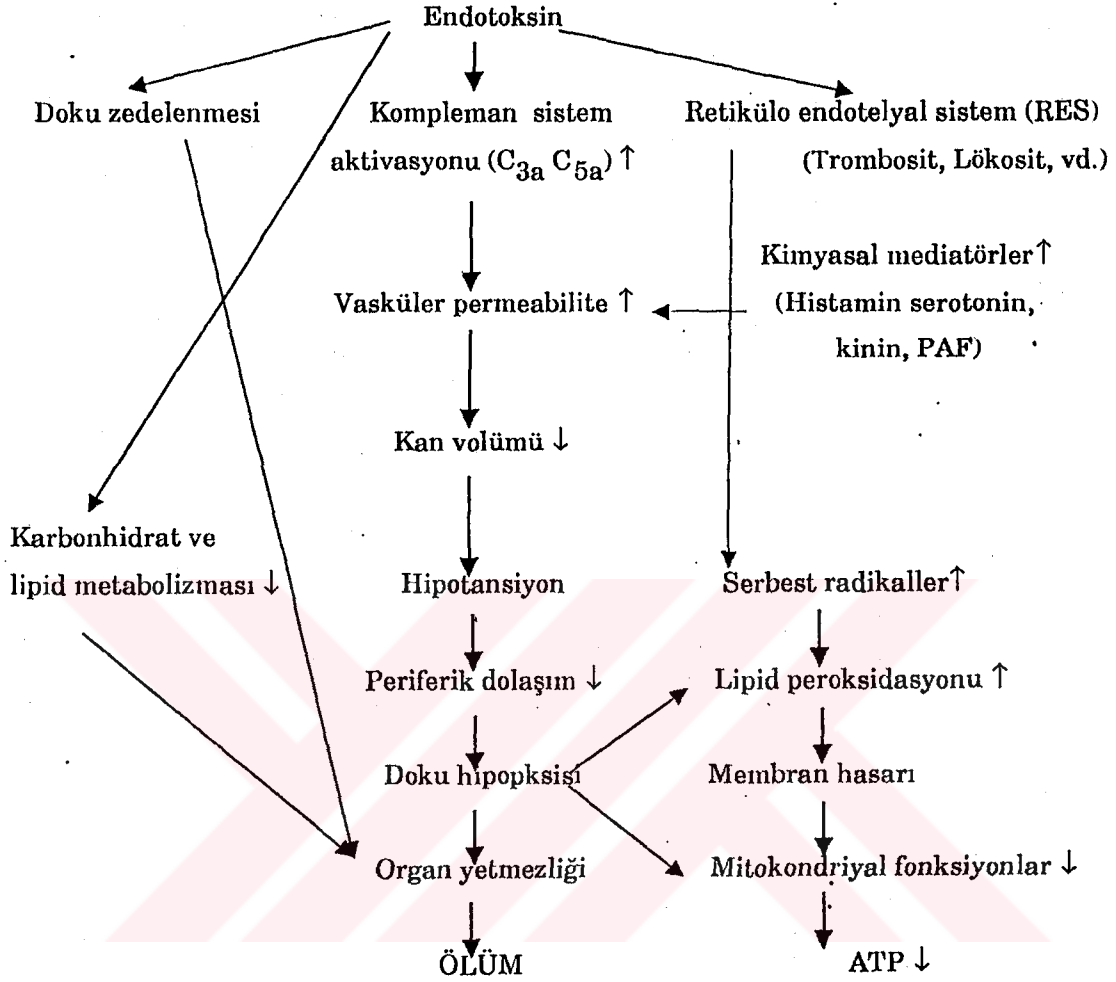
Bu mekanizmalardan birincisinde endotoksin etkisiyle kompleman sistemi (özellikle C_{5a}) aktive edilir. Kompleman sistemin C_{5a} komponenti direkt ya da indirek yolla PMNL'leri, ardından makrofajları ve monositleri uyarır. Retiküloendotelyal sistemde (RES) mikrotrombüsler oluşur, daha sonra kapiller kan akımı bozulur. Geç dönemde permeabilite artması, hipovolemi ve periferik dolaşımın bozulması doku hipoksisi ve organ yetmezliğine yol açar. Doku hipoksisi SOR'nin artmasına ve mitokondriyal fonksiyonların azalmasına yol açar (10, 12,17,21,23,26).

Endotoksinin ikinci etki mekanizması RES üzerinden gerçekleşir. PMNL'lerin aktivasyonu ile arasıdonik asit derivelerinin (prostaglandinler), lizozomal enzimlerin ve oluşan serbest radikallerin salınımı artar. Ayrıca PMNL'lerin membranında bulunan NADP-oksidadaz (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidadaz) serbest radikal oluşumunu artırır. SOR'leri hücre membranında lipid peroksidasyonunu arttırarak membran hasarına, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve dolayısıyla ATP düzeyinde azalmaya yol açar . Enerji düzeyindeki azalma septik şokta organ yetmezliğinin diğer bir nedenidir (1,4,12,21,26).

Endotoksin stimülasyonu ile tüm RES'deki makrofajlardan Tümör Nekroz Faktör (TNF, Kaşektin) salınımı artar. Son yapılan deneysel çalışmalar TNF ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinlerin de septik şokun primer mediatörleri olduğunu göstermiştir (8,10,26,29).

Septik şokta prostaglandin salınımı sadece PMNL ve trombositlerde değil monositler, makrofajlar ve endotel hücreleri gibi RES hücrele-

rinin tümünde artar (26).



Şekil 1: Endotoksin Şokunun Mekanizması

İmmünoinflamatuvar sistemin aktivasyonu ile salınan kininler, histamin, serotonin ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi kimyasal mediatörler periferik vazodilatasyon, hipotansiyon ve perfüzyon azalmasını şiddetlendirir (10-12).

Endotoksinin diğer biyolojik etkileri arasında karbonhidrat ve lipid metabolizmasının inhibisyonu ile direkt hücre hasarı da yer almaktadır (4,12).

Sepsiste en önemli hasar mikrovasküler düzeyde görülür. Mikro-sirkülatuvar endotelin yaklaşık 600-800 m² büyüklüğünde olması dolaşımdaki mediatörler için önemli bir hedef organ teşkil etmektedir. Mikro-sirkülasyondaki hasar başlangıçta hem inflamatuvar sistemin aktivasyonu ile hem de enzim sistemlerinin etkisiyle oluşurken daha sonraki dönemde doku hipoksisi ve perfüzyon azalması endotel hasarına katkıda bulunur (11).

Erken sepsis döneminde kardiyak out-put artışı ile birlikte geçici hiperdinamik sirkülasyon olur (6). Kompleman aktivasyonu, trombosit ve lökosit agregasyonu, hiperkoagülasyon, vazoaaktif maddelerin salınımı ve kardiyak out-put değişiklikleri doku perfüzyonunun azalması ve akım dağılımının bozulması sonucu organ yetmezliğine yol açar (22).

4. KLİNİK VE LABORATUVAR BULGULARI: Ateş, takipne, taşikardi, serebral hipoperfüzyon ve metabolik değişikliklere bağlı mental değişiklikler ve oligüri önemli klinik bulgulardır. Şiddetli sepsis hastalarının bir kısmında ise hipotermi görülebilir.

Sepsisin şiddetine bağlı olarak lökositoz veya lökopeni ve trombositopeni vardır. Respiratuvar alkaloz, metabolik asidoz ve başlangıç döneminde orta derecede hipoksi görülebilir. Hiperglisemi sıklıkla mevcuttur ve insülin verilmesini gerektirir. Karaciğer yetmezliği gelişen terminal dönemdeki hastalarda hipoglisemi görülebilir. İntrahepatik kolestaza bağlı olarak minimal transaminaz ve alkalin fosfataz yükselmesi ile hiperbilirubinemi sıklıkla mevcuttur (10,23,30).

5. PROGNOZ: Septik şokta mortalite multiorgan yetmezliğine bağlıdır. Sepsisin başlangıcından en erken 12 saat, en geç 7-10 gün sonra akciğer, gastrointestinal sistem, böbrek ve karaciğerde yetmezlik oluşur. Sepsisin süresi ve şiddeti multiorgan yetmezliği görülme oranını artırır.

Septik şokta görülen organ yetmezliğinin birçok nedeni vardır. Hipoperfüzyon önemli bir faktördür, ancak klinik olarak tesbit edilemez. Diğer önemli bir faktör ise sistemik oksijen yetersizliğine bağlıdoku hipoksisidir. Ayrıca nozokomiyal enfeksiyonlar, spesifik terapötik veya farmakolojik müdahalelere bağlı iatrojenik komplikasyonlar da organ fonksiyonlarında önemli derecede bozukluklar yapabilirler.

İntestinal mukoza bariyer değişiklikleri de organ yetmezliğinde rol oynar. Hipoperfüzyon, enfeksiyon ve enteral beslenmenin olmaması barsak mukoza bariyerini bozar. Sistemik dolaşıma endotoksin ve bakterilerin girişi kolaylaşır ve ardından mediatör hücreler aktive olur (10,11,26,29).

6. TEDAVİ: Septik şok halen tanısal açıdan olduğu kadar tedavi yönünden de bilinmeyenleri çok olan bir olaydır. Sepsise bağlı organ yetmezliği gelişmeden önce erken ve etkili tedavi morbidite ve mortaliteyi azaltır (10,31).

Septik şoklu hastaların tedavisinde üç önemli basamak vardır.

a- Ressussitasyon:

Efektif (etkili) venöz dönüşün sağlanması için sıvı replasmanı gereklidir. Kolloid solüsyonlarının pulmoner ödemi azalttığı görüşü tartışmalıdır.

Sıvı replasmanına rağmen hipotansiyon ve miyokardiyal depresyon devam ediyorsa sıklıkla dobutamin, β_1 ve β_2 adrenerjikler gibi inotropik ve periferik vazodilatatör etkili vazoaktif ilaçlar kullanılır. Buna rağmen hipotansiyon düzeltilemiyorsa noradrenalin verilir.

Nadiren hipotansiyon olmayan, sadece miyokardiyal depresyonu

olan hastalarda PGE₁ ve PG I₂ gibi sitoprotektif vazodilatatör ajanlar verilir.

Septik şoklu hastaların %30-70'inde ARDS geliştiğinden solunum desteği sağlanmalıdır.

Septik şokta kortikosteroidlerin kullanılması tartışmalıdır (10,28).

b- Antibiyotik Tedavisi:

Antibiyotik seçiminde en uygun yol kültür ve antibiyograma uygun antibiyotiklerin kullanılmasıdır. Hastaların %50'sinde kan kültürü negatif olabilir. Bu nedenle muhtemel enfeksiyon odaklarından kültür alınmalıdır.

İntraabdominal, gastrointestinal veya jinekolojik kaynaklı enfeksiyonlara bağlı sepsislerde aminoglikozid grubu ile anaerobik etkili bir ilaç kombinasyonu en uygun olanıdır (7,10,28).

c- Mediatörlerin Etkisini Azaltmaya Yönelik Tedavi:

Septik şok patogeneğinde rol alan spesifik mediatörlere etkili birçok yeni tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir. Monoklonal antikor (Anti lipid-A), Anti -TNF ve IL-1 reseptör antagonistlerinin verilmesi; prostanoidler, lökotrienler, tromboxane, PAF ve fosfolipaz-A₂ gibi maddelerin sentezinin veya etkilerinin önlenmesi; antioksidanların antibiyotiklerle birlikte kullanılması ile organ hasarlarında gözle görülür iyileşmeler elde edilmiştir (10,26).

B. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ

Eritrosit deformabilitesi, yani eritrositlerin kapillerden geçerken normal bikonkav yapılarını değiştirip kolay geçişi sağlamaları mikrosirkülasyonun sürekliliği için gerekli fizyolojik bir fenomendir (23). Çapı normalde 7 mikron olan eritrositlerin daha küçük çaplı (3.5 - 5 mikron) kapillerlerden geçebilmesi için deformabilite yeteneklerinin korunması periferik kan akımının sağlanmasında çok önemlidir (1,22,24,32,33).

Normalde eritrosit deformabilitesi birtakım intrinsek ve ekstrinsek faktörlerle sağlanır. Eritrositin bikonkav şeklinin korunması, ATP ve kalsiyum konsantrasyonu, uygun yüzey/volüm oranı, çift tabaka fosfolipid membran ve hemoglobin molekülü intrinsek faktörleri oluşturur. Kritik damar çapı ve pH ise eritrosit deformabilitesini doğrudan etkileyen ekstrinsek faktörlerdir (23,24).

Normal fizyolojik şartlarda kan laminar akım gösterir. Eritrositler tek tek birbirlerini iterler ve asla damar duvarına yapışmazlar. Eritrositlerin mikrosirkülasyondaki akım hızı plazma hızından daha fazladır (23,34).

İnsan ve hayvan sepsislerinde eritrositlerin deformabilite yeteneklerinin etkilenip etkilenmediğini anlamak için deformabilite indeksi (DI) tanımlanmıştır. Eritrosit deformabilitesi ya akım zamanı olarak ya da kanda anormal patolojilerin olduğu vakalarda bir dakikada süzülen kan volümü olarak hesaplanır. Her iki durumdaki sonuçlar DI olarak tanımladığımız, bir dakikada süzülen eritrosit hacmi olarak ifade edilir. Bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (23,24,31,35).

Cui laser ışınlarının kırılması yöntemini uyguladığı bir çalışmada yaşlılıkta akut iskemik atak geçiren hastalarda ve eritrositlerde

anormal kalsiyum birikimi hallerinde eritrosit deformabilitesinde azalma tesbit etmiş ve DI'nin tanı ve tedavideki önemini vurgulamıştır. (36).

Temel fiziksel özellikleri ve oksijen dağıtımındaki rolü eritrositleri sepsiste önemli bir hedef yapmaktadır. Eritrositlerin mikrosirkülasyondaki akım hızı plazma hızına göre sepsiste önemli derecede azalır. Damar çapında ve DI'deki azalmanın eritrositlerin kapiller sisteme geçişini engellediği sanılmaktadır.

Sepsiste eritrosit deformabilitesindeki azalmanın mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda pH düşüklüğü, hipoksi, laktik asidoz ve düşük ATP seviyelerinin eritrositte antioksidan defans sistemini azaltarak viskozite ve rijiditede artışa, dolayısıyla eritrosit deformabilitesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (23, 31, 34, 37, 38).

C. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Son yıllarda üzerinde çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konu olan serbest oksijen radikalleri (SOR), bir ya da birden fazla doymamış elektron içeren, organik ve inorganik yapıda olabilen son derece reaktif bileşiklerdir (3,16,17,26,39-41).

Aerobik organizmalarda moleküler oksijen, serbest radikallerin başlıca kaynağıdır. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü süperoksit (O_2^-) radikali açığa çıkar. Bu radikalden spontan ya da enzimatik dismutasyon ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Yine süperoksit radikalının yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu özellikle mitokondri içinde hidroksil radikali (OH^-) meydana gelir (17,26,39).

Süperoksit radikallerinin bir kısmı invivo olarak oto-oksidan re-

aksiyonlar ve elektron transport zincirinden elektronların kopması gibi kimyasal rastlantılar sonucu oluşurken bir kısmı ise PMNL aktivasyonu ve daha az oranda fibroblastlar ve lenfositler tarafından oluşturulur. Mitokondrilerde araşidonik asit metabolizması sırasında ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu ile de oluşabilirler (14,15,20,39,41).

SOR'leri normalde kısa ömürlüdür. Ancak, hücre membran fosfolipidleri ile reaksiyona girerek stabil lipid peroksitleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikal hidroksil radikalidir. Oluşan lipid peroksitler membran akıcılığını değiştirir, non-spesifik olarak permeabilitiye arttırır, membrandaki enzimlerin ve hücre bütünlüğün bozulmasına yol açar (2,3,14,15,19,21,25,39,42). Aktive olmuş PMNL'de oluşan SOR'leri bir plazma komponenti ile reaksiyona girerek inflamatuar hücre infiltrasyonuna neden olacak kemotaktik faktör ya da faktörlerin açığa çıkmasını sağlar (39). SOR'leri aynı zamanda endotel hücrelerde kontraktıl mekanizmanın aktivasyonuna yol açarak mikrovasküler permeabilitiye değiştirebilirler (2). Bu etkiler hücrelerde ve dokularda yapısal değişiklik ve fonksiyonel kayıplardan hücre ölümüne kadar gidebilen pek çok olumsuz sonuçlar şeklinde ortaya çıkar (43).

Oluşan SOR'leri ile antioksidan savunma mekanizması normalde dinamik bir denge içindedir. İnsanlarda antioksidan savunma çok fazla değildir. Antioksidan savunma sistemi çok güçlü olsaydı onarım sistemine gerek kalmazdı (16,43).

Aerob organizmada antioksidan savunma sisteminin üç komponenti vardır:

1- *Hücre İçi Enzimatik Antioksidan Savunma:* Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını O_2^- ve H_2O_2 radikallerini temizleyen supe-

roksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) oluşturur.

SOD süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eder. Dismutasyon spontan olarak ta görülebilir. Böylece süperoksitin hidroksil radikali oluşturmak üzere reaksiyona girmesi SOD tarafından önlenir. Hidrojen peroksit radikali katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir (3,12,25,26,42-44).

2- Lipid Peroksidasyon Zincir Reaksiyonlarını Kırıcı Antioksidanlar: Hücre membranında lipofilik serbest radikalleri daha az toksik hale dönüştürürler. Alfa tokoferol (Vit.E) süperoksit hidroksil ve lipid peroksit radikallerini bu şekilde etkiler. Yine askorbat (Vit.C) suda çözünebilir bir redüktan ve radikal temizleyici olup ayrıca tokoferolü indirgenmiş aktif formda tutar (12,16,25,39,44,45).

3- Hücre Dışı Antioksidan Savunma: İnsanda plazma antioksidan aktivitesinin büyük çoğunluğu seruloplazmine bağlıdır. Seruloplazmin plazmada SOD gibi davranarak antioksidan etki gösterir. Bu grupta ayrıca transferrin, haptoglobulin ve albumin yer alır (44).

SOR'leri bir çok hastalığın patogeneğinde doku hasarının son mediatörü olarak oldukça reaktif bileşiklerdir (14,17).

SOR'leri 100'den fazla hastalıkta rol alırlar. Sepsis, akut ve kronik inflamatuvar hastalıklar, travma, yanık, iskemi-reperfüzyon incinmesi ve diğer sebeplerle artan serbest radikalleri tablonun şiddeti ve seyrinde etkin rol alabilirler (1,3,12,16-18,20,21,26,44,46-48).

Sepsiste serbest radikal oluşumu muhtemelen kompleman sisteminin C_{5a} komponenti tarafından aktive edilen PMNL'lerin membranında bulunan NADP-oksidadın aktivasyonu ile başlar. Serbest radikaller

endotel hücre mebranında lipid peroksidasyonu yaparak doku hasarı oluşturur. Ayrıca araşidonik asit kullanımındaki artış lökotrienlerin ve prostaglandinlerin artışına yol açar. Bu metabolitler sepsiste multiorgan yetmezliğinde oluşan hemodinamik değişikliklere ve immun fonksiyonların bozulmasına mediatör olarak katkıda bulunurlar (2,9,16,17,21,31).



GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 129.5 ± 13 gr olan her iki cinsten Wistar -Albino türü ratlar kullanıldı. Standart yiyeceklerle beslenen denekler her grupta 10 adet olmak üzere üç gruba ayrıldı. I. Grup kontrol grubu, II. grup sepsis grubu ve III grup alfa tokoferol verildikten sonra sepsis oluşturulan grup (alfa tokoferol grubu) olarak tanımlandı.

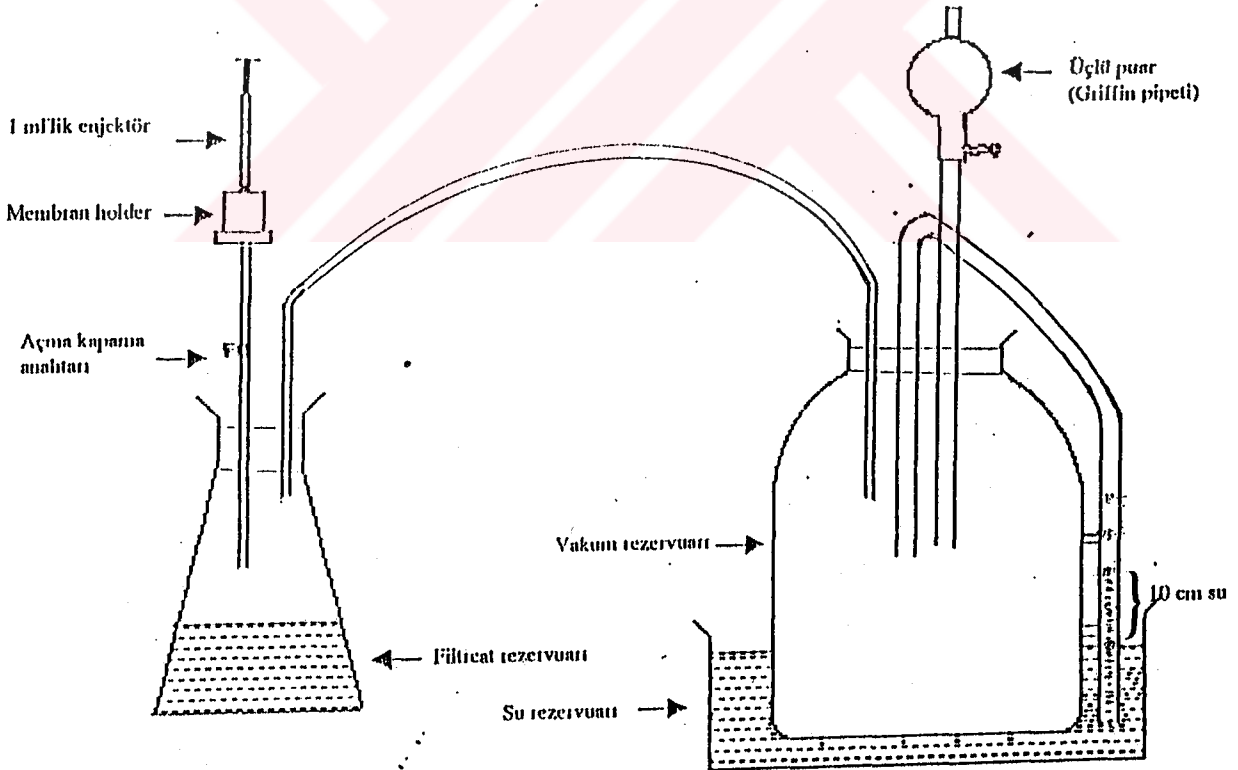
Alfa tokoferol grubuna sepsis oluşturmadan önce 3 gün subkutan (SC) olarak 0.1 mg/gr/gün, sepsis işleminden hemen önce de 0.05 mg/gr dozda %10 Tween 80 normal salinde eritilmiş alfa tokoferol verildi. Kontrol ve sepsis gruplarına ise sadece %10 Tween 80 normal salin verildi.

Sepsis oluşturmadan önce ratlar, sadece su içmelerine izin verilerek 12 saat aç bırakıldı. Sepsis ve alfa tokoferol gruplarına ATCC 25922 no'lu standart E.coli suşu ile ml'de 10^8 koloni olacak şekilde hazırlanan E.coli süspansiyonundan steril şartlarda 0.01 ml/gr dozda intraperitoneal (IP) olarak verildi (13). Kontrol grubuna ise normal salin verildi.

Bütün hayvanlara işlemin sonunda dehidratasyonu önlemek için SC olarak 0.06 ml/ gr normal salin enjeksiyonu yapıldı.

E.coli enjeksiyonundan 6 saat sonra üç gruptaki ratlarda tüylerde diklenme, konjuktival hiperemi, letarji olup olmadığı ve rektal ısı kaydedildi. Daha sonra ratlara eter ile anestezi uygulandı. Deformabilite indeksi (DI) ölçümü için 0.5 ml soğuk sitrat dextran fosfat.A içeren enjektör ile intrakardiyak (IC) yoldan 2 cc kan alındı. Alınan kan santrifüje edilerek eritrositler, lökositler ve plazma ayrıldı. Plazma ve lökositler aspire edilerek atıldı. DI modifiye Reid tekniği ile ölçüldü (9,35). Eritrositler 3

kez soğuk ringer tyrode (NaCl 0.8 gr, KCl 0.02 gr, CaCl₂, 0.02 gr, MgCl₂ 0.01 gr, NaHCO₃ 0.1 gr, NaH₂ PO₄ 0.005 gr, Glukoz 0.1 gr, Distile su 100 ml) ile yıkandıktan sonra hematokrit (Htc) %10'a dilüe edildi. Eritrosit morfolojisinin ayrımı ve rezidüel lökosit sayımı için periferik kan yayması yapıldı. Anormal eritrosit morfolojisi gösteren veya %2'den fazla lökosit sayılan numuneler çalışma dışı bırakıldı. Eritrositler 10 cm su filtrasyon basıncı uygulanarak 13 mm çapında ve 10 mikron kalınlığında olan ve 5 mikron çapında porları içeren polikarbonat yapıdaki membranlardan filtre edildi (Nucleopore Polycarbonate, Katalog no:000110413, Costar Corporation) (Şekil 2). Yıkanmış 1 ml eritrositin filtreden geçmesi için saniye olarak geçen süre "t" değeri olarak kaydedildi. $DI = Htc \times 60 \text{ sn/t}$ formülüne göre deformabilite indexi hesaplandı.



Şekil 2: Deformabilite İndeksi Ölçümünde Kullanılan Yöntemin Şematik Gösterilmesi

Ayrıca yine IC olarak non-steril temiz şartlarda 2.5 cc daha kan alındı. Kan kültür vasatına tekniğine uygun olarak 1 cc kan ile ekim yapıldı. Kan kültürü vasatı olarak hazır Amplia spectra cromotest Kod No: M128 modifiye edilerek kullanıldı. 1 damla kan ile periferik yayma yapıldı, Giemsa ile boyanıp ışık mikroskobunda 100x büyütmeyle lökosit sayımı, kalitatif trombosit tayini , toksik granülasyon, formül lökosit yapıldı ve eritrosit morfolojisi incelendi. Kalan 1.5 cc kan santrifüje edilerek serumu ayrıldı, biyokimyasal analiz için CİBA CORNING EXPRESS PLUS otoanalizörde kan şekeri, SGOT, SGPT, indirek ve direk bilirubin çalışıldı.

Kan alma işlemini takiben ratlar sakrifiye edilerek otopsi yapıldı. Temiz fakat non-steril şartlarda 7-8 cm'lik orta hat kesi ile karın açıldı. Makroskobik olarak peritonit bulguları (peritoneal hiperemi, matlaşma, reaksiyonel sıvı) ve karaciğer değişiklikleri olup olmadığı kaydedildi. Her hayvandan karaciğer biyopsisi alındı, HE (Hematoksilen - Eozin) ile boyanarak ışık mikroskop altında histopatolojik olarak incelendi.

Sağkalım tayini için herbirinde 10 rat olmak üzere üç grup oluşturuldu. Gruplar, protokole uygun gerekli işlemler yapıldıktan sonra 7 gün takip edildi.

Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis varyans analizi ve Tukey testi kullanıldı.

BULGULAR

Klinik olarak kontrol grubunda tüylerde diklenme, letarji ve konjüktival hiperemi saptanmadı. Sepsis grubunda tüylerde diklenme %90, letarji %100 ve konjüktival hiperemi %80 oranında iken alfa tokoferol grubunda sırasıyla %80, %60 ve %50 oranında görüldü. Ortalama rektal ateş kontrol grubunda $37.8 \pm 0.45^{\circ}\text{C}$, sepsis grubunda $36.0 \pm 0.73^{\circ}\text{C}$, alfa tokoferol grubunda ise $36.8 \pm 0.97^{\circ}\text{C}$ idi.

Makroskobik olarak sepsis ve alfa tokoferol gruplarında peritonit bulguları saptanırken kontrol grubunda saptanmadı. Üç grupta da karaciğerde makroskobik değişiklik görülmedi.

Kontrol grubu ratlarda yapılan kan kültüründe hiçbirinde E.coli üretilmedi. Sepsis ve alfa tokoferol gruplarında yer alan ratların tümünde E.coli üretildi.

Biyokimyasal analizde ortalama kan şekeri değerleri kontrol grubunda 114.1 ± 7.1 mg/dl, sepsis grubunda 95.2 ± 10 mg/dl, alfa tokoferol grubunda 102.7 ± 14.7 mg/dl idi. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel farklılık bulunamadı (KW=2.4, $p > 0.05$).

Kontrol grubunda SGOT değerleri 273.3 ± 13.7 Ü/L, sepsis grubunda 228.2 ± 17.7 Ü/L, alfa tokoferol grubunda ise 166.2 ± 8.6 Ü/L idi. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında kontrol grubu ile sepsis grubu arasında fark saptanamaz iken kontrol ve alfa tokoferol grupları ile sepsis ve alfa tokoferol grupları arasında anlamlı farklılık vardı (KW=11.8, $p < 0.05$, T=48.4). Ortalama SGPT değerleri ise kontrol grubunda 37.4 ± 3.3 Ü/L, sepsis grubunda 47.0 ± 4.7 Ü/L, alfa tokoferol grubunda ise 32.2 ± 4.0 Ü/L idi. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında kontrol ve sepsis grupları ile kontrol ve alfa tokoferol grupları arasında

fark saptanamadı. Buna karşın sepsis ve alfatokoferol grupları arasında fark vardı (KW=6.1, $p<0.05$, T=14) (Tablo -I).

Direk ve indirek bilirubin değerleri sonuçların anlamsız olması üzerine değerlendirilmeden çıkarıldı.

Ortalama lökosit sayıları kontrol, sepsis ve alfa tokoferol gruplarında sırasıyla; 3819 ± 1039 , 2050 ± 914 ve 3030 ± 909 idi. Trombositler kalitatif olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ratların hepsinde yeterli küme oluşumu mevcut iken sepsis grubunda %40, alfa tokoferol grubunda %60 oranında yeterli küme görüldü. Morfolojik incelemede kontrol grubundaki eritrositlerin tümünün normokrom ve normositer yapıda oldukları görüldü. Sepsis grubundaki eritrosit morfolojisi %40 oranında normokrom, normositer görünümde iken %60 oranında hipokromi ve anizotroz mevcut idi. Alfa tokoferol grubunda ise %80 normokrom, normositer, %20 hipokrom, mikrositer görünüm saptandı. Periferik yaymada sepsis grubundaki ratların hepsinde toksik granülasyon (TG) ve çomak hücreleri saptandığı halde alfa tokoferol grubunda bu bulgular iki hayvanda görüldü. Kontrol grubunun hiçbirinde TG ve çomak hücre saptanmadı.

Kontrol grubunda ortalama DI 1.07 ± 0.02 iken sepsis grubunda 0.31 ± 0.05 alfa tokoferol grubunda 0.69 ± 0.15 idi. Üç grubun deformabilite indeksi karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu görüldü (KW=24.7, $p<0.05$). Ayrıca, kontrol ve sepsis grubu ile kontrol ve alfa tokoferol grubu arasında da anlamlı farklılık mevcut idi (T=0.33, $p<0.05$). Bu anlamlı farklılık sepsis ve alfa tokoferol grubu arasında da bulunmaktaydı (T=0.33, $p<0.05$). (Tablo II).

Karaciğer biyopsilerinin histopatolojik incelemesinde kupfer hücre hiperplazisi, V.centraliste konjesyon, sinuzoidal PMNL infiltrasyonu ve portal inflamasyon saptandı (Şekil 3). Bu bulguların gruplara göre görülme sıklığı Tablo III'te gösterildi.

TABLO I: Her iki Grubun Kan Şekeri, SGOT, SGPT Değerlerinin Karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=10) X±Sx	Sepsis grubu (n=10) X±Sx	Alfa tokoferol grubu (n=10) X±Sx	İstatistiksel Analiz
Kan şekeri (mg/dl)	114.1±7.1	95.2±10	102.7±14.7	KW=2.4 p>0.05
SGOT (U/L)	237.3±13.7	228.2±117.7*	166.2±8.6*	KW=11.8 p<0.05 T=48.4
SGPT (U/L)	37.4±3.3	47.0±4.7	32.2±4.0*	KW=6.1 p<0.05 T=14

* Tukey testi ile farklılığı yaratan grup

TABLO II: Her Üç Grubun Sağkalım ve Deformabilite İndeksi Değerlerinin Karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=10) X±Sx	Sepsis grubu (n=10) X±Sx	Alfa tokoferol grubu (n=10) X±Sx	İstatistiksel Analiz
Sağkalım (saat)	139.3±19.3	7.65±0.4*	78.7±20.4*	KW=20.4 p<0.05 T=56.5
Deformabilite İndeksi	1.07±0.02	0.31±0.05*	0.69±0.15*	KW=24.7 p<0.05 T=0.33

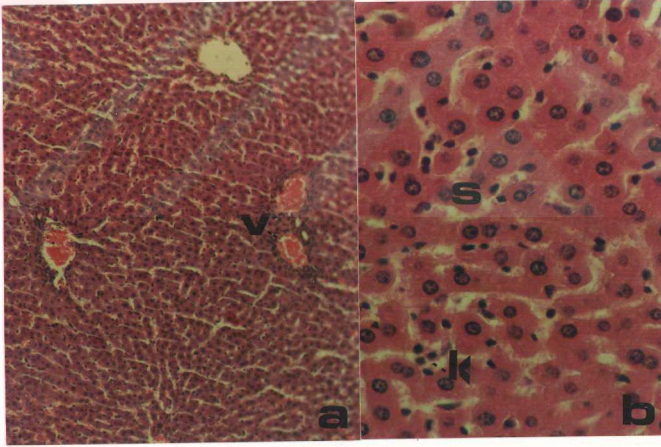
* Tukey testi ile farklılığı yaratan grup

Ortalama sağkalım kontrol grubunda 139.3±19.3 saat iken sepsis grubunda 7.65±0.4 saat, alfa tokoferol grubunda 78.7±20.4 saat bulundu. Her üç grubun sağkalım süreleri karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu görüldü (KW=20.4, p<0.05). Gerçek farklılığı yaratan gruplar ara-

sında anlamlı farklılık mevcuttu. Bu anlamlı farklılık sepsis grubu ile alfa tokoferol grubu arasında bulunmaktaydı ($T=56.5$, $p<0.05$) (Tablo 2).

TABLO III: Karaciğerdeki Histopatolojik Bulguların Gruplara Göre Görülme Sıklığı

Histopatolojik bulgular	Kontrol Grubu (n=10)	Sepsis grubu (n=10)	Alfa tokoferol grubu (n=10)
Kupfer Hücre Hiperplazisi	4	8	6
V.centraliste Konjesyon	4	5	6
Sinuzoidal PMNL İnfiltrasyonu	4	6	4
Portal İnflamasyon	2	2	1



Şekil 3: Karaciğerdeki Histopatolojik Bulgular; a-) V.centraliste Konjesyon (HE, X20), b-) Sinuzoidal PMNL İnfiltrasyonu (S) ve Kupfer Hücre Hiperplazisi (K) (HE, X100).

TARTIŞMA

Eritrositlerin kapillerlerden geçebilmesi için deformabilite yeteneklerinin korunması, mikrosirkülatuvar akımın sağlanmasında ve oksijenin serbestleştirilmesinde önemli rol oynar (9,24). Bu nedenle eritrositler sepsiste önemli bir hedef teşkil eder. Sepsiste eritrosit deformabilitesindeki azalmanın mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan çalışmalarda pH düşüklüğü, hipoksi, laktik asidoz ve düşük ATPseviyelerinin eritrositte antioksidan defans sistemini zayıflatarak viskozite ve rijiditede artışa yol açtığı gösterilmiştir (23,37). SOR'leri, kompleman aktivasyonu ve endotoksin eritrosit deformabilitesini azaltan önemli faktörlerdir. Sepsiste oluşan SOR'lerinin hücre membranında lipid peroksidasyonu yaparak eritrosit deformabilite yeteneğini azalttığı bilinmektedir (9,14,21,22). Eritrosit antioksidan sisteminin önemli bir ögesi olan alfa tokoferol lipid peroksidasyonunu engellemektedir (3,37,49).

Mc Kechnie ve arkadaşları (17) endotoksin verilen farelerde plazma alfa tokoferol seviyesinin azaldığını saptamışlardır. Powell ve arkadaşları ise çalışmalarında (1,9,21,38) çekal ligasyon ile sepsis oluşturmada önce alfa tokoferol verilmesinin eritrosit deformabilitesini koruduğunu ve oksijen kullanımını artırdığını tesbit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da alfa tokoferolün eritrosit deformabilitesini koruduğunu ve bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ($p<0.05$). Kontrol grubu ile alfa tokoferol verilen grup arasında da anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

Eritrosit deformabilitesi yanında sepsiste kandaki diğer şekilli elemanların rolü de araştırılmıştır. Trombosit aktivasyonu sonucu oluşan mikrotrombüsler ve lökosit tıkaçlar venülleri ve kapillerleri tıkayarak

mikrosirkülasyonun engellenmesine ve iskemik hücre hasarına neden olur (23). Puranapanda (22) köpeklerde, Warner (19) ise ratlarda oluşturdıkları deneysel sepsisin erken döneminde lökopeni ve trombositopeni olduğunu tesbit ederek bunun kapiller yakalanmaya bağlı olduğunu savunmuşlardır. Ratlarda sepsis oluşturduktan altı saat sonra yaptığımız periferik yaymada lökopeni ve trombositopeni görüldü. Ayrıca sepsis grubunun hepsinde toksik granülasyon ve çomak hücreler görüldü. Alfa tokoferol verdiğimiz grupta lökosit ve trombositler yeterli sayıda idi. Toksik granülasyon ve çomak hücre iki hayvanda görüldü.

Sepsiste organ disfonksiyonu primer olarak dolaşımdaki substratlardan yararlanamama ve hücresel seviyede enerji azalmasına bağlıdır. Sepsiste karaciğerde sinuzoidal kan akımının azalması karaciğer yetmezliğinde en erken belkide en önemli bulgudur (23). Karaciğer genel durumun korunmasında ve enerji metabolizmasının sağlanmasında çok önemli bir organdır. Şiddetli ve uzun süreli endotoksin şoku bu fonksiyonların devamını güçleştirir. Gram negatif bakteriyel sepsiste endotoksine bağlı olarak, glukoz ve lipid metabolizmasının inhibisyonu, lipid peroksit oluşumu, serbest radikallerin artması ve direk hücre hasarı gibi etkiler görülür. Endojen antioksidanların azalması ile serbest radikal hasarı ortaya çıkar (12).

Bir grup araştırmacı ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda; deneysel sepsiste karaciğer kan akımının azaldığını (4); asidik ortam ve oluşan SOR'nin oluşturduğu lipid peroksidasyonunun karaciğer hasarına ve lizozomal enzimlerde artışa neden olduğunu (12,15); alfa tokoferolün karaciğer fonksiyonlarını koruyarak serumda SGOT ve SGPT aktivitelerini azalttığını (49) göstermişlerdir. Sepsiste karaciğerde ortaya çıkan histopatolojik değişiklikleri inceleyen araştırmacılar; karaciğer hasarının en erken bulgusunun sinuzoidal PMNL infiltrasyonu olduğunu (30), kupfer

hücrelerinde fagosite bakteriler, eritrositler ve büyük lizozomlar ile karaciğer hücrelerinde sitozol kümeleri ve mitokondriyal dejenerasyon olduğunu (50) göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda sepsis grubunda kan şekeri diğer gruplara göre düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). SGOT ve SGPT değerlerinde de istatistiksel olarak sepsis ve alfa tokoferol gruplarında anlamlı fark vardı ($p<0.05$). Enzimler sepsis grubu ratlarda yüksek idi. Ancak, kontrol grubunda da enzimlerin yüksek bulunması anlamlı bir nedene bağlanamadı. Histopatolojik olarak kupfer hücre hiperplazisi, sinuzodial PMNL infiltrasyonu ve vena centraliste konjesyon en önemli bulgulardı. Bununla birlikte gruplar arasında belirgin bir farklılık saptanmadı.

Sepsise maruz kalmadan önce alfa tokoferol verilmesi hem endotoksinin yol açtığı membran hasarını hem de lipid peroksidasyonundaki artışı önleyerek sağkalım oranını arttırmaktadır. Bir çok araştırmacı alfa tokoferol tedavisinden sonra endotoksin verilen hayvanlarda sağkalımın arttığını göstermişlerdir. Sugino (12) ve Powell (1,9,21) yaptıkları çalışmalarda alfa tokoferol ile tedavi ettikleri ratlarda sepsis oluşturduklarında eritrosit deformabilitesinde ve hücre enerji düzeylerinde artış ile birlikte sağkalımda da yükselme olduğunu göstermişlerdir.

Bizim deneysel sepsis modelinde elde ettiğimiz sağkalım sonuçları da Sugino ve Powell'in bulgularıyla uyumlu idi. Her üç grubun sağkalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$). Alfa tokoferol verilen grupta sağkalım oranı artmıştı. Ancak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında alfa tokoferol verilmesine rağmen sağkalımının düşük olduğu görüldü. Gruplar arası karşılaştırmalarda sağkalım eritro-

sit deformabilitesi değişiklikleriyle korelasyon gösterdiği saptandı.

Bu çalışmada elde edilen veriler; deneysel sepsis modelinin erken döneminde SOR'nin lipid peroksidasyonu ile eritrosit deformabilitesini azalttığını ve bir antioksidan olan alfa tokoferolün eritrositlerin deformabilite yeteneğini koruyarak sağkalımda artış sağladığını ortaya koymaktadır.



SONUÇ

Intraperitoneal standart E.coli enjeksiyonu ile sepsis oluşturulan ratlarda alfa tokoferolün eritrosit deformabilitesi, karaciğer değişiklikleri ve sağkalım üzerine etkilerinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada;

1- Sepsis oluşturulan grupta eritrosit deformabilitesinin azaldığı, ön tedavi olarak alfa tokoferol verilmesinin eritrositlerde deformabilite yeteneğini anlamlı olarak koruduğu görüldü.

2- Sepsis grubunda serum SGOT ve SGPT seviyelerinde saptanan artışın alfa tokoferol verilmesiyle anlamlı olarak azaldığı tesbit edildi. Karaciğer biyopsilerinin histopatolojik incelenmesinde gruplar arasında farklılık saptanmadı.

3- Alfa tokoferolün ön tedavi olarak verilmesinin sağkalım oranlarını anlamlı olarak arttırdığı görüldü.

Sonuç olarak; deneysel sepsis patogenezinde SOR'nin önemli bir mediatör olduğu, bir antioksidan olan alfa tokoferolün sepsis ve septik şok tedavisinde yer alabileceği gösterildi.

ÖZET

Cerrahi teknikler, antimikrobik ajanlar ve destekleyici tedavilerdeki gelişmelere karşın cerrahi yoğun bakım ünitelerine yatırılan hastalarda gram negatif sepsis ve septik şokun önemli derecede morbidite ve mortaliteye yol açması yeni tedavi arayışlarına neden olmuştur. Son yıllarda ilgi çeken ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konu olan SOR'nin sepsis ve septik şok patogenezinde etkili oldukları gösterilmiştir. SOR'nin etki mekanizmalarının tam olarak açıklanamamasına karşın oksidatif strese maruz kalan organizmada antioksidan defansın korunmasının tedavi-deki başarıyı arttıracığı düşünülmektedir.

Bu deneysel çalışmada antioksidan olarak kullanılan alfa tokoferolun, oluşturulan sepsiste koruyucu etkisi araştırıldı. Ratlar üç gruba ayrıldı. I. grup kontrol grubu olarak takip edildi. II. grupta intraperitoneal E.coli enjeksiyonu ile sepsis oluşturuldu. III. gruba ise ön tedavi olarak alfa tokoferol verildikten sonra sepsis oluşturuldu. Alfa tokoferolün eritrosit deformabilitesi, karaciğer değişiklikleri ve sağkalım üzerine koruyucu etkisi araştırıldı. Alfa tokoferolün sepsiste eritrosit deformabilitesini anlamlı olarak koruduğu görüldü. Karaciğerde histopatolojik bulgularda gruplar arasında farklılık bulunamadı, ancak SGOT ve SGPT seviyelerindeki artış alfa tokoferol ile anlamlı olarak önlendi. Yine alfa tokoferol verilen grupta sağlanan sağkalım artışı istatistiksel olarak anlamlı idi. Sağkalım artışının alfa tokoferolün eritrosit deformabilitesi üzerine koruyucu etkisine bağlı olduğu düşünüldü.

Sonuç olarak bir antioksidan olan alfa tokoferolün ön tedavi olarak verilmesinin ratlarda oluşturulan deneysel sepsiste eritrosit deformabilitesi ve sağkalımı arttırdığı saptanmış ve bunun sonucu olarak da antioksidan defansın korunmasının sepsis ve septik şok tedavisinde önemli bir faktör olduğu ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- 1- Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF, Dikdan G: Effect of alphatocopherol on red cell deformability and survival in sepsis. *Curr Surg.* 46: 308-382, 1989.
- 2- Van Bebber IPT, Lieners CFJ, Koldewijn EL, Redl H, Goris RJA: Superoxide dismutase and catalase in an experimental model of multiple organ failure. *J Surg Res*, 52:265-270. 1992.
- 3- Fang CH, Peck MD, Alexander JW, Babcock GF, Warden GD: The effect of free radical scavengers on outcome after infection in burned mice. *J Trauma*, 30: 453-456.1990.
- 4- Machiedo GW, Hurd T, Rush BFJ, Dikdan G, McGee J, Lysz T: Temporal relationship of hepatocellular dysfunction and ischemia in sepsis. *Arch Surg.* 123: 424-427. 1988.
- 5- Baumgartner JD, Glauser MP, McCutchan JA, Ziegler EJ, Van Melle G, Klauber MR: Prevention of gram-negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid. *Lancet*, 2: 59-63, 1985.
- 6- Townsend MC, Hampton WW, Haybron DM, Schirmer WJ, Fry DE: Effective organ blood flow and bioenergy status in murine peritonitis Surgery. 100: 205-213. 1986.
- 7- Offenbartl K, Bengmark S: Intraabdominal infections and gut origine sepsis. *World J Surg*, 14: 191-195. 1990.
- 8- Calandra T, Glauser MP, Schelmleken, Verhoef J and the Swiss-Dutch J5 immunoglobulin Study Group: Treatment of gram - negative septic shock with human IgG antibody to *Escherichia coli* J5: A prospective, double - blind randomized trial. *J Infect Dis* 158:312-318. 1988.

- 9- Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan G: Oxygen free radicals: Effect on red cell deformability in sepsis *Crit Care Med*, 19: 732-735, 1991.
- 10- Rackow EC, Astiz ME: Mechanisms and management of septic shock. *Crit Care Cli*. 9:219-237. 1993.
- 11- Mileski WJ: *Sepsis Surg Clin North Am*, 71: 749-764. 1991.
- 12- Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T: The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery*, 101:746-752, 1987.
- 13- Tsukada K, Katoh H, Shiojima M, Takenoshita SI, Nagamachi Y: Mortality rate and bacteremia, endotoxin and endothelin-1 levels in antibiotic therapy for *E.coli* septic peritonitis. *APMIS*, 101: 97-100. 1993.
- 14- Morgan RA, Manning PB, Coran AG, Drongowski RA, Till GO, Ward PD, Oldham KT: Oxygen free radical activity during live *E.coli* septic shock in the dog. *Circ Shock*, 25: 319-323, 1988.
- 15- Kalra J, Chaudhary AK, Massey KL, Prasad K: Effect of oxygen free radicals, hypoxia and pH on the releasae of liver lysosomal enzymes. *Mol Cell Biochem*, 94:1-8, 1990.
- 16- Halliwell B: The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system, *Haemostatis*, 23, (Suppl 1): 118-126, 1993.
- 17- Mc Kechnie K, Furman BL, Parratt JR: Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats *Circ Shock*, 19: 429-439. 1986.

- 18- Salim AS: Role of oxygen-derived free radical scavengers in the treatment of recurrent pain produced by chronic pancreatitis. *Arch Surg*, 126:1109-1114. 1991.
- 19- Warner BW, Hasselgren PO, James JH, Bialkowiska K, Rigel DF, Ogle C, Fischer JE: Superoxide dismutase in rats with sepsis. *Arch Surg*, 122: 1142-1146, 1987.
- 20- Zöllei I, Karacsony G, Baltas B, Nagy S: Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions of rats *Acta Physiol Hung*, 73:357-362, 1989.
- 21- Powel RJ, Machiedo GW, Rush BF, Dikdan GS: Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg.*, 57: 86-88, 1991.
- 22- Puranapanda V, Hinshaw LB, O'Rear EA, Chang ACK, Whitsett TL: Erythrocyte deformability in canine septic shock and the efficacy of pentoxifylline and a leukotriene antagonist. *Proc Soc Exp Biol Med*, 185: 206-210, 1987.
- 23- Hurd TC, Dasmahapatra KS, Rush BF, Machiedo GW: Red blood cell deformability in human and experimental sepsis, *Arch Surg*, 123: 217-220. 1988.
- 24- Hirayama T, Folmerz P, Hansson R, Jonsson O, Petterson S, Roberts D, Schersten T: Effect of oxygen free radicals on rabbit and human erythrocytes *Scand J Thor Cardiovasc Surg*. 20: 247-252. 1986.
- 25- Davies KJA, Goldberg AL: Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 262:8220-8226. 1987.
- 26- Schoenberg MH, Beger HG: Sauerstoffradikale im septischen schock. *Chirurg*. 59: 836-841, 1988.

- 27- Shands JW, Jr: Empiric antibiotic therapy of abdominal sepsis and serious perioperative infections. *Surg Clin North Am.* 73:291-306. 1993.
- 28- Shires III GT, Canizaro PC, Carrico CJ, Shires GT: Septic shock . In ed. Scwartz SI, *Principles of Surgery*, 5th ed. McGraw-Hill Book Company. Singapore, p:172-177. 1988.
- 29- Lechner AJ, Rouben LR, Potthoff LH, Tredway TL, Matuschak GM: Effects of pentoxifylline on tumor necrosis factor production and survival during lethal *E.coli* sepsis vs. disseminated candidiasis with fungal septic shock. *Circ Shock*, 39: 306-315.1993.
- 30- Young RSK, Woods C, Towfighi J: Hepatic damage in neonatal rat due to *E.coli* endotoxin. *Dig. Dis Sci*, 31:651-656.1986.
- 31- Langenfeld JE, Livingston DH, Machiedo GW: Red cell deformability is an early indicator of infection *Surgery*. 110:398-404. 1991.
- 32- Forman S, Bischel M, Hocstein P: Erythrocyte deformability in uremic hemodialyzed patients. *Ann Int Med*, 79: 841-843.1973.
- 33- Reid HL, Dormandy JA, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy TL: Impaired red cell deformability in peripheral vascular disease. *Lancet*, 27: 666-667.1976.
- 34- Baker CH, Wilmoth FR, Sutton ET: Reduced RBC versus plasma microvascular flow due to endotoxin. *Circ Shock*, 20:127-139. 1986.
- 35- Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy JA, Dormandy TL: A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J Clin Pathol*. 29:855-858. 1976.
- 36- Cui P: Experimental study of erythrocyte deformation (Abstract) *Chung Hua Shen Ching Ching Shen Ko Tsa Chih*, 25:229-231. 1992.

- 37- Scott MD, Eaton JW, Kuypers FA, Daniel T, Chiu Y, Lubin BH: Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense. *Blood*, 74: 2542-2549. 1989.
- 38- Powel RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr: Decreased red blood cell deformability and impaired oxygen utilization during human sepsis (Abstract). *Am Surg*. 59: 65-68. 1993.
- 39- Erden M: Serbest Radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri*. 12:201-206.1992.
- 40- Salim AS: Scavengers of oxygen-derived free radical prolong survival in advanced colonic cancer. *Tumor Biol*. 14:9-17.1993.
- 41- Dianzani MU: Free radicals in physiology and pathology (Abstract). *Boll Soc Ital Biol Sper*, 68:491-511. 1992.
- 42- Broner CW, Shenep JL, Stidham GL, Stokes DC, Fairclough D, Schonbaum GR, Rehg JE, Hildner WK: Effect of antioxidants in experimental *Escherichia coli* septicemia. *Circ Shock*, 29:77-92, 1989.
- 43- Yardımcı S: Superoksit dismutaz uygulamasının trombopoez üzerine etkileri. *Türk Tıp Araştırma*, 10:2-7, 1992.
- 44- Yavuzer S, Akbay C: Pulmoner oedema, Oxygen free radicals and antioxidant defense. *Journal of Turkish Pysiological Sciences*, 1:92-94. 1992.
- 45- Rose RC, Bode AM: Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB*, 7:1135-1142. 1993.
- 46- Nakamura K, Aoike A, Rokutan K, Hosokawa T, Koyoma K, Kawai K: The role of oxygen radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced in mice by feeding-restriction stress. *Scan J Gastroenterol*, 162 (Suppl): 47-50. 1989.

- 47- Moyana T, Lalonde JM: Carrageenan - induced intestinal injury: possible role of oxygen free radicals. *Ann Clin Lab Sci*, 21: 258-263. 1991.
- 48- Guice KS, Oldham KT, Johnson KT: Failure of antioxidant therapy (polyethylene glycol-conjugated catalase) in acute pancreatitis. *Am J Surg*, 157: 146-149. 1989.
- 49- Vinogradova LF, Mirzoian ZhA, Kharlitskaia EV, Beketova TP: Experimental antioxidant therapy in toxic liver damage from CCl_4 and chloxy (Abstract) *Patol Fiziol Eksp Ter*, 4: 52-56. 1989.
- 50- Kodama H, Morishita Y, Anzai T: Morphological studies on liver in septic state by mice with *E.coli* injection into the abdominal cavity (Abstract) *Kansenshogaku Zasshi*, 67: 342-348. 1993.