



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**YANIK SONRASI KARACİĞERDE GELİŞEN OKSİDATİF HASAR
ÜZERİNE WR-2721 (AMİFOSTİN)'İN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Cem AYDOĞAN

Tez Danışmanı

Yard. Doç. Dr. Mahmut Can YAĞMURDUR

Ankara/2005

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini özveriyle aktaran, yol gösterici sayın hocalarım;

Prof. Dr. Mehmet Haberal,

Prof. Dr. Nevzat Bilgin,

Prof. Dr. Esat Hersek,

Prof. Dr. Zafer Öner,

Prof. Dr. Ahmet Özenç,

Doç. Dr. Hamdi Karakayalı,

Doç. Dr. Gökhan Moray,

Doç. Dr. Remzi Emiroğlu,

Doç. Dr. Aydın Dalgıç,

Yrd. Doç. Dr. Mahmut Can Yağmurdur,

Yrd. Doç. Dr. Özgür Başaran,

Uzman Dr. Şinasi Sevmiş

Uzman Dr. Feza Karakayalı,

Uzman Dr. Yahya Ekici,

Yrd. Doç. Dr. Turgut Noyan,

Doç. Dr. Tarık Zafer Nursal,

Yrd. Doç. Dr. Sedat Yıldırım,

Yrd. Doç. Dr. Akın Tarım,

Uzman Dr. Emin Türk'e saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmamda desteği olan; Genel Cerrahi Anabilim dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mahmut Can Yağmurdur'a, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Suna Türkoğlu'na ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Uzun eğitimim boyunca destek ve sevgilerini esirgemeyen hayat arkadaşım Dr. Sibel Aydoğan, oğlum Hikmet Alp Aydoğan ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Cem Aydoğan

ÖZET

Yanık travması vücutta sıvı kompartmanları arasındaki dengeyi bozar. Periferik perfüzyon ve hipovolemiyi düzeltmek için verilen sıvı replasman tedavileri ile daha önce iskemik olan dokuya oksijen sunumu yapıldığında iskemi-reperfüzyon hasarı oluşur. Bu etki yanık sonrası geç sıvı resusitasyonu (GSR) yapıldığında daha belirgindir. Hipoksik kalan dokuda hücresel enerji azalır ve tekrar oksijen sunumu ile serbest oksijen radikalleri oluşur. Ek olarak, aktive olmuş nötrofiller de serbest oksijen radikalleri oluşturur. Sonuçta inflamatuvar sitokinler salınır, antioksidan savunma sistemleri bozulur ve lipid peroksidasyonu meydana gelir.

Antioksidan tedaviler iskemi reperfüzyon hasarının etkilerini önleyebilir. Bu deneysel çalışmada, yanık travması sonrası iskemi reperfüzyon hasarı sonucu meydana gelen oksidatif stresin karaciğer üzerine olan etkileri ve bu etkilere karşı Amifostin'in koruyuculuğu araştırıldı. Amifostin, iyonize radyasyon ve kemoterapötik ajanlara karşı normal dokularda hücre koruyucu etki sağlayan, klinik onkolojide kullanılan inorganik bir tiyofosfattır.

Çalışmaya herbiri altı rattan oluşan altı grup dahil edildi. Grup I: Kontrol grubu , Grup II: Yanık oluşturulmadan sadece Amifostin verilen, Grup III: Yanık+Erken Sıvı Resusitasyonu (ESR) yapılan, Grup IV: Yanık+GSR yapılan, Grup V: Yanık+ESR+Amifostin verilen , Grup VI: Yanık+GSR+Amifostin verilen ratlardan oluşmuştur.

Ratlar yanık sonrası beşinci gün sakrifiye edildi. Portal venden alınan kan örneklerinde Karaciğer Fonksiyon Testleri (KCFT), Tümör Nekroz Faktörü α (TNF- α), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-8 (IL-8) değerlendirildi. Ayrıca karaciğer dokusunda Malondialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri değerlendirildi.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, Amifostin'in yanık sonrası karaciğerde serbest oksijen radikallerinin bir etkisi olan lipid peroksidasyonunu azalttığı ve serbest oksijen radikallerine karşı hücresel antioksidan savunma mekanizmalarını arttırdığı saptandı.

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
2.1.	YANIK TRAVMASI SONRASI OLUŞAN FİZYOLOJİK CEVAPLAR	3
2.2.	SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	4
2.3.	TRAVMADA SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI	5
2.4.	YANIK TRAVMASINDA NİTRİK OKSİT	6
2.5.	TRAVMADA LİPİD PEROKSİDASYONU	7
2.6.	OKSİDATİF STRES, YANIK TRAVMASINDA İNFLAMATUVAR SİTOKİN CEVABINI BAŞLATIR	8
2.7.	GSH	11
2.8.	AMİFOSTİN	12
2.8.1.	AMİFOSTİNİN HÜCRE KORUYUCU MEKANİZMASI	14
2.8.2.	HÜCRE KORUYUCU ETKİNİN SEÇİCİLİĞİ	14
2.8.3.	AMİFOSTİNİN FARMAKOKİNETİĞİ	15
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1.	ARAŞTIRMA YERİ VE ORTAMI	17
3.2.	ARAŞTIRMA TİPİ	17
3.3.	ANESTEZİ	17
3.4.	ARAŞTIRMA GRUPLARI	17
3.5.	ARAŞTIRMA YÖNTEMİ	18
3.6.	ARAŞTIRMA PARAMETRELERİ	18
3.7.	YANIK MODELİ	18
3.8.	DOKU VE KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI	20
3.9.	DOKU MDA ve GSH ANALİZİ	22
3.10.	TNF-a, IL-6 ve IL-8 ANALİZİ	23
3.11.	KARACİĞER FONKSİYON TESTLERİNİN ANALİZİ	24
4.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	25
5.	BULGULAR	26
6.	TARTIŞMA	30
7.	SONUÇLAR	35
8.	KAYNAKLAR	36

KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin amino transferaz
AMP	: Adenozin Monofosfat
AST	: Aspartat amino transferaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCG	: Brom Cresol Green (Brom Kresol Yeşil)
Ca	: Kalsiyum
ÇOYS	: Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu
eNOS	: Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
ESR	: Erken Sıvı Resusitasyonu
GP	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSR	: Geç Sıvı Resusitasyonu
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HGPRT	: Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz
İkB	: İnhibitör Protein Kappa B
İCAM- 1	: Hücre içi adezyon molekülü- 1
İCAM- 2	: Hücre içi adezyon molekülü- 2
İL-1	: İnterlökin-1
İL-6	: İnterlökin-6
İL-8	: İnterlökin-8
İV	: İntravenöz
iNOS	: Uyarılabilen Nitrik Oksit Sentaz
K	: Potasyum
KCFT	: Karaciğer fonksiyon testleri
MDA	: Malondialdehit
Na	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NF-kB	: Nükleer Faktör Kappa
NK	: Doğal öldürücü hücre
NO	: Nitrikoksit
O₂⁻	: Süperoksit
OH⁻	: Hidroksil
PAF	: Trombosit aktive edici faktör.
PARS	: Poli ADP Riboz Sentetaz
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
SC	: Subkütan
SIRS	: Sistemik İnflamatuar Cevap Sendromu

SOD : Süperoksit dismutaz
TBARS : Tiyobarbitürik asit
TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
WR-2721 : Amifostin
 γ IFN : Gama İnterferon

ŞEKİLLER

Şekil 1.	Aktif olmayan WR-2721'in aktif metaboliti WR-1065'e dönüşümü. WR-1065'in WR-33278'e oksidasyonu (10).	12
Şekil 2.	GSH Kalibrasyon Eğrisi	23
Şekil 3.	Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen ALP değerlerinin grafiksel görünümü.	27
Şekil 4.	Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen Albumin değerlerinin grafiksel görünümü.	27
Şekil 5.	Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen MDA değerlerinin grafiksel görünümü.	28
Şekil 6.	Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen GSH değerlerinin grafiksel görünümü.	28

TABLÖLAR

- Tablo 1.** Portal venden alınan kan örneklerinde Karaciğer Fonksiyon Testleri'nin değerleri ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. 26
- Tablo 2.** Portal venden alınan kan örneklerinde TNF- α , IL-6, IL-8 değerleri pg/ml cinsinden ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. 26
- Tablo 3.** Tüm gruplardaki karaciğer dokusunda hesaplanan MDA ve GSH değerleri ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. 26

RESİMLER

Resim 1.	Ratlarda yanık modelinin oluşturulması	19
Resim 2.	Histopatolojik olarak gösterilen üçüncü derece yanıktan bir kesit	20
Resim 3.	Portal venden kan örneğinin alınması	21

1.GİRİŞ

Yanık ciltte meydana getirdiği hasarın dışında, birçok organı etkilemesi sebebiyle sistemik bir hastalıktır. Bu tip doku hasarının patofizyolojik temelleri tam olarak açıklanamamışsa da, deneysel ve klinik olarak yapılan çalışmaların bulgularına göre lokal yanık hasarı oksidanlara bağlı organ hasarına neden olur (1,2).

Yanık sonrası kompleks mediatör sistemlerinin aktivasyonu ile bir dizi patofizyolojik değişiklikler olur (3). Örneğin, iskemide veya organ yetmezliğinde serbest oksijen radikallerinin, nötrofillerin ve endotel hücrelerinin rolleri net olarak gösterilmiştir.

Yanık sonrası gelişen lipid peroksidasyonu hücre membranlarının oksidatif hasarına neden olur. Bu hasar sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri hücre ölümüne neden olmaktadır(3,4).Yanık hasarında plazmada, akciğerde, böbrekte ve karaciğerde lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir (5).Yanık hasarına karşı oluşan sistemik inflamatuvar cevabın bir sonucu olarak organlarda sekestre olan nötrofiller serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Yanık sonrası verilen antioksidanların, hücreyel antioksidan savunma sistemlerini düzenlediği ve doku hasarını azalttığı gösterilmiştir.(6).

Tüm çabalara rağmen, yanık hasarına karşı gelişen sistemik inflamatuvar cevap oklu Organ Yetmezliği Sendromu (OYS)'na ilerleyebilir (7). Sistemik inflamatuvar cevap metabolizmada artışa, proteinlerin azalmasına ve katabolizmanın artmasına neden olur. Yaşamsal organların yapı ve fonksiyonları bozulur. OYS'nda gelişebilecek hepatik yetmezlik önemli bir sorundur. Fizyolojik durumlarda karaciğer albumin, prealbumin gibi yapısal proteinleri sentezler. Travma sonrası bu yapısal proteinlerin sentezi haptoglobulin, alfa-2 makroglobulin, alfa-1 asit glikoprotein ve C-reaktif protein gibi akut faz proteinlerine kayar (8). Karaciğerin bu reaksiyonu "hepatik akut faz cevabı" olarak isimlendirilir. Bu cevabın amacı homeostazisi yeniden oluşturmaktır. Fakat bu cevabın uzaması ve aşırı olması metabolizma ve katabolizmada artışa yol açar. Sonuçta mortalite ve morbidite artar. Akut faz cevabının mediatörleri interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerdir (9).

Amifostin (Ethyol, WR 2721), iyonize radyasyon ve kemoterapötik ajanlara karşı normal dokuların selektif geniş spektrumlu sitoproteksiyonunu sağlayan inorganik bir tiyofosfattır. Bu ajanlarla oluşan doku hipoksisini azaltır. Amifostin inaktif bir ön ilaçtır, dokuda membran alkalin fosfatazları ile metabolize edilir. Normal endotel hücrelerinde bulunan alkalin fosfatazlar ile defosforile edilerek aktif tiyole dönüşür. İlacın aktif metaboliti WR-1065' tir. Tümöral endotel ve stromal komponentlerde alkalin fosfatazın olmaması ilacın kanser tedavisindeki seçiciliğini sağlamaktadır. Amifostinin hücre koruyucu mekanizmaları serbest radikallerin azaltılması, DNA'nın korunması, onarımının hızlanması ve hücrel hipoksinin azaltılmasını içerir. Amifostin kalın barsak kanserlerinin karaciğer metastazlarının intraarteriyel kemoembolizasyonu sonrası oluşan serbest oksijen radikallerini önlemek için kullanılmış, karaciğer enzimlerinde düşme sağlamış, intraarteriyel hepatik kemoembolizasyonun terapötik oranına olumlu katkıda bulunmuştur (10).

Biz bu çalışmada; ratlarla oluşturulan yanık modelinde erken sıvı resusitasyonu (ESR) ve geç sıvı resusitasyonu (GSR) ile oluşan iskemi reperfüzyon hasarının, karaciğer üzerinde yarattığı oksidatif stresi ve Amifostin'in koruyucu etkisini görmeyi amaçladık. Çalışmanın sonucunda yanık sonrası karaciğerde gelişecek oksidatif stresin önlenmesinde klinik kullanımı ve güvenilirliği gösterilmiş bir ajan olan Amifostin (WR 2721)'i ilk defa deneysel bir modelde kullanmış oluyoruz. Bu durumda elde edilen sonuçların ışığında, bu ilaç karaciğerin merkezi rol oynadığı ÇOYS'nda koruyucu ajan olarak kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. YANIK TRAVMASI SONRASI OLUŞAN FİZYOLOJİK CEVAPLAR

Yanık travması sonrasında organizmada çok sayıda fizyolojik yanıt oluşur. Sıvı kompartmanları arasındaki dengenin değişmesi ile sistolik kan basıncı, diastolik kan basıncı ve nabız basıncı azalırken kalp hızı artar. Kalp debisinde ilerleyici bir azalma meydana gelirken kalp atım hacmi azalır. Yanık travması ile oluşan ilk fizyolojik yanıtlar atriyal gerilim reseptörleri, baroreseptörlerdeki değişiklikler ve kemoreseptör reflekslerin uyarılması ile sempatoadrenal yanıtların oluşması, kapiller düzeyde sıvı geri emiliminin oluşması, vazopressin gibi vazokonstrüktör mediatörlerin salınması ve periferik damar direncinde artmadır. Yanık travması ile oluşan metabolik olaylar ise metabolik asidoz, hiperventilasyon ve respiratuvar alkalozdur. Yanık travması sonrası hücresel enerji azaldığı için Na-K ATP'az enzimi etkilenir, hücre membran istirahat potansiyeli azalır ve hücre içerisinde sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve H_2O birikirken hücre içi potasyum (K^+)'da kayıplar meydana gelir (11-14).

Yanık travması sonrası gelişen sistemik inflamatuvar cevap metabolizmanın artmasına, proteinlerde azalmaya ve katabolizmada artışa neden olur. Hayati organların yapı ve işlevleri bozulur. Fizyolojik durumlarda karaciğer albumin, prealbumin gibi yapısal proteinleri sentezler. Travma sonrası ise karaciğer haptoglobulin, α_2 makroglobulin, α -1 asit glikoprotein, C-reaktif protein gibi akut faz proteinlerini sentezler. Karaciğerin bu tepkisi "hepatik akut faz cevabı" olarak bilinir. Bu tepkinin amacı organizmada homeostazisi yeniden oluşturmaktır (8,9,15,16).

Yanık travmasının dolaşım ve metabolizma üzerine etkilerinin yanısıra hücresel ve humoral bağışıklık sistemleri ve koagülasyon mekanizmaları üzerine de etkisi vardır (17).

Yanık travması deri bütünlüğünün bozulması sonucu enfeksiyona zemin hazırlarken aynı zamanda, buharlaşma ve üçüncü boşluklara olan sıvı kaybı nedeniyle çeşitli doku ve organlarda dolaşımı bozarak iskemiye de neden olmaktadır (18).

Yanık travmasına yaklaşım, hipovolemi ve periferik doku perfüzyonunu iyileştirmek amacıyla, intravenöz kristaloid solüsyonlarının verilmesidir. Kristaloid

desteğinin ortalama arteriyel kan basıncında ve kalp atım hacminde iyileşmeler yaptığı gösterilmiştir. Bunların sonucunda da dokulardaki mikrosirkülatuar perfüzyonun ve hücre sel defektlerin düzeldiği gösterilmiştir (14,19). Yanık travmasının karakteristik özelliği olan hemodinamik ve metabolik bozuklukların sıvı desteği yapılarak düzeltilmesine rağmen iki önemli sorun ortaya çıkar. Birincisi, fazla miktarlarda kristaloid desteğine rağmen doku iskemisi ve oksijen yetersizliğinin devam etmesidir. İkinci önemli sorun ise, daha önce iskemik olan dokulara sıvı desteği sonucu yeniden oksijen sunumuyla, serbest oksijen radikallerinin oluşması ve bunlarında ek doku hasarı meydana getirmesidir (20).

2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Moleküller dış yörüngelerinde çift olarak elektron bulundurlar. Elektronların bu paylaşılmış hali molekülü stabilize eder. Serbest radikal bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküldür. Bu yapıyla molekül dış yörüngesinde paylaşılmamış başka bir elektron ile çift oluşturabilmek için son derece reaktiftir, moleküler olarak dengesizdir. Serbest oksijen radikallerinin yarı ömürleri çok kısadır, bu nedenle ölçülmeleri zordur. Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi ile ölçülebilirler (21,22). Oksidatif fosforilasyon sırasında moleküler oksijen mitokondri içerisinde suya indirgenir. Yaklaşık olarak oksijenin %1-5'i bu dönüşümden kaçır ve toksik serbest radikalleri oluşturur. Normal hücre metabolizmasında da oluşabilecek bu serbest radikaller süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-) ve nitrik oksit (NO)'tir. Normal hücre metabolizmasında serbest radikal üretiminin diğer kaynakları pürin oksidasyonu, nötrofillerdeki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, prostaglandin ve lökotrienlerin oluşumunu başlatan araşidonik asitin yıkılmasıdır. Homeostazisi devam ettirmek için serbest radikalleri temizleyici endojen sistemler mevcuttur. Bunlar, serbest radikallerin üretimi ile temizlenmesi arasındaki dengeyi sağlamaya çalışırlar (20,23).

Yüzey alanı geniş yanık travması sonrası, periferik perfüzyonu iyileştirmek ve iskemik dokulara oksijen sunumunu arttırmak ve hücre fonksiyonlarını ve canlılığını devam ettirmek amacıyla sıvı replasmanı yapılır. Öncesinde iskemik kalmış dokuların perfüzyonu, organizma için zararlı olabilecek kaskadları tetikler. Yanık travması sonrası sıvı desteği ile oluşan serbest radikaller nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi çeşitli hücre komponentlerini etkiler. Devam eden hipoperfüzyon zaman içerisinde hücrenin

ölümü ile sonuçlanırken, hipoperfüzyonun düzeltilmesi iskemi-reperfüzyon hasarı yapar. Bu durum 'oksijen paradoksu' olarak ifade edilir (20).

2.3. TRAVMADA SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI

1968'de McCord ve Fridovich iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin asıl kaynağının ksantin oksidaz enzimi olduğunu öne sürdüler. Periferik perfüzyonun bozulması periferik dokulara oksijen sunumunu azaltır. Dokulardaki Adenozin Trifosfat (ATP) miktarı azalırken, Adenozin Monofosfat (AMP) artar ve bir dizi biyokimyasal reaksiyon sonucu hipoksantin yıkımı gerçekleşir. Sıvı resusitasyonu ve daha önceden iskemik olan dokulara oksijen sunumu hipoksantin ksantin oksidaz enzimi için substrat olmasına neden olur. Yine bir dizi kimyasal reaksiyon sonucu hipoksantin ksantine dönüşür. Bu süreç doku için zararlı serbest oksijen radikalleri olan süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^-) moleküllerinin oluşumuna neden olur. Oluşan bu ürünler endojen enzimlerin temizleme kapasitesinden daha fazladır (20).

Yanık travmasında serbest oksijen radikallerinin ana kaynağının şimdiye kadar ksantin oksidaz enzimi olduğu düşünülürken, günümüzde aktive nötrofillerden kaynaklandığı açıktır (12,24-26). Nötrofiller normovolemik bir kişide invaze bakterilerin ortadan kaldırılmasında koruyucu rol oynar fakat yanık travması sonrasında nötrofillerin oluşturduğu serbest radikaller ksantin oksidaz aktivitesini artırır ve doku hasarı meydana getirir.

Yanık travması serbest radikal üretimini arttırırken, antioksidan savunma mekanizmalarını da bozar ve yanıklı hastaları serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hücresel hasara daha yatkın hale getirir. Yanık travmasının enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarını bozduğu gösterilmiştir. α tokoferol, askorbik asit ve E vitamini düzeylerinde düşme olur.

Bu endojen antioksidan mekanizmalar hücre membranını lipid peroksidasyonundan korurken aynı zamanda serbest oksijen radikallerini de temizler. Yanık travması ayrıca enzimatik antioksidan savunma sistemlerini de bozar. Sonuçta süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon (GSH) seviyelerinde düşme görülür (27-34).

İskemi reperfüzyon hasarında birçok araştırmacı serbest oksijen radikalleri üzerine yoğunlaşmışken, son zamanlarda ilgi travma sonrası hücre aracılı hasarda aktive nötrofiller üzerine kaymıştır. Hücre içi adezyon molekülleri 1 ve 2 (ICAM-1 ve ICAM-2)'nin şokta ve iskemi reperfüzyon hasarında arttığı gösterilmiştir (26,35,36).

Reperfüze dokuya gelen nötrofil aktive olarak endotele daha fazla adezyon gösterme özelliğinde olup, oksijen metabolitleri ile birlikte proteolitik enzim sentezini arttırmalar (37). Esas etkileri, elastaz gibi proteolitik enzimlerin aktive olarak elastin yıkımı yapmasıyla ve HOCl ve H₂O₂ gibi toksik oksijen metabolitlerinin, trombosit aktive edici faktörün (PAF) ve sitokinlerin oluşumunu indüklemeleriyle gerçekleşir. Böylece mikrovasküler permeabilite artışına yol açarlar. Hasar için yalnızca nötrofil varlığı yetmez ayrıca endotele yapışmaları gerekir (38). Nötrofillerin vasküler endotele yapışmasını takiben ICAM-1 ve ICAM-2 molekülleri doku içine doğru göç ederler (12,25,26). ICAM-1 ve ICAM-2 gibi CD18'inde reperfüzyon hasarında önemli bir rol oynadığı ve bu proteinlere karşı gelişmiş antikorların enfarkt alanını sınırladığı gösterilmiştir (39,40,12,25,26). Ca'un hücre içi konsantrasyonunun yükselmesiyle IL-1, gama interferon (γ IFN) ve TNF- α , bu ligandları aktive ederek lökosit endotel adezyonunda daha da belirgin bir artışa neden olurlar (38,39). Nötrofil, CD18 ve ICAM-1 proteinlerinin endotele adezyonu, ekstrasellüler mikroçevreye H₂O₂ ve proteazların salınımı için güçlü bir sinyal oluşumuna neden olur (41,42).

Travma ve şok modelleri ile yapılan çalışmalarda Sialyl Lewis oligosakkaritlerinin selektin ligandlarından özellikle P, L ve E'yi düşük afinite ile bloke ettiği gösterilmiştir (43). Bu nedenle, lökosit adezyonu ve aktivasyonunda önemli rolleri olan spesifik adezyon moleküllerini inhibe eden farmakolojik ajanlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Spesifik olarak hedef adezyon molekülüne karşı olan farmakolojik ajanlar travma ve hasar modellerinde organların korunmalarını sağlamışlardır (20).

2.4. YANIK TRAVMASINDA NİTRİK OKSİT

Yanık travması, uyarılabilen nitrik oksit sentaz (iNOS) artışına neden olan inflamatuvar yanıtı neden olur.

Artmış iNOS aktivitesinin yanık sonrası gelişen hücresel hasara katkısı olduğu gösterilmiştir. Nitrik oksit (NO), iNOS enzimi aracılığı ile değil de yapısal NOS (eNOS) enzimi ile oluşursa organizmada olumlu etkiler yapar. Eğer NO organizmada düşük seviyelerde olursa periferik dolaşımda vazodilatatör etki yapar ve mikrosirkülasyonda trombosit ve nötrofil yapışmasını önler (20).

Yanık travması sonrası ilk birkaç saat içinde iNOS aracılı NO üretimi artar. NO'nin bu aşırı üretimi, birkaç mekanizma ile hücre hasarına neden olur. Birincisi aşırı periferik vazodilatasyona neden olarak vasküler dekompanasyon yaratırken, ikinci olarak da transkripsiyon faktör Nükleer Faktör kappa B (NF-κB)'yi arttırarak inflamatuvar sinyal yollarını uyarabilir ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikler (44,45). NO'nin süperoksit radikaller ile etkileşime girerek hasarı arttıran bir bileşik olan peroksinitrite dönüştüğünü gösteren çalışmalar vardır (46). Bu çalışmalarda iskemi-reperfüzyon esnasında peroksinitrit oluşumunun DNA'daki kırıkları arttırarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Bu süreç, nükleer enzim poli ADP riboz sentetaz (PARS)'in aktive olarak hücresel enerjiyi azaltması ve sonuçta hücre nekrozunun oluşumu ile sonuçlanır (47). PARS aktivasyonu sonucu Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD)'in azalması ile elektron transportu, ATP sentezi ve glikoliz bozulur. Şok ve resusitasyonda peroksinitritin zararlı etkileri, sülfidril gruplarının oksidasyonu, tirozin, triptofan ve guanin aminoasitlerinin nitrasyonu ve membran Na-K ATPaz'ının inhibisyonu ile olur (44,45).

2.5. TRAVMADA LİPİD PEROKSİDASYONU

Serbest radikallerin en zararlı etkisi lipid peroksidasyonudur. Hücre membranı poliansatüre yağ asidi ve fosfolipidlerden oluşur. Serbest radikaller, lipid peroksidasyonunu başlatarak yapısal ve fonksiyonel hücre hasarına neden olurlar. Peroksidasyonun son ürünü Malondialdehit (MDA)'tir ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılabilir (48). MDA, membran bileşiklerinin polimerizasyonu ve peroksidasyonu sonucu oluşur. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan bu ürün, kısa zincirli bir aldehittir ve poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif parçalanmasının tespitinde yararlanır. Yanık hasarında akciğer, karaciğer, böbrek ve kalp dokularında ve plazmada MDA seviyeleri artarken, lipid peroksidasyonu doku katalaz aktivitesi azalır (28,29,42,47,49,50).

Hücre membranlarının lipofilik iç kısmı, poliansatüre yağ asitleri (örneğin araşidonik asit) yönünden zengindir ve bu tip yağ asitlerindeki karakteristik düşük erime noktası, hücre membranlarındaki akışkanlıktan sorumludur. Oksidasyon, membran yağ asitlerinin erime noktasını artırır ve membran akışkanlığını azaltır. Sonuçta bu membranlar geçirgenlik özelliğini kaybeder ve osmotik parçalanmaya yatkın hale gelir (50).

Lipid membranlarının peroksidasyonunda reaksiyon serisi, hidroksil radikali gibi güçlü bir oksidanla başlar ve bir poliansatüre yağ asidindeki karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomunun tamamını ayırır. Bu şekilde karbon merkezli bir radikal oluşur ve bu da yeni bir reaksiyon serisi başlatan ve yanındaki bir yağ asidinden hidrojen atomu açığa çıkarabilen, oksijen merkezli bir peroksiradikale dönüşür. En son yayılma reaksiyonu, sürekli devam eden bir reaksiyon zinciri oluşturur ki, bu da yağ asidi yıkılıncaya veya yayılma reaksiyonu engelleninceye kadar devam eder (51,52). Yüksek reaktif hidroksil radikalleri, endoteldeki lipid bileşiklerinin peroksidasyonuna neden olarak, bazal membrandaki kollajen ve hyaluronik asit yapısının bozulmasına yol açarak membran ve kapiller bütünlüğünü bozar (53). Ayrıca peroksidasyon sonucu intrinsik membranda deformiteler, iyon transport bozuklukları, enzim aktivitesinde bozukluklar ve hücre yüzeyindeki bileşiklerin agregasyonu görülür (54).

2.6. OKSİDATİF STRES, YANIK TRAVMASINDA İNFLAMATUVAR SİTOKİN CEVABINI BAŞLATIR

Travmaya uğramış veya enfeksiyon gelişen hastalarda oluşan hemodinamik, metabolik ve immün yanıtlar kısmen endojen sitokinler tarafından yönlendirilmektedir. Sitokinler, özelleşmiş dokular tarafından sentezlenen ve etkilerini endokrin yollar aracılığı ile gösteren katekolaminler ve glukokortikoidler gibi klasik hormonal mediatörlerden farklı olarak, yaralanma bölgesindeki çeşitli hücre grupları ve immün hücreler tarafından oluşturulur. Sitokin aktivitesi primer olarak hücreler arası etkileşim sonucunda ortaya çıkar (parakrin etki).(55)

Sitokinler, etkilerini düşük konsantrasyonlarda gösterebilen küçük polipeptid veya glikoproteinlerdir. Monomerik formda, çoğunun ağırlığı 30 kDa'un altındadır. Biyolojik olarak aktif formlarında bu sitokinlerden bazıları (örneğin, trimerik TNF- α) yüksek molekül ağırlıklı oligomer olarak fonksiyon yaparlar. Sitokinlerden çoğunun klasik

hormonlardan bir farkı da preforme molekül olarak depolanmamalarıdır. Travmayı takiben hemen ortaya çıkarlar (55).

Sitokinler etkilerini spesifik hücre reseptörlerine bağlanarak ve gen transkripsiyonunu modüle eden hücre içi mekanizmaları aktive ederek gösterirler. Bu mekanizma ile sitokinler immün hücrelerin yapımını, farklılaşmasını ve hayatta kalımlarını etkiler. Bu mediatörler inflamatuvar yanıtı arttıran (proinflamatuvar) veya azaltan (antiinflamatuvar) diğer sitokinlerinde yapımını ve fonksiyonlarını düzenlerler. Sitokinlerin çeşitli hücre gruplarını aktive etme ve değişik yanıtlar oluşturma kapasitesi, inflamatuvar mediatörlerin pleitropizmine işaret eder. Farklı sitokinlerin aktiviteleri birbirinin üzerine eklenerek daha güçlü etki de oluşabilir. (55)

Sitokinler enfeksiyonlara (bakteriyel, viral ve fungal) ve travmaya karşı olan inflamatuvar yanıtı yönlendiren ve aktif olarak yara iyileşmesini destekleyen moleküllerdir. Bu yanıtların oluşma belirtileri; ateş, lökositoz, kalp ve solunum hızında değişikliklerdir. Septik şokun karakteristiği olan hemodinamik dengesizlikten de proinflamatuvar sitokinlerin ani ve abartılmış yapımı sorumludur.(55)

Travmaya uğrayan hastalarda kronik dönemde sitokinlerin aşırı yapımı, kas güçsüzlüğü ve kaşeksi gibi metabolik değişikliklerden de kısmen sorumludur. Ciddi travmaya uğramış veya enfekte hastalarda, ÇOYS gelişiminde ve geç mortalite üzerinde de sitokinlerin etkisi vardır. Ortada antiinflamatuvar sitokinlerin bulunması bu abartılı yanıtların gelişmesini azaltır. Antiinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı ise hastada immün yetmezlik gelişimine ve bunun sonucunda da enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artmasına neden olabilir (55).

Serbest oksijen radikalleri gibi reaktif biyokimyasal maddelerin ve H₂O₂, NO gibi maddelerin birikimi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin salınımı gibi önemli inflamatuvar cevapları başlatır.

Araştırmalar bu inflamatuvar mediatörlerin hücre hasarı yaptığını göstermiştir (56,57,36). Yanık sonrası gelişen ÇOYS'nda, proinflamatuvar mediatör sentezinin regülasyonunda NF-κB'nin önemli rolü vardır (58-60).

Yanık travması, NF- κ B'nin nükleer translokasyonunun etkili olduğu reaksiyonları başlatır ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırır (61). Uyarılmamış hücrelerde bu transkripsiyon faktörü inhibitör protein κ B (I κ B)'ye bağlı latent sitoplazmik kompleks şeklinde bulunur. Serbest oksijen radikalleri I κ B'nin fosforilasyonu ve degradasyonuna yol açarak sinyal kaskadını başlatır. Bunların sonucunda NF- κ B serbest kalır. NF- κ B daha sonra nükleusa transloke olur ve TNF- α gibi sitokinlerin sentezini uyarır (62,63).

Travmaya yanıt olarak aktive olan sitokin döngüsü, fizyolojik düzenleyici mekanizmalar üzerine farklı etkileri olan kompleks bir ağdan meydana gelir. Sitokinler hastanın travmaya karşı oluşacak yanıtını belirleyen önemli faktörlerdendir. Oluşturdukları immünobiyolojik değişikliklerin anlaşılması cerrahi hastalara yaklaşımda önemli yararlar sağlayabilir. Şimdiye kadar yaklaşık 30 farklı sitokin tanımlanmıştır fakat bu mediatörlerin pleiotropik ve karşılıklı etkileşimleri nedeniyle ne fonksiyonları ne de oluşturdukları yanıtlar tam olarak anlaşılabilmiştir.

İskemi reperfüzyon hasarında önemli olan sitokinler TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve γ IFN'dur.

TNF- α : Doku travması sonucunda, makrofaj ve diğer proinflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu takiben kanda ilk tespit edilen sitokinlerdendir. Travma sonrası konak yanıtının oluşmasında ilk ve en etkili mediatörlerden biridir (55). TNF- α 'nın yanık hasarını takip eden erken ve geç dönemlerde yükseldiği gösterilmiştir (7). Travmaya yanıt olarak TNF- α salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Yarı ömrü çok kısa olmasına rağmen önemli hemodinamik ve metabolik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısımlarındaki sitokinlerin salınımına neden olur. TNF- α 'nın ortamda çok artmasını engelleyen efektif endojen mediatörlerde vardır (55).

TNF- α makrofajlar, kupfer hücreleri, Polimorfonükleer lökositler (PMNL), doğal öldürücü (NK) hücreler, astrositler, endotelial hücreler ve T hücreleri tarafından salınır (55). Fizyolojik etkileri; ateş, baş ağrısı, anoreksi, adrenokortikotropik hormon (ACTH) seviyesinde artış, hiperkortizolemi, plazma nitrit ve nitrat seviyelerinde artış, sistemik hipotansiyon, nötrofili, akut faz proteinlerinde artma, IL-6 ve IL-8'de artış, koagülasyon kaskadının aktivasyonu, pulmoner ödem ve hepatosellüler hasardır (64).

IL-6: Akut travma ve stres sırasında IL-6'nın kan düzeyi yükseldiğinden genellikle sistemik inflamatuvar yanıt veya postoperatif morbidite indikatörü olarak kullanılır. IL-6'nın esas uyarıcıları TNF- α ve IL-1'dir. IL-6 bütün hücre tipleri tarafından sentezlenebilir. Travmadan sonraki 60 dakika içinde dolaşımdaki düzeyi ölçülebilir, 4-6 saatte pik yapar ve dolaşımda kalma süresi on güne kadar uzayabilir. Ölçülebilirliğinin kolay olmasının nedeni göreceli olarak daha uzun bir yarı ömrü olmasıdır.

IL-6, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar aktivitelerin mediatörlüğünde kompleks bir role sahiptir. IL-1 ve IL-6 travma sırasındaki hepatik akut faz protein yanıtının önemli mediatörlerindedir ve C-reaktif protein, fibrinojen, haptoglobülin, α -1 antitripsin ve kompleman yapımını da arttırdıkları sanılmaktadır. IL-6'nın travma sırasındaki antiinflamatuvar döngü üzerinde de çeşitli mekanizmalar aracılığı ile mediatör etkisi vardır. IL-6'nın kaynakları; T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, endotel hücreler, fibroblastlar, astrositler ve hepatositlerdir (55).

IL-8: IL-8 aktivitesi travmayı takiben IL-6 ile ilişkilidir ve ÇOYS gelişiminin göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir. IL-8, TNF- α ve IL-1 için karakteristik olan hemodinamik dengesizliğe neden olmaz. Kaynakları; makrofajlar, endotel hücreler, T hücreleri ve trombositlerdir. Etkileri; yaralanma bölgesine PMNL, lenfositler ve makrofajların kemotaksisi, PMNL degradasyonunda artış ve PMNL ile endotel arasında bağlanmayı sağlayan adezyon molekülleri olan CD11 ve CD18'in düzeylerinde artıştır (55).

2.7. GSH

GSH sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan en önemli mekanizmalardan biridir. GSH, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardan birisidir. (65,66). Hücre içi GSH, antioksidan olarak bulunan en güçlü tiyol bileşimidir. GSH, oksidatif stresin bir şekilde engellenmesi ve daha az hasarın oluşmasına yardımcı olabilir (67,68). Septik şokta GSH düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir ve hücre içi GSH depolarının azalması ile birlikte mortalite oranlarında da artış görülmektedir (69).

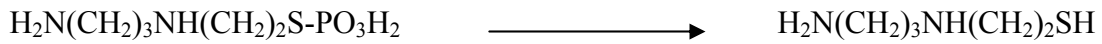
Glutasyon peroksidaz (GP) enzimi, GSH'dan elektronları ayırarak hidrojen peroksiti suya dönüştüren selenyuma bağlı sیتoplazmik bir enzimdir (48).



Endojen ya da ekzojen olarak oluşan radikaller, GSH düzeyini azaltmakla birlikte, ek olarak GSH metabolizmasına bağlı enzimlerin aktivitesini inhibe ederek, pulmoner alveolar makrofaj fagositozunu bozar ve lökositlerin kemotaksisini inhibe ederek oksidanlar tarafından hasarın ilerlemesine neden olurlar. GP'ın H₂O₂'e bağlı hücre hasarında hücreyi koruyucu etkisinin katalazdan daha fazla olduğu bilinmektedir. Sیتozolde bulunan E vitamini gibi GSH'a bağlı enzimler, lipid peroksidasyonunu engellerler. GP, yağaçıl hidroksiperoksitlerin alkole bağlanmasını azaltarak peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunu sağlar. Glutasyon, redüktaz enzimi ile redükte glutasyon haline geçer. GP'ın antioksidan aktivitesi göstermesi, hücre içinde yeterli konsantrasyonda glutasyon redüktaz, GSH ve NADPH bulunmasına bağlıdır (70,71).

2.8. AMİFOSTİN

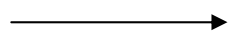
Amifostin (WR-2721, Ethyol®, 2-[(3 – aminopropyl) amino] etilfosforothioik asit 214 kDa molekül ağırlığında bir inorganik tiyofosfattır. Bu ilaç ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri ordusunda savaşlarda askeri avantaj sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Daha sonra tıbbi araştırmalarda kullanılmıştır. WR-2721 aktif olmayan bir ön ilaçtır. Dokularda hücre membranlarına bağlı alkalen fosfataz enzimi ile defosforilasyonunu takiben, aktif metaboliti olan WR-1065 (2-[aminopropyl-amino] etantiyol)'e çevrilir (10) (Şekil1).



WR-2721

Alkalenfosfataz

WR-1065



WR-1065

Oksidasyon

WR-33278

Şekil 1. Aktif olmayan WR-2721'in aktif metaboliti WR-1065'e dönüşümü. WR-1065 'in WR-33278'e oksidasyonu (10).

Tiyol grubu primer olarak iyonize radyasyon veya antrasiklinler, bleomisinler, biyoredüktif bileşikler gibi kemoterapötik ajanların meydana getirdiği serbest oksijen radikalleri için temizleyicidir. WR-1065'de disülfit molekülüne (WR-33278; N, N'' – (dithiodi-2, 1-ethanedil)bis-1,3-propanediamin) metabolize olur (10) (Şekil 1).

Hayvan deneyleri ile ilk yapılan askeri çalışmalarda Amifostin'in iyonize radyasyona karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Daha sonraları yine hayvan çalışmalarında amifostinin radyasyona maruz kalan deri, mukoza, saç folikülleri, intestinal duvar, tükürük bezleri ve gelişmekte olan kıkırdaklara karşı koruyucu etkisi olduğu da gösterilmiştir (10,72). En fazla koruyucu olduğu dokular endotelyum, tükürük bezleri, bağ dokusu ve spermatogonal hücrelerdir. Koruyuculuğu nispeten düşük olan dokular ise akciğerler, böbrekler, özefagus, ince barsak ve kolondur.

Amifostinin lökomogenezis ve karsinogenezise karşı koruyucu etkisi deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Amifostin radyasyon veya platinyum, nitrozüre ve bleomisin gibi kimyasallarla meydana gelen Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) geninin mutasyonunu da önler (10,73). İn vitro çalışmalarda radyasyona maruziyetten önce veya sonrasında WR-1065 verilmesi ile hücre dizilerinde transformasyon önlenmiştir (10). Kemoterapi veya kombine kemoradyoterapi sonrası gelişen sekonder malignansiler oldukça sıktır. Amifostinin radyoterapi ve kemoterapinin olumsuz etkilerini önlemesinin yanında karsinogenezise karşı koruyucu etkisinin olması kanser tedavisi gören uzun yaşam beklentisi olan hastalarda önemlidir. Farelerle yapılan in vivo çalışmalarda tek doz 35-37 Gy radyasyon öncesi 400mg/kg amifostin verilmesinin bacak fibrosarkomunun gelişimini önemli düzeyde azalttığı gösterilmiştir (10,74).

Yetmişli yılların sonunda amifostinin alkilleyiçi ajanların, antineoplastik etkilerini değiştirmeden toksisitelerini azalttığı gösterilmiştir. 1980-82 yılları arasında hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalarda amifostinin, sisplatinin renal toksisitesini azalttığı gösterilmiştir. 1988'de amifostinin siklofosamid ile kombine edilmesiyle pulmoner toksisitede azalma olduğu görülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda doksorubisinin kardiyak miyozitler üzerindeki yan etkilerinin de amifostin ile azaldığı gösterilmiştir (10).

2.8.1. AMİFOSTİNİN HÜCRE KORUYUCU MEKANİZMASI

Amifostinin hücre koruyucu mekanizması oldukça karmaşıktır. WR-2721 inaktif ön ilaç iken, aktif metaboliti WR-1065 iyonize radyasyon veya kimyasalların meydana getirdiği serbest oksijen radikallerine karşı güçlü bir temizleyicidir. Örneğin antrasiklin ilişkili kardiyotoksisitenin en önemli sebebi olan süperoksit anyonlar WR-1065'in tiyol grupları ile inaktive edilir (10,75). Radyasyonun DNA'da meydana getirdiği kırıklar WR-1065 ile önlenir. Ayrıca WR-1065, alkilleyici ajanların NH₂ grupları ile meydana gelen DNA çapraz bağlanmalarının miktarını da azaltır (10,76).

Amifostinin simetrik disülfiti olan WR-33278'e oksidasyonu amifostin metabolizmasında gerçekleşen bir süreçtir. WR-33278 yapısal olarak poliamin spermine benzer ve DNA'ya bağlanır. Bu bağlanma sonucu sitotoksik ajanlar ile oluşan DNA hasarı önlenir. Radyasyon uygulamasını takiben hücre dizilerinin WR-1065 ile inkübasyonu sonrası hücrelerin apoptotik hızlarının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (77). Bu mekanizma henüz tam olarak netleşmemekle birlikte, bazı çalışmalar WR-33278'in topoizomeras 1 ile birlikte çalışarak DNA'nın onarım sürecine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. WR-33278'in önemli bir rolü de hücrel transformasyonu önlemesidir (10).

2.8.2. HÜCRE KORUYUCU ETKİNİN SEÇİCİLİĞİ

Klinik onkolojide, terapötik indeks=kontrol edilen tümör / normal dokuda meydana gelen komplikasyonlar olarak ifade edilir. Hücre koruyucu ajanların terapötik indeksi arttırmaları, paydayı yani normal dokularda olan komplikasyonları azaltmalarına bağlıdır. Hücre korunmasında seçicilik kritik bir özelliktir. Tümörün korunması halinde pay sabit kalacak dolayısıyla da terapötik indeks azalacaktır. Seçici olmayan hücre koruyucu ajanların kullanımı klinik açıdan sakıncalıdır. Çünkü kansere karşı olan tedavinin de etkinliğini azaltırlar (10).

Tümörlerin kanlanması iyi olmadığı ve nekrotik alanlar içerdiği gayet iyi bilinir. Azalmış kan akımı nedeniyle amifostinin tümör ortamına ulaşması zordur. Bu da hücre koruyucu etkinin seçiciliğinin mekanizmalarından birisidir (10).

Normal dokulara göre tümördeki alkalen fosfataz (ALP) eksikliğinden dolayı, amifostinin tümör ortamında aktif metabolitine dönüşmemesi diğer bir seçici özelliğini oluşturur. Tümörlerde ALP kaybının nedeni bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada immünohistokimyasal yöntemlerle tümör dokularında ve normal dokularda ALP ekspresyonu değerlendirilmiş; tümöral damarlardan ve tümör stromasının fibroblastlarından eksprese edilen ALP'da belirgin bir kayıp görülmüştür (10,78).

Glikolitik yolların aktivasyonu ile oluşan asidik tümör ortamı, ALP ekspresyonunun kaybının bir nedeni olabilir (79-80).

Tümör ortamının asidik olması, alkalen ortamda hidrolize olan WR-2721 için bir diğer seçicilik mekanizmasıdır. Yapılan çalışmalarda kanser hücresinde WR-2721'in alınımının düşük olduğu görülmüştür. Normal hücreler WR-2721'i aktif olarak absorbe ederlerken, kanser hücrelerinde bu süreç pasif olarak gerçekleşir (10).

2.8.3. AMİFOSTİNİN FARMAKOKİNETİĞİ

Amifostinin standart verilme yolu intravenöz (iv)'dir. Bununla birlikte subkutan (sc) verilmesi de son zamanlarda ilgi alanı olmuştur.(81) Amifostinin verilmesinden hemen sonra alkalen fosfatazlar hızlıca ön ilaç WR-2721'i aktif tiyol metaboliti olan WR-1065'e hidrolize ederler. WR-1065'te simetrik disülfidi olan WR-33278'e okside olur. WR-33278 DNA'nın histonik olmayan bölgelerine bağlanır. ALP ile WR-2721'in defosforilasyonu optimal alkalen koşullarda olur (optimal pH 9.0). Asidik ortamda WR-2721 defosforile olamaz, alkalen fosfatazın plazma konsantrasyonu transformasyon için yeterli değildir. Defosforilasyon primer olarak normal dokuda ve özellikle normal endotelde olur. Kültür ortamlarına ALP'nin eklenmesiyle WR-1065'in hücre içi birikimi hızla artmakta ve amifostinin hücre koruyucu etkisini arttırmaktadır. Alkalen fosfatazı kodlayan dört farklı gen vardır. Bu genlerden üç tanesi ikinci kromozomda bulunur ve intestinal, plasental ve plasenta benzeri ALP'ı kodlar. Dördüncü gen ise birinci kromozomda bulunur, karaciğer, böbrek ve kemik ALP'ını kodlar. Hem karaciğer hem de intestinal tip alkalen fosfatazlar WR-2721'i hidrolize edebilirler. Karaciğer tipi enzimin varlığında bu hidroliz daha hızlı gerçekleşir. İlacın verilmesinden hemen sonra maksimum konsantrasyona bir dakika içinde erişilir. WR-2721'in yarılanma ömrü 0.88 dakikadır ve hızla plazmadan kaybolur. İlaç verildikten altı dakika sonra plazmada %5'inden azı bulunur. WR-1065'in

konsantrasyonu bir dakika içinde 22 µmol/L'ye ulaşırken, WR-2721'inki verilişinden 4 dakika sonrasında 8 µmol/L olur. Amifostinin iv enjeksiyonu sonrası WR-33278'in plazma seviyesi bir dakika içerisinde 11 µmol/L'ye ulaşırken, üç dakika sonra 7 µmol/L olur. Verilen ilacın ve metabolitlerinin ancak %2.2'si idrarda saptanır. Bu durum ilacın ve metabolitlerinin %90'ından fazlasının hücre içerisine girdiğini gösterir (10).

WR-2721'in deney hayvanları ile yapılan farmakokinetik çalışmaları, amifostinin tüm dokularda hızla dağıldığını ancak kan beyin bariyerini iyi geçemediğinden beyin dokusunda çok düşük miktarlarda saptandığını göstermiştir (10). Plazenta bariyerini ise kolaylıkla geçebilir. Amifostin sc olarak da uygulanabilir. Sc uygulamanın iv uygulamaya göre daha basit olması ve hipotansiyon oluşturmaması gibi avantajları vardır.

AMİFOSTİNİN YAN ETKİLERİ:

Bulantı, kusma

Hipotansiyon (iv yol)

Asteni

Ateş yükselmesi

Allerjik reaksiyonlar (sc yol ile uygulamada)

Hipoglisemi

Serum kalsiyum seviyelerinde azalma.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMA YERİ VE ORTAMI

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Araştırma Ünitesi'nde yapılmıştır. Çalışmada ağırlıkları 183-301 gr arasında değişen 36 adet Wistar Albino dişi rat kullanılmıştır. Denekler çalışmaya başlamadan bir hafta önce üretim merkezinden araştırma merkezine getirilerek ısısı sabit olan ortamda (22 °C) 12 saat gündüz ve 12 saat gece ortamında tutularak ve standart rat yemi verilerek deneye hazırlandı. Deneyde kullanılacak ratlar işlemden 12 saat önce anestezi alacakları için aç bırakıldı.

3.2. ARAŞTIRMA TİPİ

Deneyel çalışma protokolü, Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu ve Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından etik ve bilimsel yönden onaylandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan ratlar Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilmiştir.

3.3. ANESTEZİ

İşlem öncesi bütün ratların anestezisi, 50mg/kg ketamin hidroklorür ve 7mg/kg xylazine hidroklorit'in aseptik şartlarda intraperitoneal verilmesiyle sağlandı.

3.4. ARAŞTIRMA GRUPLARI

Deneyel çalışma herbiri rastgele seçilen 6 rattan oluşan 6 grup üzerinden yapıldı.

GRUP 1: Yanık oluşturulmamış ve amifostin verilmemiş grup (kontrol grubu)

GRUP 2: Yanık oluşturulmadan sadece amifostin verilen grup

GRUP 3: %30 yanık oluşturulan, ESR yapılan grup.

GRUP 4: %30 yanık oluşturulan, GSR yapılan grup.

GRUP 5: %30 yanık oluşturulan, ESR yapılan ve amifostin verilen grup.

GRUP 6: %30 yanık oluşturulan, GSR yapılan ve amifostin verilen grup.

3.5. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

Yanık işlemi yapılacak tüm ratlar 12 saatlik açlık periyodunu takiben ketamin ve xylazin hidroklorit ile intraperitoneal olarak anestezi aldıktan sonra, sırtları tıraş edildi. Pirinç levha bek aletinde ısıtıldıktan sonra deriye temas ettirilerek yanık oluşturuldu. ESR yapılacak gruplara, 40 ml/kg ringer laktat yanık işleminden hemen sonra intraperitoneal olarak verildi (82). GSR yapılan gruplara 40ml/kg ringer laktat yanık işleminden 24 saat sonra intraperitoneal olarak verildi. Amifostin uygulanan gruplara ilaç yanık işleminden 24 saat sonra 200mg/kg başlangıç dozunda sc olarak verildi. Daha sonra ise sakrifiye edilinceye kadar sc 50mg/kg dozunda idame olarak verildi(81). Tüm yanık uygulanan gruplara işlemden altı saat sonra standart rat yemi ve su verildi ve bu gruplardaki ratlar yanık işleminden sonra beşinci gün sakrifiye edildi. Ayrıca 0.02mg/kg fentanil subkutan yanık işleminden altı saat sonra bir daha verilmemek üzere tek doz uygulandı. Yanık oluşturulmadan amifostin verilen gruptaki ratlara birinci gün xylazinhidroklorit ve ketamin anestezi verildikten altı saat sonra 0.02mg/kg fentanil verildi. Anestezi aldıktan 24 saat sonra tıpkı yanık oluşturulan gruplara verilen miktarlarda ve zamanlarda amifostin uygulandı ve beşinci gün sakrifiye edildi. Hiç yanık oluşturulmamış ve amifostin verilmemiş gruba birinci gün fentanil ve xylazinhidroklorit anestezi verildikten sonra tüm gruplara uygulanan ilaçlar aynı miktar ve zamanlarda plasebo olarak verildi ve beşinci gün sakrifiye edildi. Yanık oluşturulmamış gruplardaki ratlara anestezi işleminden altı saat sonra yem ve su verildi.

3.6. ARAŞTIRMA PARAMETRELERİ

Araştırmada tüm gruplarda portal venden alınan kanlardan TNF- α , IL-6 ve IL-8, total bilirubin, AST (Aspartat aminotransferaz), ALT (Alanin aminotransferaz), ALP, total protein, albumin çalışılmıştır. Yine tüm gruplarda karaciğer dokusunda MDA ve GSH düzeyleri değerlendirilmiştir.

3.7. YANIK MODELİ

İşlem öncesi ratlar tartıldı ve aşağıdaki formül ile %30'luk yanık için gereken yüzey alanı hesaplandı.

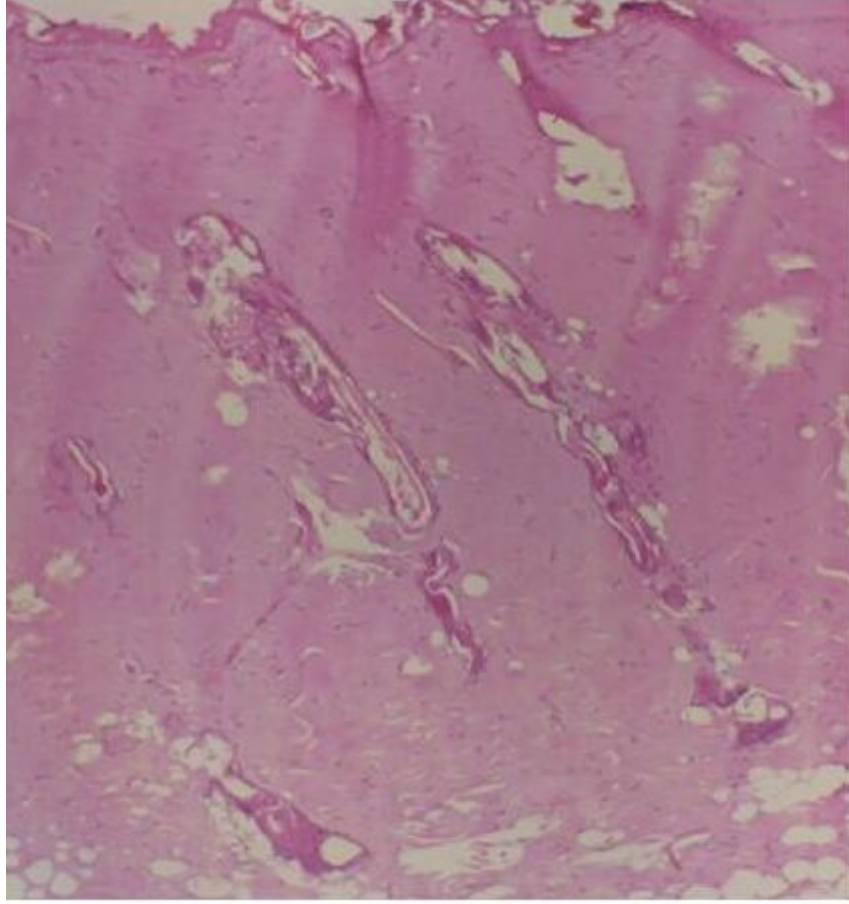
$$\text{Total vücut yüzey alanı} = 9.1 \times W^{2/3}$$

W= gram cinsinden ağırlık.

Anestezi sonrası ratların sırtları tıraş edildi. Planlanan yanık yüzdesi genişliğindeki pirinç plaka bek aletinde iki dakika ısıtılıp on saniye deriye temas ile üçüncü derece yanık oluşturuldu (Resim1). Yanık yapılan gruplar araştırma modeline uygun olarak 40ml/kg ringer laktat ile desteklendi. Yanık derinliğinin üçüncü derece olduğu Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda histopatolojik olarak doğrulanmıştır (Resim2).



Resim1. Ratlarda yanık modelinin oluşturulması



Resim 2. Histopatolojik olarak gösterilen üçüncü derece yanıktan bir kesit

3.8. DOKU VE KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Bütün ratlarda doku ve kan örnekleri yanık oluşturulduktan beş gün sonra ve yanık uygulanmamış gruplardaki ratlarda anestezi verildikten beş gün sonra alınmıştır. Kan ve doku örnekleri alınmadan önce bütün ratlara ketaminhidroklorür ve xylazinhidroklorit intraperitoneal olarak verilmiş ve laparotomi yapılmıştır. Önce portal venden kan örnekleri alınmıştır (Resim3). Daha sonra hepatektomi ile karaciğer dokusu örnekleri alınmıştır. Karaciğer dokusu +4 °C derecedeki serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra soğuk zincir prensiplerine uygun olarak küçük kesitlere ayrıldıktan sonra ependorf tüpleri içerisine konmuş ve incelemeye alınana kadar -86 °C'de saklanmıştır. Portal venden alınan kan örnekleri 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan serum ependorf tüplerine alınmıştır. Örnekler inceleneceği zamana kadar -86 °C'de saklanmıştır. Portal venden

alınan kan örneklerinde IL-8, IL-6, TNF- α ve KCFT Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda incelenmiş ve bilgi formuna her bir rat için bu değerler kaydedilmiştir. Karaciğer dokusunda bakılan MDA ve GSH Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Bağlıca Kampüsü Biyokimya Laboratuvarı'nda incelenmiş olup bilgi formuna her bir rat için bu değerler kaydedilmiştir.



Resim 3. Portal venden kan örneğinin alınması

3.9. DOKU MDA ve GSH ANALİZİ

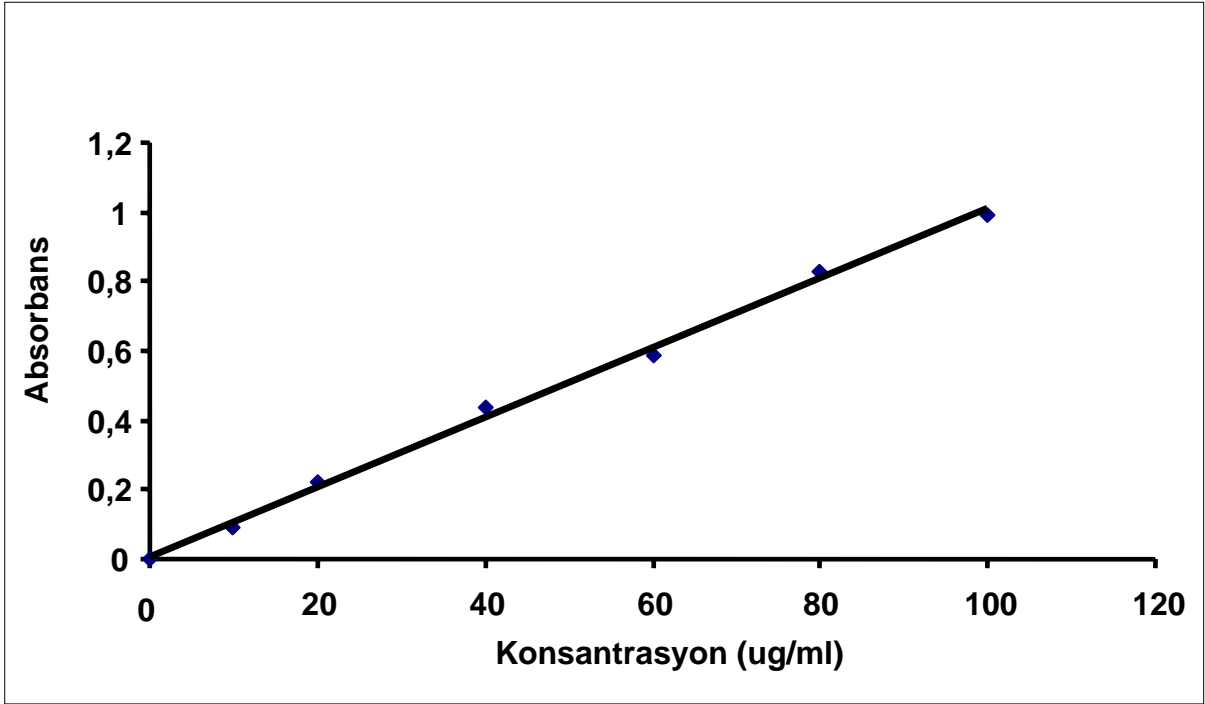
Karaciğer sol lobundan alınan doku örnekleri biyokimyasal analizler yapılınca kadar -86°C’de saklandı. Tüm biyokimyasal analizler çift çalışma şeklinde gerçekleştirildi.

Doku örneklerinde MDA ve GSH analizleri için karaciğer doku homojenatları soğukta 0,15 M KCl içinde (%10, w/v) cam homojenizatör kullanılarak hazırlandı.

Lipid peroksidasyon belirteci olarak doku MDA derişimi Beuge ve Aust tarafından tanımlanan tiyobarbitürik asit reaksiyonu (TBARS) yöntemine göre analiz edildi (83). Bu yöntemde göre bir hacim doku homojenat örneğinin iki hacim stok reaktif (0,25 N HCl içinde %14 trikloroasetik asit ve % 0,375 tiyobarbitürik asit içeren) ile reaksiyona girmesi sonrasında hazırlanan reaksiyon karışımları 15 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildikten sonra soğutulup, 1000g’de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatantların absorbansı spektrofotometrik olarak 535 nm’de reaktif körü’ne karşı ölçüldü (Shimadzu 1600). Molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanan sonuçlar nmol MDA/gram doku olarak ifade edildi.

Doku homojenatlarında redükte glutatyon (GSH) düzeyleri Ellman tarafından tanımlanan sülfidril grup analizi prensibine göre tayin edildi (84). Bu yöntemde örneklerin deproteinizasyonu sonrasında Ellman’ın renk reaktifi (%40 DTNB, w/v %1 sodyum sitrat içinde) ile supernatantların reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin absorbansı 412 nm’de reaktif körü’ne karşı spektrofotometrik olarak hemen ölçüldü. GSH derişimleri GSH kalibrasyon eğrisi (Şekil 2) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol GSH/mg protein olarak ifade edildi.

Doku homojenatlarında protein analizi Lowry ve arkadaşlarının yöntemine göre gerçekleştirildi (85). Bu yöntem proteinlerdeki peptid bağlarının alkali ortamda Cu^+ oluşturmak üzere Cu^{++} ile reaksiyona girmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan kupröz iyonlar (Cu^+) Folin reaktifi ile reaksiyona girerek fosfomolibdotungstatı bakır katalizli aromatik amino asit oksidasyonu yolu ile heteromolibden mavisine indirgemektedir. Reaksiyon sonrası oluşan renkli kompleksin absorbansı 550 nm’de reaktif körü’ne karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Protein derişimleri standard kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg/ml olarak ifade edildi.



Şekil 2. GSH Kalibrasyon Eğrisi

3.10. TNF- α , IL-6 ve IL-8 ANALİZİ

Portal venden alınan kan örnekleri 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan serum ependorf tüpüne alınıp analiz edilinceye kadar hemen -86°C 'de saklanmıştır.

TNF- α Biosource (Nivelles Belgium) KRC 3011 katalog numaralı kit ile, IL-6 Biosource (Nivelles Belgium) KRC 0061 katalog numaralı kit ile, IL-8 Biosource (Nivelles Belgium) KRC 1022 katalog numaralı kit ile ELISA yöntemi ile değerlendirildi. ELISA plateleri Başkent Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Denley marka Well scan model ELİSA okuyucusunda 450 nm(nanometre) dalga boyunda okutulmuştur.

3.11. KARACİĞER FONKSİYON TESTLERİNİN ANALİZİ

Portal venden alınan kan örnekleri, 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan serum ependorf tüpüne alınıp analiz edilinceye kadar hemen -86°C 'de saklanmıştır.

Albumin analizi, Brom Cresol Green (BCG) yöntemiyle Roche marka pp modüler model otoanalizör (Meinheim- Germany) ile Roche diagnostik kiti kullanılarak yapılmıştır. Değerler (gr/dl) olarak ifade edilmiştir.

Total protein analizi, kolorimetrik yöntemle Roche marka pp modüler model otoanalizör (Meinheim- Germany) ile Roche diagnostik kiti kullanılarak yapılmıştır. Değerler (gr/dl) olarak ifade edilmiştir.

Total bilirubin analizi, kolorimetrik DPD yöntemle Roche marka pp modüler model otoanalizör (Meinheim- Germany) ile Roche diagnostik kiti kullanılarak yapılmıştır. Değerler (mg/dl) olarak ifade edilmiştir.

AST, ALT, ALP analizleri, kinetik yöntemle Roche marka pp modüler model otoanalizör (Meinheim- Germany) ile Roche diagnostik kiti kullanılarak yapılmıştır. Değerler (U/L) olarak ifade edilmiştir.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırma bulgularının istatistiksel analizi SPSS 9.0 paket programı ile yapılmıştır. İstatistiksel analizde merkezi dağılım ölçütleri olan ortalama ve standart sapmalar hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar ANOVA (varyans analizi) ile belirlenmiştir. Farkların hangi gruplar arasında olduğu POST-HOC Duncan testleri ile değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

Tablo 1. Portal venden alınan kan örneklerinde Karaciğer Fonksiyon Testleri'nin değerleri ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

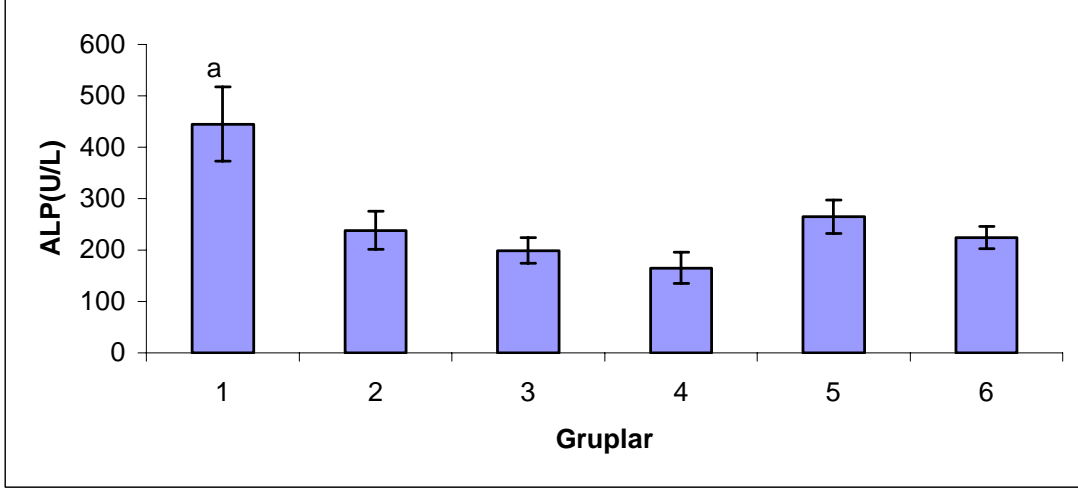
Grup	Alb (g/dl)	Glob (g/dl)	T. Pr (g/dl)	T. Bil (mg/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)
1	3.71 \pm 0.051	3.27 \pm 0.131	6.99 \pm 0.157	0.05 \pm 0.003	63.83 \pm 3.291	79.83 \pm 6.172	444.67 \pm 72.237
2	3.64 \pm 0.135	3.20 \pm 0.106	6.84 \pm 0.144	0.09 \pm 0.007	46.83 \pm 5.546	75.50 \pm 10.401	238.33 \pm 37.150
3	3.35 \pm 0.169	2.95 \pm 0.128	6.29 \pm 0.890	0.05 \pm 0.010	62.67 \pm 11.392	109.00 \pm 18.988	199.17 \pm 25.274
4	2.42 \pm 0.651	2.87 \pm 0.506	5.29 \pm 0.837	0.1 \pm 0.063	37.83 \pm 8.738	109.83 \pm 50.251	165.50 \pm 30.303
5	3.02 \pm 0.126	3.55 \pm 0.367	6.53 \pm 0.380	0.087 \pm 0.038	118.17 \pm 55.046	216.17 \pm 104.256	264.67 \pm 32.060
6	3.40 \pm 0.150	2.73 \pm 0.141	6.13 \pm 0.124	0.09 \pm 0.015	46.17 \pm 3.478	83.00 \pm 9.041	223.83 \pm 21.677

Tablo 2. Portal venden alınan kan örneklerinde TNF- α , IL-6, IL-8 değerleri pg/ml cinsinden ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Grup	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
1	196.93 \pm 166.219	1.13 \pm 1.133	64.88 \pm 15.926
2	117.97 \pm 85.533	41.82 \pm 38.913	32.53 \pm 2.562
3	0.00 \pm 0.000	283.17 \pm 198.751	30.97 \pm 1.999
4	24.37 \pm 15.542	384.08 \pm 214.750	32.82 \pm 3.716
5	0.00 \pm 0.000	112.88 \pm 104.314	36.63 \pm 5.785
6	0.00 \pm 0.000	36.70 \pm 32.356	27.77 \pm 2.641

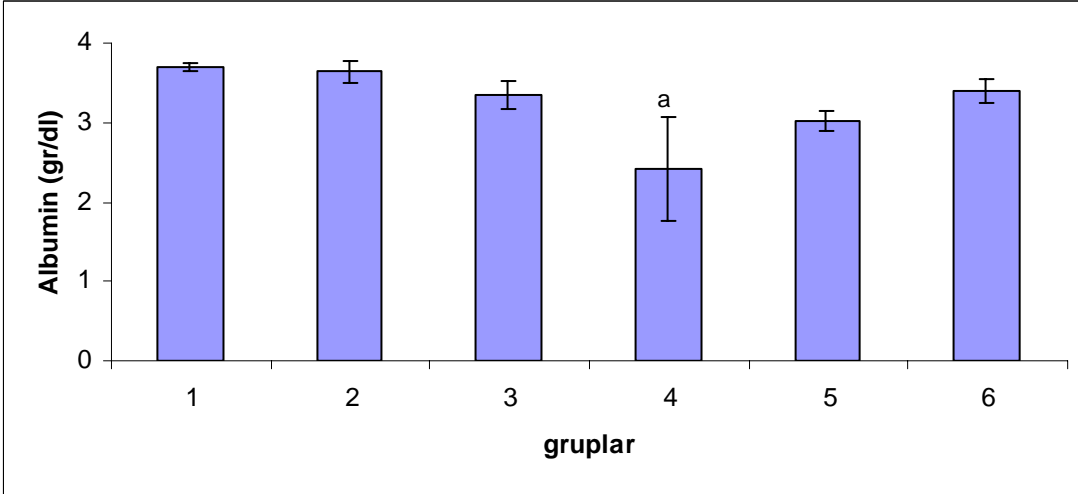
Tablo 3. Tüm gruplardaki karaciğer dokusunda hesaplanan MDA ve GSH değerleri ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Grup	MDA (nmol/g doku)	GSH (nmol/mg)
1	20.07 \pm 1.022	25.33 \pm 1.121
2	23.25 \pm 1.156	26.93 \pm 2.292
3	43.29 \pm 3.788	19.31 \pm 1.633
4	36.99 \pm 3.536	19.25 \pm 1.864
5	31.41 \pm 5.404	30.78 \pm 2.241
6	24.45 \pm 1.469	30.74 \pm 1.104



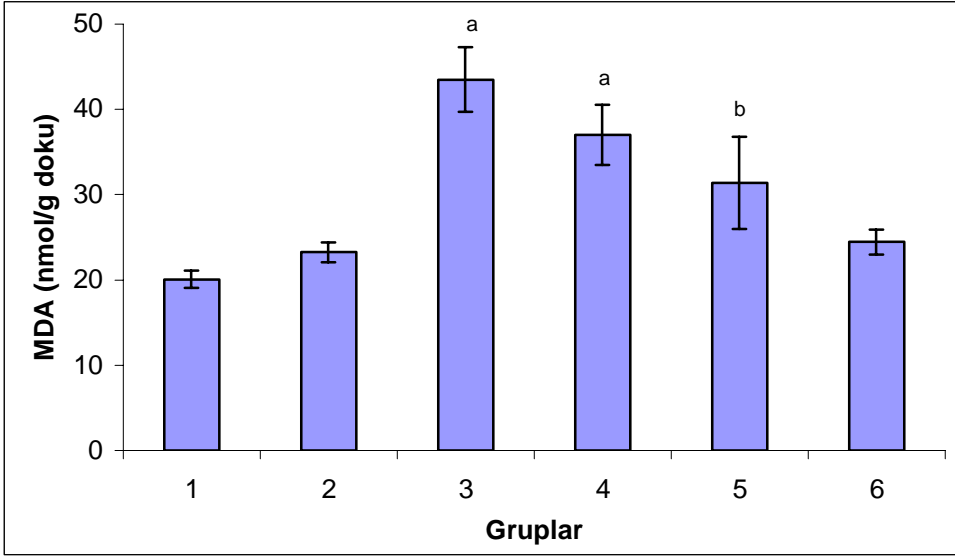
(a) $p < 0.001$; 1. Grup, tüm gruplar ile

Şekil 3. Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen ALP değerlerinin grafiksel görünümü.



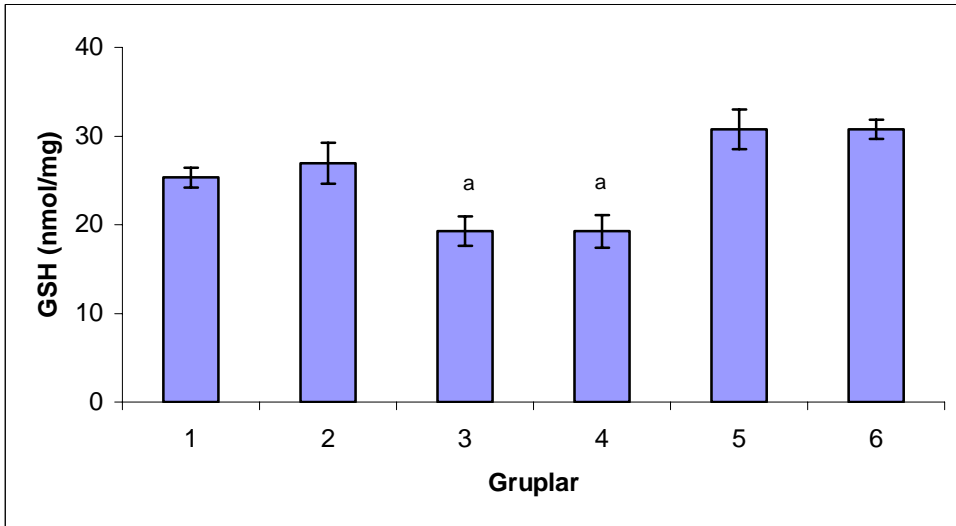
(a) $p < 0.05$; 4. Grup, 1., 2. 3. ve 6. Gruplar ile

Şekil 4. Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen Albumin değerlerinin grafiksel görünümü.



(a) $p < 0.001$; 3. ve 4. Gruplar 1., 2. ve 6. Gruplara göre
 (b) $p < 0.001$; 5. Grup 1. ve 3. Gruplara göre

Şekil 5. Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen MDA değerlerinin grafiksel görünümü.



(a) $p < 0.001$; 3. ve 4. Gruplar bütün gruplara göre

Şekil 6. Tüm gruplardaki ortalama \pm standart hata olarak verilen GSH değerlerinin grafiksel görünümü.

Karaciğer fonksiyon testleri değerlendirildiğinde ALP ve albumin dışındaki parametrelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Kontrol grubuna göre ALP tüm gruplarda anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 3). Kontrol grubu dışında diğer gruplar ALP değerleri açısından birbiriyle karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tüm gruplara ait KCFT' i Tablo 1' de özetlenmiştir.

Dördüncü gruptaki albumin düzeyleri 1., 2., 3. ve 6. gruplardaki albumin düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4).

TNF- α , IL-6, IL-8 parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Tüm gruplara ait sitokin değerleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Üçüncü ve dördüncü gruplardaki MDA değerleri 1., 2. ve 6. gruplardaki MDA değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.01$) (Şekil 5(a)). 5. gruptaki MDA değerleri 3. gruptaki MDA değerlerine göre anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 5(b)). Tüm gruplardaki MDA değerleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

Üçüncü ve dördüncü gruplardaki GSH düzeyleri anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.01$) (Şekil 6). Tüm gruplara ait GSH değerleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

6.TARTIŞMA

İnhalasyon hasarı olsun ya da olmasın yanık sistemik bir hastalıktır. Yanık sonrasında tüm organizmayı kapsayan inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkar. Bu yanıt “Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu (SIRS)” olarak bilinir (17). Yanık travması vücut sıvı kompartmanları arasında önemli değişikliklere neden olur. Kalp debisi ve doku perfüzyonunda azalma meydana gelir (20). Hipovolemi ve periferik perfüzyonu düzeltmek için yanık travması sonrası kristaloid sıvı replasmanı yapılır. Bu yaklaşımla daha önce iskemik kalmış dokuya oksijen sunumu iskemi-reperfüzyon hasarı olarak da bilinen ve organizma için zararlı olabilecek olaylar zincirini başlatır. Yanık travması sonrası gelişen hipoperfüzyonun uzun sürmesi dokularda hücre hasarı ve hatta nekrozu meydana getirirken, reperfüzyonunda hayati organlar için zararlı olduğu açıktır. Yanık travması sonrası doku ATP düzeylerinin azalıp AMP düzeylerinin artması ve hipoksantine dönüşüp ksantinoksidaz enzimi için substrat olması bilinen bir süreçtir. Organizmada meydana gelen bu değişikliklerin neticesinde organizmanın tüm dokularında zararlı olabilecek serbest oksijen radikalleri oluşur. Ksantin oksidaz aracılı serbest oksijen radikallerinin oluşumunun yanında aktive nötrofiller ilave serbest radikaller oluşturur. Artmış serbest oksijen radikallerinin oluşumu organizmanın kendini savunmasında etkili hücrel antioksidan mekanizmaları da bozmaktadır. Yanık travması sonrası SOD, katalaz, GSH, α - tokoferol ve askorbik asit seviyelerinin azalması bu durumun bir göstergesidir. Yanık travması sonrası oluşan iNOS periferik vazodilatasyon yapar ve NF- κ B'nin artmasına neden olur. Bu artış birçok inflamatuvar sitokinin transkripsiyonuna ve translansiyonuna neden olur. Ayrıca NO süperoksit radikallerle etkileşerek doku hasarının reaktif bir mediyatörü olan peroksinitrit oluşumuna neden olur. Yanık sonrası serbest radikallerin meydana getirdiği hücrel hasar dokudaki ve dolaşımdaki lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA'in artmasıyla desteklenmektedir. Yanık tedavisinde askorbik asit, GSH, N-asetil-L-sistein gibi antioksidan tedaviler yanıkta meydana gelen sepsis kaynaklı mortaliteyi azaltırlar. Bu antioksidan tedaviler hücrel enerjistiklerdeki değişikliklerin şiddetini azaltır, mikrovasküler dolaşımı düzeltir, dokulardaki lipid peroksidasyonunu azaltır. Yanık travması sonrası sıvı replasmanının antioksidan tedavilerle birlikte yapılması NF- κ B' nin nükleer göçünü önleyerek sitokinlerin salınımını önler.

Bu bilgiler toplu halde değerlendirildiğinde, yanık travması sonrası hücrel oksidatif stresin ne denli önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Oluşan serbest oksijen

radikallerinin antioksidan tedavilerle ortamdan temizlenmesi hayati organların korunmasını sağlar.

Yanık sonrası gelişen çoklu organ yetmezlikleri genellikle yanık travması sonrası erken dönemde meydana gelir ve şiddetli yanık şoku ve sistemik sepsis ile ilişkilidir.

Yanık sonrası gelişen ÇOYS (Çoklu Organ Yetmezlik Sendromu) 'un patogenezi için yapılan deneysel ve klinik çalışmalar sonucunda, ÇOYS gelişiminde dört etyolojik faktörün önemli olduğu saptanmıştır. Bunlar; yanığın şiddeti, beraberinde bulunan inhalasyon hasarı, yanık şoku ve sepsistir.

Bunlar arasında en önemli iki faktör, yanığın şiddeti ve inhalasyon hasarının varlığıdır. Eğer organizma bu iki etkiye birlikte veya ayrı ayrı maruz kalırsa, bu aşamadan sonra gelişecek patolojik sürecin şiddetli yanık şoku olduğu ve klinik olarak SIRS'a, ÇOYS'a veya sistemik sepsise ilerleyebileceği belirtilmektedir (86).

Yanık şoku ve hipoksi periyodunun uzun sürmesi, SIRS veya ÇOYS yapan temel patofizyolojik mekanizmadır. Yanık sonrası gelişen çoklu organ yetmezliklerinin temelinde uygun sıvı resusitasyonu yapılmaması veya sıvı resusitasyonuna geç başlanması yatmaktadır. Bunun sonucunda iskemik doku hasarı kaçınılmazdır ancak organlar tekrar reperfüze edildiğinde tüm organlarda iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı gelişir (87). Ayrıca dolaşımdaki trombosit agregatları artarak visseral mikrovasküler yapılarda mikrotrombüslerin oluşumuna neden olur.

İskemi reperfüzyon hasarının ana sebebi serbest oksijen radikalleridir.

Yanık sonrası ÇOYS gelişiminin patogenezi için değerlendirilmek amacıyla köpeklerle yapılan deneysel bir çalışmada %50 total vücut yanığı oluşturulduktan sonra, ESR ve GSR'nun organlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada GSR yanık uygulamasından altı saat sonra yapılmıştır. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA'nın GSR'u yapıldığında belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Artmış serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bu sürecin ÇOYS gelişiminde önemi vurgulanmıştır (86).

GSR yapılmış yanıklı ratlarda, serbest oksijen radikallerinin enterositler üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir deneysel çalışmada; intestinal mukozadaki MDA düzeyleri GSR yapılmış grupta ESR yapılmış gruba göre yanık sonrası 3., 6., 12. ve 24. saatlerde daha yüksek bulunmuş, 48. saatte belirgin bir fark saptanmamıştır (82).

Bizim çalışmamızda, yanık sonrası ESR yapılmış gruptaki ve yanık sonrası GSR yapılmış gruptaki ratların karaciğerlerinde bakılan MDA düzeyleri beşinci günde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (Şekil 5). Bu bulgu yanık hasarı sonrası serbest oksijen radikallerinin etkisiyle oluşan lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir ve yanık sonrası iskemi-reperfüzyon patogenezini araştıran çalışmalardaki bulgularla tutarlılık göstermektedir (82,86).

Bizim çalışmamızda, beşinci günde karaciğer dokusunda bakılan MDA düzeyleri, yanık sonrası GSR yapılan grup (4. grup) ve ESR yapılan gruplarda (3. grup) istatistiksel olarak anlamlı değildir. Literatürde bu iki grup arasındaki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında, yanık sonrası GSR yapılan grupta belirgin olarak artmıştır. Yanık sonrası GSR yapılan gruptaki MDA düzeyleri, yanık sonrası GSR ile birlikte serbest oksijen radikalleri için temizleyici işlevi olan amifostin verilen gruplardaki MDA düzeylerine göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Literatürde yanıkta antioksidan tedavinin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığı, ÇOYS gelişimini önlediği ve yanık travması sonrası serbest oksijen radikallerinin neden olduğu organ hasarını önlediği belirtilmektedir (20). Bizde çalışmamızda radyoterapi ve kemoterapi sonrası serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarı önlemek için klinik onkolojide kullanılan Amifostin'i yanık sonrası oluşan serbest oksijen radikalleri üzerindeki etkilerini araştırmak için kullandık. Literatürde yanık hasarının sistemik etkilerini önlemek için Amifostin'in kullanımına rastlamadık. Amifostin'in serbest oksijen radikalleri sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu hem erken sıvı resusitasyonu yapılan, hemde geç sıvı resusitasyonu yapılan yanıklı ratlarda azalttığını saptadık ($p<0.001$) (Şekil 5).

Glutasyon oksidatif stres gibi uyarılara karşı önemli hücrel savunma mekanizmalarından biridir. Endojen protein olmayan sülfidril havuzunun en önemli komponenti olan redükte glutasyon sitoplazmada serbest oksijen radikalleri için temizleyici

fonksiyon görür (88,89). Yanık travması sonrası iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan serbest radikallere karşı, redükte glutasyon konsantrasyonlarını idame ettirebilen antioksidanlar hücrel savunma mekanizmalarını iyileştirerek lipid peroksidasyonunu önleyebilirler. Bu sayede dokuları oksidatif hasara karşı koruyabilirler. Literatürde yanık travması sonrası antioksidan tedavinin, glutasyon gibi endojen savunma mekanizmalarına katkıda bulunduğuna dair yayınlar vardır (20). Bizim yaptığımız çalışmada da, yanık sonrası hem GSR yapılmış, hem de ESR yapılmış gruplardaki GSH seviyeleri kontrol gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). Bu bulgu genel olarak antioksidanların oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmalarını desteklenmesi bakımından literatürle uyumludur. Bu bulguya ilaveten Amifostin verilen erken ve geç sıvı resusitasyonu yapılmış yanıklı ratlarda (Grup 5 ve 6), karaciğer dokusundaki glutasyon seviyelerini ilacın kullanılmadığı yanıklı ratların (Grup 3 ve 4) karaciğer dokusundaki glutasyon seviyelerinden anlamlı derecede yüksek bulduk (Şekil 6). Bu bulgu, amifostinin yanık travması sonrası karaciğerde gelişen oksidatif doku hasarına karşı GSH seviyelerini idame ettirerek koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Sitokinler, yanık travması sonrası gelişen hipermetabolizma, hepatik akut faz cevabı ve apoptotik kaskadların mediatörleridir. Travma sonrası hem proinflamatuvar hemde antiinflamatuvar sitokinler homeostazisi sağlamak amacıyla hem sentez edilir hem de salınırlar (90). Yapılan çalışmalarda travma sonrası artmış proinflamatuvar sitokinlerin çoklu organ yetmezliğine ve metabolizmada artışa katkıda bulunduğu gösterilmiştir (9,15,16). Travma sonrası proinflamatuvar sitokinlerin salınımının engellenmesi orgazmanın lehinedir fakat antiinflamatuvar ajanlar ile bu sitokin yanıtını baskılamaya yönelik çalışmalar başarısızlığa uğramıştır (91). Yanık travması sonrası hepatik akut faz cevabının değerlendirildiği deneysel çalışmalarda; sitokin düzeylerine hem dokuda hem de plazmada yanık sonrası 7. güne kadar bakılmıştır. Yanık sonrası erken dönemde, sitokinler hem dokuda hem de plazmada yüksek bulunmuştur. Dokudaki sitokin seviyeleri beşinci günde pik yapmıştır. Serum sitokin seviyeleri ise ikinci günden itibaren düşmeye başlamıştır. Bizim çalışmamızda yanık sonrası GSR yapılması ile daha ciddi bir iskemi reperfüzyon hasarı amaçlanmıştır ve beşinci günde portal venden alınan kan örneklerinde proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerine bakılmıştır. Yaptığımız çalışmada sitokinler açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum hipermetabolik reaksiyonların karaciğer dokusunda serumdakinden daha uzun sürmesinden kaynaklanabilir.

Travma sonrası önemli bir morbidite ve mortalite sebebi karaciğerin yapısal proteinlerinin sentezinin azalmasıdır. Yanık sonrası albümin ve transferrin seviyeleri düşer. Fakat bu proteinlerin çok önemli fizyolojik görevleri vardır. Taşıyıcı protein olarak görev yapmalarının yanında plazma onkotik basıncın sağlanmasında, plazma pH'sının idamesinde önemlidirler. Travma sonrasında sentezlerinin azalması zararlı olduğu gibi aynı zamanda mortalitenin, nutrisyonel durumun, organizmadaki stresin ve iyileşmesinde göstergesidirler (91). Yaptığımız çalışmada yanık oluşturup GSR yaptığımız grupta serum albümin düzeyleri kontrol grubuna (Grup 1), yanık + ESR yaptığımız gruba göre (Grup 3) ve yanık oluşturup GSR yaptığımız ve beraberinde serbest oksijen radikalleri için temizleyici olarak verdiğimiz amifostinli gruba göre (Grup 6) düşük bulunmuştur. Doğaldır ki yanık sonrası GSR yapıldığında daha belirgin iskemi reperfüzyon hasarı olacak, sistemik inflamatuvar yanıt daha uzun sürecektir. Karaciğerin albümin sentezinde 6. grupta artış gözlenmiştir. Bu durum karaciğerin, travma sonrası normal fonksiyonlarına dönmesinde amifostinin pozitif bir katkısının olması ile ilişkili olabilir. Ayrıca yanık sonrası ESR yapılan grupta 5. günde albümin seviyelerinin kontrol grubu ile hemen hemen aynı, GSR yapılan gruptan anlamlı derecede yüksek olması albumin baz alındığında karaciğerin normal fonksiyonlarının geri dönmesinde iskemi reperfüzyon hasarının daha az olmasını beklediğimiz 3. grupta yanık sonrası ESR'nun önemini vurgulamak açısından anlamlıdır.

Yaptığımız deneysel çalışmada alkalen fosfat dısında karaciğer fonksiyon testlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Karaciğer iskemi reperfüzyon modellerinde parankim hasarının bir göstergesi olarak AST ve ALT'nin arttığı gösterilmiştir (92). Hepatosit fonksiyon bozukluğunun bir göstergesi olarak bilirubin ve ALP enzim yükseklikleri yine deneysel karaciğer iskemi reperfüzyon modellerinde gösterilmiştir (93).

Literatürde amifostinin plazma alkalen fosfat düzeylerini etkilemediği belirtilmektedir (10). Yaptığımız çalışmada tüm gruplardaki ALP değerleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Yanık oluşturulmadan sadece amifostin verilen grupta kontrol grubuna göre düşük olması ALP enzimi ile metabolize olan amifostinin farmakokinetiği ile ilgili olabilir.

7. SONUÇLAR

1. Yanık travması sonrası karaciğer dokusunda oksidatif hasara bağlı olarak gelişen membran lipidlerinin peroksidasyonu bu modelde de doğrulanmıştır.
2. Yanık travması sonrası karaciğer dokusunda oksidatif hasara bağlı olarak hücre içi savunma mekanizmalarının tükendiği bu deneysel modelde de doğrulanmıştır.
3. Radyoterapi ve kemoterapi sonrası oluşan oksidatif hasarı önlemek için kullanılan amifostinin yanık travması sonrası karaciğer dokusunda gelişen oksidatif hasarı önlemede etkili olduğu ve oksidatif strese karşı hücre içi antioksidan savunma sistemlerine katkıda bulunduğu bu deneysel modelde gösterilmiştir.
4. Yanık travması sonrası oluşan akut hepatik faz cevabının şiddetli iskemi reperfüzyon hasarında daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Yanık sonrası ESR'nun ve antioksidan ajan olarak amifostinin akut hepatik faz cevabının şiddetini azalttığı bu deneysel modelde gösterilmiştir.
5. Amifostinin yanık travması sonrası antioksidan olarak ilk defa kullanılmış olması nedeni ile başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

8.KAYNAKLAR

1. Göksel Ş, Şehirli AÖ, Şatıroğlu H, Uysal MK, Yeğen BÇ. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns* 28:419-425, 2002
2. Lalonde C, Knox J, Youn Y-K, Demling R. Relationship between hepatic blood flow and tissue lipid peroxidation in the early postburn period. *Crit Care Med* 20:789-96, 1992
3. Ward PA, Till GO. Pathophysiologic events related to thermal injury of skin. *J Trauma* 30:S75-9, 1990
4. Alican İ, Ünlüer EE, Yeğen C, Yeğen BÇ. Bombesin improves burn-induced intestinal injury in the rat. *Peptides* 21:1265-9, 2000
5. Youn Y-K, Suh GJ, Jung SE, Oh SK, Demling R. Recombinant human growth hormone decreases lung and liver tissue lipid peroxidation and increases antioxidant activity after thermal injury in rats. *J Burn Care Rehabil* 19:542-8, 1998
6. Hansbrough JF, Wikström T, Braide M, Tenenhaus M, Rennekampff OH, Kiessig V, et al. Neutrophil activation and tissue neutrophil sequestration in a rat model of thermal injury. *J Surg Res* 61:17-22, 1996
7. Dagmar K, Schubert T, Horch ER, Jauch WK, Jeschke GM. Insulin treatment improves hepatic morphology and function through modulation of hepatic signals after severe trauma. *Ann Surg* 240:340-349, 2004
8. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol.*181:257-266, 1997
9. Livingston DH, Mosenthal AC, Deitch EA. Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horizons.*3:276-287, 1995
10. Koukourakis MI. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications, *Anti-Cancer Drugs* 13: 181-209, 2002
11. Adams HR, Baxter CR, Izenberg SD. Decreased contractility and compliance of the left ventricle as complicates of thermal trauma. *Am. Heart J.* 108:1477-1487, 1984
12. Horton JW, Mileski WJ, White DJ, Lipsky P. Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 reduces cardiac contractile dysfunction after burn injury in rabbits. *J. Surg. Res.* 64:49-56, 1996
13. Horton JW, White J, Maass D, Sanders B. Arginine in burn injury improves cardiac performance and prevents bacterial translocation. *J Appl. Physiol.* 84:695-702, 1998
14. Mueller M, Sartorelli K, DeMeules JE, Gamelli RL. Effects of fluid resuscitation on cardiac dysfunction following thermal injury. *J. Surg. Res.* 44:745-753,1988
15. Selzman CH, Shames BD, Miller SA, et al. Therapeutic implications of interleukin-10 in surgical disease. *Shock.* 10:309-318,1998
16. De Maio A, de Mooney ML, Matesic LE,et al. Genetic component in the inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide. *Shock.*10:319-323, 1998
17. Glenn D. Warden, David M. Heimbach. Burns. *Principles of Surgery* Seymour I. Schwartz Seventh International Edition Vol 1, 223-262, McGraw-Hill 1999
18. Nyugen TT, Gilpin DA, Meyer NA, et al. Current treatment of severely burned patient. *Am Surg.* 223:14-25, 1996

19. Baxter CR. Fluid volume and electrolyte changes of the early postburn period. *Clin. Plast. Surg.* 1:693-709,1974
20. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma:the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 189:75-88, 2003
21. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Physiol.* 107:395-418, 1982
22. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GM. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.*161:488-503, 1991
23. Babbs CF. Reperfusion injury of post-ischemic tissues. *Ann Emerg. Med.* 17:1148-1157, 1988
24. Basadre JO, Sugi K, Traber DL, Niehaus GD, Herndon DN. The effect of leukocyte depletion on smoke inhalation injury in sheep. *Surgery* 104:115-208, 1988
25. Horton JW, White DJ. Role of xanthine oxidase and leukocytes in postburn cardiac dysfunction. *J. Am. Coll. Surg.* 181:129-137, 1995
26. Mileski W, Winn R, Harlan J, Rice C. Transient inhibition of neutrophil adherence with monoclonal antibody 60.3 does not increase susceptibility to abdominal sepsis. *Surgery* 109:497-501, 1991
27. Cynober L, Desmoulins D, Lioret N, Aussel C, Hirsch-Marie H., Saizy R. Significance of vitamin A and retinol binding protein serum levels after burn injury. *Clin. Chim. Acta* 148:247-253, 1985
28. Demling R, Ikegami K, LaLonde C. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant activity correspond with death after smoke exposure in the rat. *J. Burn Care Rehabil* 16:104-110, 1995
29. Demling RH, LaLonde C. Systemic lipid peroxidation and inflammation induced by thermal injury persists into the post-resuscitation period. *J. Trauma* 30:69-74, 1990a
30. Demling RH, LaLonde C. Early postburn lipid peroxidation:effect of ibuprofen and allopurinol. *Surgery* 1007:85-93, 1990b
31. LaLonde C, Knox J, Youn Y, Demling RH. Relationship between hepatic blood flow and tissue liver lipid peroxidation in the early postburn period. *Crit Care Med.* 20:789-796, 1992
32. LaLonde C, Nayak U, Hennigan J, Demling RH. Excessive liver oxidant stress causes mortality i response to burn injury combined with endotoxin and is prevented with antioxidants. *J. Burn Care Rehabil.* 18:192-197, 1997a
33. LaLonde C, Nayak U, Hennigan J, Demling RH. Plasma catalase and glutathione levels are decreased in response to inhalation injury. *J. Burn Care Rehabil.* 18:515-519, 1997b
34. Nguyen TT, Cox CS, Traber DL, Grasser H. Free radical activity and loss of the plasma antioxidants vitamin E and sulfhydryl groups in patients with burns. *J. Burn Care Rehabil.* 14:602-609, 1993
35. Rhee P. Stimulation of inflammation by standard resuscitation fluids. Presentation to the Institute of Medicine Committee on Fluid Resuscitation for Combat Casualties, 1998 17 September, Washington, DC.
36. Rhee P, Burris D, Kaufman C, Pikoulis M, Austin B, Ling G, Harviel D, Waxman K. Lactated Ringer's solution causes neutrophil activation after hemorrhagic shock. *J. Trauma* 44:313-319,1998
37. Sandra NM, Najma AA, et al. Endothelial cells: Role in infection and inflammation. *World J. Surg.* 22:171-178, 1998

38. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: Cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108:252-275, 1995
39. Maritaka G, Yoshiyuki T, et al. Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia-reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology* 19:675-681, 1994
40. Yamaguchi Y, Akizuki E, et al. Neutrophil elastase inhibitor reduces neutrophil chemoattractant production after ischemia-reperfusion in rat liver. *Gastroenterology* 112:551-560, 1997
41. Ballard-Croft C, Maass DL, Sikes P, White J, Horton JW. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac myocyte secretion of the inflammatory cytokine TNF- α . *Am. J. Physiol.* 2001;280:H1970-H1981, 2001
42. Grisham MB, McCord J M. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. 1986; In: Taylor, A.E., Matalon, S., Ward, P.A. (Eds.), *Physiology of Oxygen Radicals*. Bethesda, MD, American Physiological Society
43. Flynn DM, Buda AJ, Jeffords PR, Lefer DJ. A sialyl Lewis(x)-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 271:H2086-H2096, 1996
44. Szabo C. The role of peroxynitrite in the pathophysiology of shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6:79-88, 1996
45. Szabo C. Potential role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) synthetase pathway in a rat model of severe hemorrhagic shock. *Shock* 9: 341-344, 1998
46. Szabo C, Billiar TR. Invited review: novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock. *Shock* 12:1-9, 1999
47. Szabo C, Hoshima H. DNA injury induced by peroxynitrite. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 1:323-385, 1997
48. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 81: 637-647, 1994
49. Daryani R, LaLonde C, Zhu D, Weidner M, Knox J, Demling RH. Effect of endotoxin and a body burn on lung and liver lipid peroxidation and catalase activity. *J. Trauma* 30:1330-1334, 1990
50. Murray JD, Nelms CD, Kaufman TM, Horton JW. Lipid peroxidation in plasma and heart tissue after burn injury. *FASEB J.* 6, 2042, 1992
51. Dryden J. The threat of oxidant injury. Chapter 3 *The ICU Book Second Edition*. Edited PL Marino Williams&Wilkins Comp.32-49, 1998
52. Zimmerman BJ, Granger DN: Mechanisms of reperfusion injury. 307(4):284-292, 1994
53. E Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am Phys Soc.* 285-289, 1983
54. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47(5):412-425, 1982
55. Edward Lin, Stephen F. Lowry, Steve E. Calvano. The systemic response to injury. *Principles of Surgery* Seymour I. Schwartz Seventh International Edition Vol 1, 3-51, McGraw-Hill 1999
56. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KA, Banerjee A, Harken A H. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β synergistically depress human myocardial function. *Crit. Care Med.* 27:1309-1318, 1999

57. Giroir B, Horton- JW, White DJ, McItyre KL, Lin CQ. Inhibition of tumor necrosis factor prevents myocardial dysfunction during burn shock. *Am. J. Physiol.* 267:H118-H124, 1994
58. Norman DAM, Yacoub MH, Barton PJR. Nuclear factor NF- κ B in myocardium: developmental expression of subunits and activation by interleukin-1B in cardiac myocytes in vitro. *Cardiovasc. Res.* 39:434-441, 1998
59. Peng M, Huang L, Xie Z, Huang W, Askari A. Oxidant-induced activations of nuclear factor- κ B and activator protein-1 in cardiac myocytes. *Cell. Mol. Biol. Res.* 41:189-197, 1995
60. Shenkar R, Schwartz MD, Terada LS, Repine JE, McCord J, Abraham E. Hemorrhage activates NF- κ B in murine lung mononuclear cells in vivo. *Am. J. Physiol.* 270:1729-1735, 1996
61. Horton JW, White DJ, Maass DS, Peters Hybki D, Haudek S, Giroir B. Antioxidant vitamin therapy alters burn trauma-mediated cardiac NF- κ B activation and cardiomyocyte cytokine secretion. *J. Trauma* 50:397-408, 2001
62. Bauerle PA, Baltimore D. NF- κ B:ten years after. *Cell* 87:13-20, 1996
63. Meldrum DR, Shenkar R, Sheridan BC, Cain BS, Abraham E, Harken AH. Hemorrhage activates myocardial NF- κ B and increases TNF- α in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29:2849-2854, 1997
64. Fink P, Mitchell. The role of cytokines as mediators of the inflammatory response. *Sabiston Text Book of Surgery* Townsend C.M. 17th Inrenational Edition 45-66 Elsevier Sounder USA 2004
65. Demir S, Erden MI. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta* 275:127-135, 1998
66. Todisco T, Polidori R et al: Effect of N-acetylcysteine in subjects with slow pulmonary mucociliary clearance. *Eur J Respir Dis* 66 Supp.139:136-141, 1985
67. Redondo P, Felipe L, Pena A. Correspondence drug-induced hypersensitivity syndrome and toxic epidermal necrolysis. Treatment With N-acetylcysteine. *Br J Derm.* 136:633-653, 1997
68. Prem JT, Eppinger M. et al. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *The Am J Surg.*178:147-150, 1999
69. 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.* 27(6): 1100-1104, 1999
70. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 161:488-503, 1991
71. Forman MB, Puett DW et al. Glutathione redox pathway and reperfusion injury effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function
72. Damron TA, Spadaro JA, Tamurian RM, Damron LA. Sparing of radiation-induced damage to the physis: fractionation alone compared to amifostine pretreatment. *Int. J Radiat Oncol. Biol. Phys.*47: 1067-71, 2000
73. Nagy B, Dale PJ, Grđina DJ. Protection against cis-diaminodichloroplatinum cytotoxicity and mutagenicity in V79 cells by 2-[(aminopropyl) amino] ethanethiol. *Cancer Res.* 45: 1132-5, 1986
74. Milas L., Hunter NR., Stephens LC., Peters LJ. Inhibition of radiation carcinogenesisi in mice by S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res.*44: 5567-9, 1984
75. .Dorr RT. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol* 23(suppl 8): 23-4, 1996

76. Treskes M, Nijtmans LG, Fichtinger-Schepman AM, van der Vijgh WJ. Effects of modulating agent WR-2721 and its main metabolites on the formation and stability of cisplatin-DNA adducts in vitro in comparison to the effects of thiosulphate and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol* 148: 1817-21, 1992
77. Romakrishnan N, Catravas GN. *N*-(2-mercaptoethyl)-1,3-propaediaimine (WR-1065) protects thymocytes from programmed cell death. *J Immunol.* 148:1817-21, 1992
78. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Koroussis C, et al. Hypofractionated and accelerated radiotherapy and cytoprotection (HypoARC). A short, safe and effective post-operative regimen for high-risk breast cancer patients. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 52: 144-55, 2002
79. Yamagata M, Hasuda K, Stamato T, Tannock IF. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 77: 1726-31, 1998
80. Parkins CS, Stratford MR, Dennis MF, Stubbs M, Chaplin DJ. The relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br J Cancer* 75: 319-23, 1997
81. Cassatt DR, Fazenbaker CA, Kifle G, Bachy CM. Subcutaneous administration of Amifostine (Ethyol) is equivalent to intravenous administration in a rat mucositis model. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 57:794-802, 2003
82. Cheng Z, Sheng ZY, Hu S, Gao JC, Li JY, Yu S, Liu Y. The role of oxygen-free radical in the enterocytes in scalded rats after delayed resuscitation. *The J of Trauma* 56: 611-17, 2004
83. Beuge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-10, 1978
84. Elman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-7, 1959
85. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75, 1951
86. Huang YS, Yang ZC, Liu XS, Chen FM, He BB, Li A, Crowther RS. Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns. *Burns* 24:706-16, 1998
87. Deitch EA. Multipleorgan failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 216:117-234, 1992
88. Szabo S, Nagy L, Plebai M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta* 206:95-105, 1992
89. Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Sciece* 214:200-2, 1981
90. De Waal MR, Abrams J, Bennett B. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulation role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 174:1209-1220, 1991
91. Jeschke MG, Herndon DN, Barrow RE. Insulinlike growth factor I in combination with Insulinlike Growth Factor Binding Protein 3 affects the hepatic acute phase response and hepatic morphology in thermally injured rats. *Annals of Surgery* 231:408-416, 2000
92. Shinohara M, Kayashima K, Koomi K. Protective effects of verapamil on icchemia-induced hepatic damaged in the rat. *Eur Surg Res* 22:256-292, 1990
93. Maruyama H, Harada A, Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Nakao A, Takagi H. Duration of liver ischemia and hepatic regeeration after hepatectomy in rats. *J Surg Res* 58:290-294, 1995