

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ REANİMASYON
ANABİLİM DALI

RATLARDA
LİPOPOLİSAKKARİT İNDUKSİYONU İLE
OLUŞAN AKUT
AKCİĞER HASARI ÜZERİNE
D VİTAMİNİNİN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Eşref ERDEM

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hatice YAĞMURDUR

Kars / 2016

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ REANİMASYON
ANABİLİM DALI

RATLARDA
LİPOPOLİSAKKARİT İNDUKSİYONU İLE
OLUŞAN AKUT
AKCİĞER HASARI ÜZERİNE
D VİTAMİNİNİN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Eşref ERDEM

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hatice YAĞMURDUR

**Bu tez, Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
2016 TS-04 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

Kars / 2016



TEŞEKKÜR

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

Prof. Dr. Hatice Yağmurdur,

Yrd. Doç. Dr. Aysu H. Tekcan,

Yrd. Doç. Dr. Ömür Öztürk,

Yrd. Doç. Dr. Mesut Öterkuş,

Yrd. Doç. Dr. İlksen Dönmez'e saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmamda desteği olan; Veteriner Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Tarkan Şahin'e, Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Özgür Aksoy'a, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Avni Eroğlu'na, Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanı Arş. Gör. Sayın Mustafa Makav'a, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülname Güvendi'e, Anestezi Teknikeri Abdülmecit Akdoğan'a, Anestezi Teknikeri Taha Yasin Öztürk'e Veteriner Fakültesi son sınıf öğrencileri Emre Yıldız'a, Oğuzhan Öztürk'e, Yasin Karanlık'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Uzun eğitimim boyunca destek ve sevgilerini esirgemeyen değerli eşim, çocuklarım ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Eşref ERDEM

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	<i>ii</i>
İÇİNDEKİLER	<i>iii</i>
KISALTMALAR	<i>v</i>
TABLO LİSTESİ	<i>vi</i>
GRAFİK LİSTESİ	<i>vii</i>
ŞEKİL LİSTESİ	<i>viii</i>
RESİM LİSTESİ	<i>ix</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sepsis ve Tanımlamaları	2
2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	5
2.1.2. Sepsisin Fizyopatolojisi	5
2.1.3. Sepsiste Organ Yetmezliği Gelişimi	7
2.2. Akut Respiratuar Distres Sendromu	8
2.2.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	8
2.2.2. Sepsis ve Akut Respiratuar Distres Sendromu	11
2.2.3. Akut Respiratuar Distres Sendromunun Fizyopatolojisi	12
2.2.4. Akut Respiratuar Distres Sendromunun Tedavisi	12
2.2.4.1. Altta Yatan Hastalığın Tedavisi	13
2.2.4.2. Ventilasyon Tedavisi	13
2.2.4.3. Pron Pozisyon	18
2.2.4.4. Ekstrakorporeal Yaşam Tedavisi	18
2.2.4.5. Likit Ventilasyon	18
2.2.4.6. Sıvı Rejimi	19
2.2.4.7. Sürfaktan Tedavisi	20
2.2.4.8. İnhale Nitrik Oksit	20
2.2.4.9. Aktive Protein C	21
2.2.5. D Vitamini ve Akut Respiratuar Distres Sendromunun Tedavisinde D Vitamininin Rolü	21
2.2.5.1. Vitamin D	21
2.2.5.2. Vitamin D Eksikliği	25
2.2.5.3. Vitamin D ve Enfeksiyon Hastalıkları	26

2.2.5.4. Vitamin D ve Otoimmünite	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Denekler	29
3.2. Anestezi Uygulaması	29
3.3. Deney Grupları	29
3.4. Deney Protokolü	30
3.4.1. Ölüm Eğrisi	30
3.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	31
3.6. Akciğer Dokusunun ve Kan Örneklerinin Çalışılması	32
3.6.1. Biyokimyasal Analiz	32
3.6.2. Moleküler Analiz	32
3.6.3. cDNA Sentezi ve Real Time QRT-PCR Çalışmaları	33
3.6.4. Serum TNF α , IL1 ve IL 10 Analizi	34
3.6.5. İmmünohistokimyasal Analiz	35
3.6.6. İHC Boyama Prosedürü	35
3.6.7. Histopatolojik İnceleme	36
3.6.8. Hemotoksilen & Eozin Boyama	37
3.7. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Serum IL-1, IL-10 ve TNF α Analizi	39
4.2. Dokuda iNOS ve NFK β Analizi	41
4.3. Akciğer Histopatolojisi	42
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ	53
7. ÖZET	54
8. KAYNAKLAR	56

KISALTMALAR

ARDS: Adult Respiratuar Distress Sendromu

ALI: Akut Akciğer Hasarı

CAO: Kalsiyum

CO: Karbon monoksit

CHP: Karboksihemoglobin

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

ÇOYS: Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu

DIC: Dissemine İntravasküler Koagülasyon

G-CSF: Granülosit koloni stimüle edici faktör

GSH: Glutatyon

HETE: Hidroksieikozatetraenoik asit

HMG CoA: 3-Hidroksi-3-Metilgluteril Koenzim A

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IL: İnterlökin

iNOS: Uyarılabilen Nitrik Oksit Sentetaz 6-Keto

PGF1 α : 6 Keto Prostaglandin F1 α

LT: Lökotrien

MPO: Myeloperoksidaz

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NFK β : Nükleer Faktör Kappa

NK: Doğal öldürücü hücre

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentetaz

P II: Tip II Pnömosit

PaO₂: Parsiyel oksijen basıncı

PEEP: Pozitif basınçlı ventilasyon

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü-Alfa

TNF-R: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

TxA₂: Tromboksan A₂

γ - IFN: Gama İnterferon

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo1. Sepsiste yeni tanımlamalar	4
Tablo 2. Septik Şok Fizyopatogenezinde Etken Bakteriler ve Bakteriyel Yapılar	6
Tablo 3. ALI ARDS Tanımlamaları American European Consensus Conference 1992	9
Tablo 4. ARDS' de Berlin Konsensüsü 2011	10
Tablo 5. ALI ve ARDS 'de Rol Oynayan Hastalıklar ve risk faktörleri	11
Tablo 6. IL1 TNF α ve IL10 Değerlerinin Gruplara Göre Analizi	39
Tablo 7. iNOS ve NFK β Değerlerinin Gruplara Göre Analizi	41
Tablo 8. Grupların İnflamasyon Skorları	47



GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1.** Gruplar arası TNF α dağılımı
Grafik 2. Gruplar arası IL-1 dağılımı
Grafik 3. Gruplara göre IL-10 dağılımı
Grafik 4. Gruplara arası iNOS dağılımı
Grafik 5. Gruplara arası NFK β dağılımı

Sayfa No

- 39
40
40
41
42



SEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. SIRS, Sepsis ve Enfeksiyon arasındaki İlişki	2
Şekil 2. Sepsis Fizyopatolojisi	7
Şekil 3. Sepsiste Organ Yetersizliği Gelişimi	8
Şekil 4. Basınç-Volüm eğrisi (P/V)	17
Şekil 5. D vitamini Kimyasal Formülü ve Biyosentezi	22
Şekil 6. Ölüm Skalası	30



RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim1. Cerrahi Uygulama	31
Resim 2. Kalp Ponksiyonuyla kan örneği alınması	32
Resim 3. H&E boyama ile preparatların görünümü	43
Resim 4. H&E boyama ile preparatların görünümü (Hipovitaminoz +LPS)	43
Resim 5. H&E boyama ile preparatların görünümü (Hipervitaminoz +LPS)	44
Resim 6. H&E boyama ile preparatların görünümü (Normovitaminoz +LPS)	45
Resim 7. H&E boyama ile preparatların görünümü (Normovitaminoz)	46
Resim 8. İmmünohistokimyasal yöntemle CD 68 kit ile boyama	46

1. GİRİŞ ve AMAÇ:

Sepsis her yıl milyonlarca hastanın maruz kaldığı yüksek morbidite, mortalite oranları ile ilişkili bir hastalık tablosudur ve modern medikal uygulamalara ve tedavilere rağmen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir(1). Sepsis mikroorganizma ve toksinlerine karşı konağın geliştirdiği sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanabilir ve altta yatan neden olarak bakteriyel enfeksiyonlardan bahsedilir(2). Yabancı mikroorganizmalar veya endotoksinleri konakçının hücrel savunma mekanizmalarını tetikler; Tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin-1(IL1), interlökin-6 (IL6) gibi erken yanıt sitokinleri ile birlikte birçok inflamatuvar yanıt sistemini devreye sokarak birçok inflamatuvar mediatörü aktive ettikleri saptanmıştır. Akut Respiratuvar Distres Sendromu (ARDS) ise çoğunlukla sepsise bağlı olarak abartılı bağışıklık sistemi yanıt sonucunda alveolo-kapiller geçirgenlikte artmaya bağlı olarak ortaya çıkan bir durumdur. ARDS fizyopatolojisi üzerine birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmış olmasına rağmen; sağaltımı için mekanik ventilasyon stratejileri ve nedene yönelik tedaviler dışında kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Bu nedenle koruyucu yöntemlerin incelenmesi, risk faktörlerinin azaltılması, immünomodülatör ajanların kullanımı hala üzerinde çalışılan konulardır. Bu düşünceden yola çıkarak immunomodülatör olduğu düşünülen D vitaminin ARDS üzerindeki etkisini araştırmak istedik.

Deneysel çalışmamız birbirinden farklı D vitamini (VD) düzeylerinde olan ratlarda Lipopolisakkarit ile indüklenen akciğer hasarı düzeyleri incelemekte; VD hipovitaminozunda akciğer hasarının şiddetinin artıp artmadığını gözlemlemektir. Yabancı bir uyarıcı ile karşılaşıldığında oluşan bağışıklık yanıtının karmaşık ilişki yumağı içinde, nötrofiller aşırı ve kontrolsüz şekilde aktifleşmekte, kompleman sistemi, trombosit agregasyonu, araziidonik asit metabolizması uyarılmakta ve sonuç olarak mikrovasküler endotel hasarı oluşmaktadır. Endotel hasarı ise doku perfüzyonunda azalma birden fazla organın fonksiyonlarında bozulmaya neden olur. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda alveoler kapillerde yoğun nötrofil sekestrasyonu gösterilmiştir. Çalışmada yabancı mikroorganizmanın neden olduğu bağışıklık yanıtı incelenmek istendi. (3, 4).

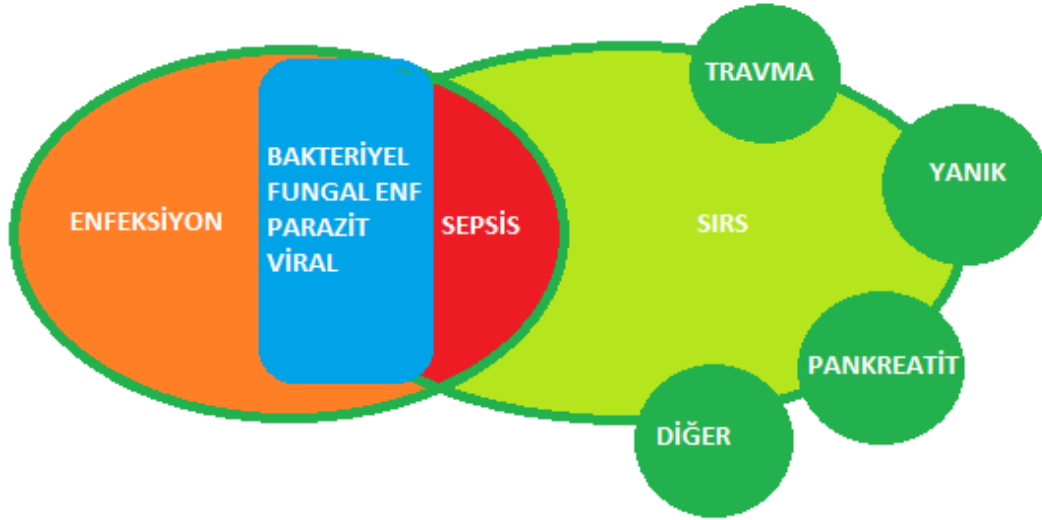
2. GENEL BİLGİLER:

2.1. Sepsis ve Tanımlamaları:

Yunanca “sepo” (mikroorganizma varlığında organik maddenin bozulması) kelimesinden türeyen bir tanımdır. Hippocrates M.Ö. 400 yılında vücutta oluşan tehlikeli, biyolojik bir çürümeden bahsetmiştir (5).

1914 yılında, Schottmueller’in patojenin kan dolaşımında bulunmasının sepsiste gözlenen sistemik belirtilerin nedeni olduğunu ileri sürmesi, günümüz anlamında sepsis tanımı için ilk kilometre taşıdır.

Laboratuar imkânlarının artması, bilimsel gelişmeler sepsisi daha iyi anlamamıza neden olsa da sepsis fizyopatolojisindeki gelişmelere rağmen terminolojideki karmaşanın sürdüğü göz ardı edilemez bir gerçektir. 1991 ve 1992 yıllarında Yoğun Bakım Tıbbı Derneği (*Society of Critical Care Medicine-SCCM*)ve Amerikan Göğüs Hastalıkları Uzmanları Derneği (*American College of Chest Physicians-ACCP*) bir araya gelerek sepsis ve ilişkili tanımları yayınlamışlardır (6, 7)(Şekil 1).



Şekil 1. SIRS ve Sepsis arasındaki ilişki

Delinger ve ark. tarafından 2004 yılında bu tanımlar gözden geçirilmiş ve yeniden yazılarak ortak bir terminoloji gayreti gösterilmiştir (8). Buna göre;

SIRS; Systemic Inflammatory Response Syndrome (Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu ; SİYS) aşağıdakilerden iki veya daha fazlasının varlığı olarak tanımlanmıştır:

1. Vücut sıcaklığı > 38 °C veya < 36°C

2. Kalp Hızı >90/dk.

3. Solunum Sayısı >20/dk

4. Lökosit sayısı >12.000/mm³ veya < 4000/mm³ya da immatür hücre oranı >%10.

Sepsis: SİYS ile pozitif kültür sonucu olan bir enfeksiyonun birlikteliği olarak tanımlanmaktadır. Kültür negatif ise tanı için klinisyenin enfeksiyon varlığını öngörmesi ve/veya aşağıdaki kriterlerden birinin varlığı gerekmektedir.

1. Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (20 ml/kg/20saat)

2. Hiperglisemi: Glukoz > 120 mg/dL. (Hastada öncesinde tanı almış bir Diyabetes Mellitus olmadığı halde görülen hiperglisemi varlığı)

3. İnflamasyon belirteçleri: C-reaktif protein (CRP) ve prokalsitonin gibi akut faz reaktanları artışının 2 standart sapma üzerinde olması

4. Mix venöz kanda oksijen saturasyon (SvO₂) >%70

5. Kardiyak İndeks: KI >3.5L/dk/m²

Ağır Sepsis: Sepsis ile birlikte hipotansiyon ve organ hipoperfüzyon bulgularının bulunmasıdır

Hipoperfüzyon bulguları:

1. Arteriyel hipoksemi (PaO₂/FiO₂ < 300mmHg),

2. Akut oligoüri (en az iki saat boyunca idrar çıkışı < 0,5 ml/kg/saat veya 45mmol/L),

3. Kreatinin > 2mg/dL, koagülasyon bozuklukları: INR > 1,5 veya aPTT > 60sn, Trombositopeni: Plt < 100000/mm³,

4. Hiperbilirübinemi: Total Bilirubin > 2 mg/dl veya 35mmol/L,

5. Hiperlaktatemi: Laktat > 2mmol/L,

6. Sistolik arter basıncı (SAB) < 90 mmHg, ortalama arter basıncı (OAB) < 70 mmHg veya SAB'da hastanın rutin değerlerine göre 40 mmHg'dan fazla düşüş.

Septik Şok: Yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen düzeltilemeyen sepsis kaynaklı hipotansiyon ve hipoperfüzyon bulgularının varlığı şeklinde tanımlanmıştır.

MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome; Çoklu Organ Yetersizliği Sendromu, ÇOY): Akut kritik hastada birden fazla organın etkilendiği ve homeostazisin müdahale olmadan (mekanik ventilasyon, hemodiyaliz gibi) sağlanamadığı durum olarak tanımlanmıştır, buna rağmen sepsis ve ilişkili tabloların tanısı klinisyenlere sorun teşkil etmeye devam etmektedir.

QSOFA (Quick Sequential Organ Failure Assessment Score -Hızlı Ardışık Organ yetmezliği skoru):Bu eski tanımların yanı sıra JAMA'nın yaptığı tanımı da göz önüne alacak olursak SIRS kavramının güncelliğini kaybettiğini, ağır sepsis, ciddi sepsis tanımının da kulanımdan kalktığını görmekteyiz. Burada SIRS yerine quick SOFA kavramı kullanılmıştır.

1. Hipotansiyon varlığı (Sistolik TA \leq 100mmHg),
2. Bilinç bozukluğu (GKS \leq 13),
3. Takipne (\geq 22/dk) durumları göz önüne alınmıştır.

Buna göre qSOFA'da herbirine 1 puan verilerek mortalite hakkında öngörü hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada qSOFA >2 olan hastalarda mortalite oranlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Tablo 1: Sepsiste eski ve yeni tanımlamalar (9)

	Eski	Yeni
Sepsis	SIRS+enfeksiyon şüphesi	Şüpheli/Tanımlı enfeksiyon +2 veya 3 qSOFA kriteri
Ciddi (Ağır) Sepsis	Sepsis+ KB \leq 90mmHg veya MAP \leq 65mmHg Laktat <2 mmol/L INR>1,5 veya aPTT>60s Bilirubin <34 μ mol /L İdrar çıkışı <0,5 ml/kg/saat K _r >177 μ mol/L Trombosit Sayısı<100/mL SpO ₂ <%90	
Septik Şok	Sepsis + S ₁ V ₁ resüsitasyonuna rağmen devam eden hipotansiyon	Sepsis+MAP>65 mmHg için Vazopressör ihtiyacı+Laktat>2mmol/L

2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Sepsis epidemiyolojisi konusunda yapılan çalışmalar yöntem olarak belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmalar kullanılan yöntemlere göre 3 grupta ele alınabilir:

- Hastane çıkış verilerine dayanan çalışmalar,
- Yoğun bakım ünitesine yatış verilerine dayanan çalışmalar,
- Hastaneye başvuru verilerine dayanan çalışmalardır.

1995 yılında hastane çıkış verilerine dayanılarak Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan bir çalışmaya göre sepsis tanılı yıllık 751.000 olgunun olabileceği hesaplanmıştır. Yapılan geriye dönük çalışmada ağır sepsis insidansı 3/1000 kişi ve mortalite de % 28.6 olarak bulunmuştur.1979-2000 yılları arasındaki verilere göre yapılan bir diğer çalışmada ise hastaneye yatan hastaların % 1,3 de sepsis izlendiği ve 22 yılda insidansta artış olduğu gösterilmiştir. 100.000 nüfus için 1979 yılında 82,7 olan olgu sayısının 2000 yılında 240,4 olarak bulunmuştur. (10).

Etiyolojik açıdan bakıldığında önceki yıllarda gram (-) bakteriler yüksek oranda iken, daha sonraki yıllarda gram (+) bakterilerin sepsis etkeni olarak görülme sıklığının arttığı saptanmıştır. 20 yıllık süre içinde mantar enfeksiyonlarında ise % 207'lik bir artış gözlemlenmiştir (11).2002 yılında 24 Avrupa ülkesinde yapılan, 198 yoğun bakım ünitesini kapsayan bir çalışmada, 2001 uzlaş konferansı kriterleri kullanılarak sepsis insidansı %37 olarak bulunmuştur. En sık enfeksiyon odağı olarak % 68 akciğer, % 22 batın, % 20 kan ve % 14 üriner sistem bulunmuştur. Hastane mortalitesinin % 24,1 olarak bulunduğu bu çalışmada, septik şokta mortalite % 54,1 olarak saptanmıştır (12).

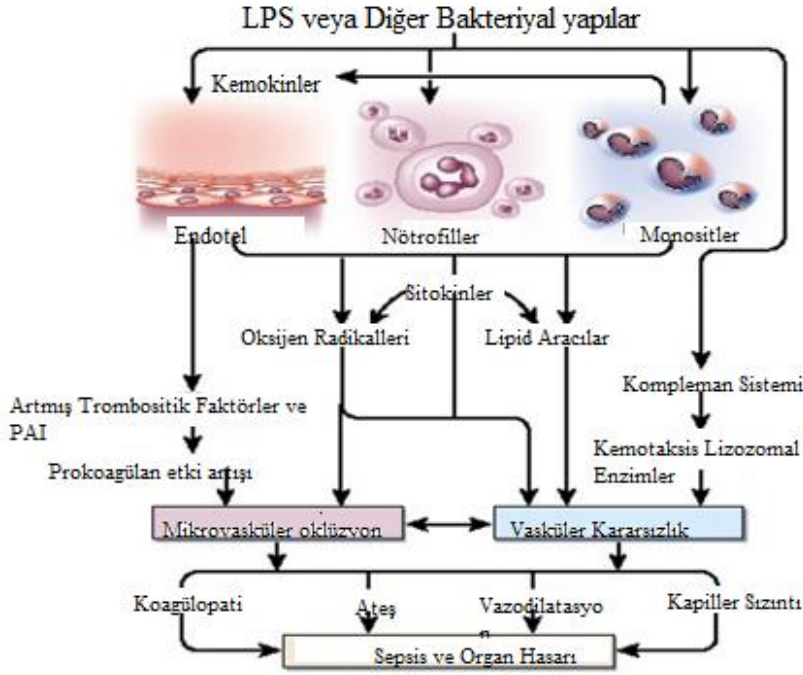
2.1.2. Sepsisin Fizyopatolojisi:

Sepsis ve septik şokta fizyopatolojik olaylar kaskatının temelinde vücuttaki mikroorganizmalar ve bileşenlerinin konağın doğal immün sistemini harekete geçirmesi yatmaktadır. Mikroorganizmaların kendilerine has antijenik yapıları ve toksinleri inflamasyonu başlatır (3, 13) (Tablo2).

Tablo 2. Septik şok fizyopatogenezinde etken bakteriler ve bakteriyel yapılar (3, 13)

Mikroorganizma	Etken bakteriyel yapı	Örnek
Bütün gram (-) bakteriler	Endotoksin (LPS, Lipid A)	<i>E. Coli</i> sepsisi Meningokoksemi
Bütün gram (+) bakteriler	Peptidoglikan Lipoteikoik asit	
<i>Staphylococcus Aureus</i> <i>Streptococcus Pyogenes</i> <i>Escherichia Coli</i>	Ekzotoksinler	A-hemolizin Streptolizin-o <i>Escherichia</i>
<i>Staphylococcus Aureus</i> <i>Streptococcus Pyogenes</i>	Süperantijenler	Toksik şok sendromu toksini Enterotoksin Pirojenik ekzotoksin
<i>Streptococcus</i> <i>Pyogenes</i> <i>Clostridium</i>	Enzimler	IL-1b konvertaz Fosfolipaz

Mikroorganizmaların yapısında bulunan antijen ve toksinler, dolaşımdaki mono nükleer fagositleri, endotel hücrelerini ve diğer farklı bağışıklık hücrelerini uyararak mediyatörlerin salınımına neden olur. Monositlerden tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve trombositleri aktive eden faktör (PAF) salınır. IL-1 ve IL-6; T hücrelerini aktive ederek γ -interferon, IL-2, IL-4, granülosit monosit koloni stimulan faktörlerin salgılanmasını sağlarlar (Şekil 2). Mediyatörlerin salınımının hemen ardı sıra koagülasyon sistemi, kompleman sistemi, fibrinolizis ve kinin sistemi aktive olur. Bu sırada endotel üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu da arttırarak, nitrik oksit (NO) üretimiyle vazodilatasyonu tetiklemekte ve pıhtılaşma sistemini de aktive etmektedir (2,14).



Şekil 2. Sepsis fizyopatolojisi (2)

Bağıışıklık yanıtının mikroorganizmaları yok etmede başarısız olması halinde sistem uyarılmaya devam eder; organ hasarı oluşturabilecek düzeyde inflamasyon meydana gelebilir. Bu durum kalp hücrelerinde artmış NO üretimi ve TNF varlığı kalp işlevlerini bozarak kollapsa neden olabilir. Tromboz ve antifibrinolizis sistemik bir hal alır ve protein C gibi antitrombotik faktörler tüketilerek düzeyleri düşer. Meydana gelen yaygın tromboz pıhtılaşma faktörlerini de tükettiği için kanamalar görülmeye başlar (4, 15).

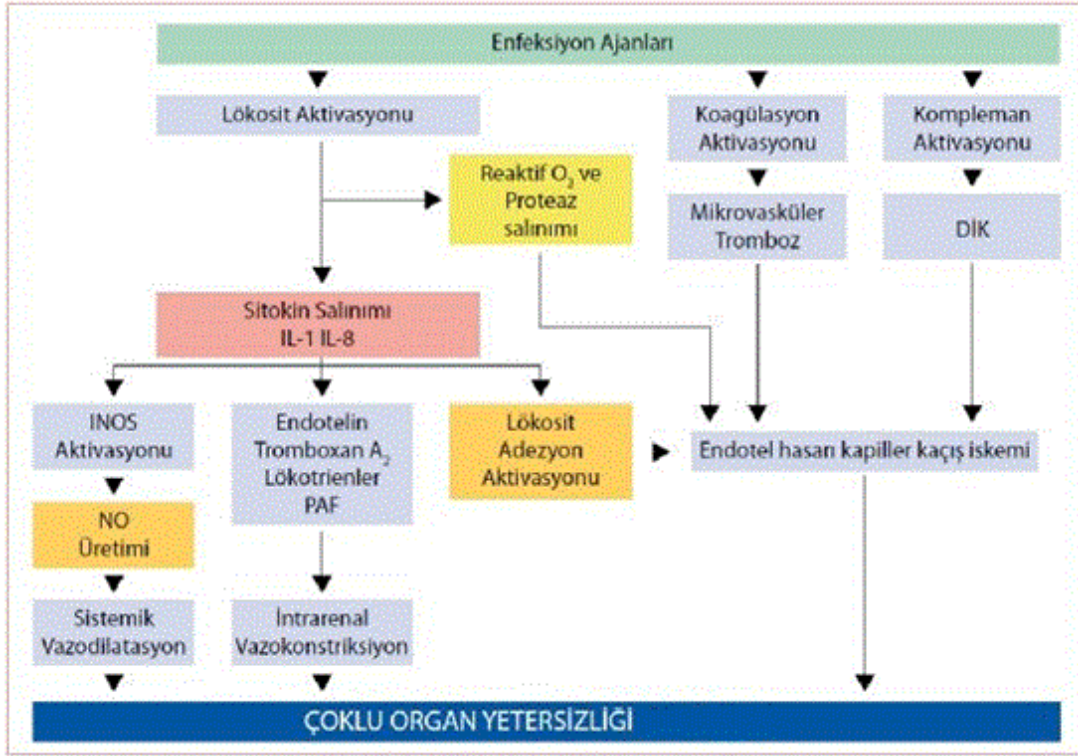
Bu anlatılan hücresel değişiklikler sonucunda hastalarda değişen derecelerde;

- Artmış vasküler / kapiller geçirgenlik,
- Patolojik vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon,
- İntravasküler koagülasyon ve fibrinolizis bozukluğu,
- Miyokard disfonksiyonu ortaya çıkmaktadır

2.1.3. Sepsiste Organ Yetmezliği Gelişimi:

Sepsiste hasarı başlatan mediyatörlerin ana hedefi damar endotelidir. Endotel permeabilitesini arttırmada endotoksin, TNF- α , IL-1, PAF, lökotrienler, tromboksan A2 ve nitrik oksit (NO) rol oynarlar. Kompleman sisteminin aktivasyonu da endotel hasarına yol

açar, damar permeabilitesini direkt veya nötrofilleri aktive ederek indirekt yolla bozar. Bunun yanı sıra nötrofillerden degranülasyonla açığa çıkan toksik oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler endotel permeabilitesini artışa neden olur. Bu olay permeabilite artışı, endotel hasarı, ekstrasvazyon ve mikrotrombüs oluşumuna neden olur. Bu süreç kendini organ perfüzyonunun bozulması ve organ yetersizliği ile nihayete erdirir(2, 14, 16).



Şekil 3.Sepsiste organ yetersizliği gelişimi (DİK; Dissemine İntravasküler Koagülasyon) (2, 14,16)

2.2. Akut Respiratuar Distres Sendromu

2.2.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji:

Sepsis enfeksiyon kaynağı olan organ dışında birçok sistemi etkilemektedir. Sepsis yoğun bakım ünitelerinde sık rastlanan bir sendromdur. Sepsis ve septik şok durumu birçok organ sistemini etkileyen her yıl milyonlarca kişinin etkilendiği hastalıklar bütünüdür. Organ yetmezlikleri ile giden bu sendromda yangı odağının akciğer olup olmadığına bakılmaksızın çoğunlukla ilk yetmezliğe giren organ akciğerlerdir. Bu durum mortaliteyi önemli oldukça oranda arttırmaktadır(17, 18,19). Sepsis ile ilişkili olarak uyarılan abartılı immün yanıtın bir diğer komplikasyonu da Akut Respiratuar Distres Sendromu (ARDS) dur. Sendrom olarak

anılmasının nedeni belirli bir nedenden ziyade birçok nedene bağlı gelişmesindedir. Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) 'nu tanımlanırken, hipoksemik solunum yetmezliği ile seyreden, permeabilite artışına bağlı oluşan kardiyak kökenli olmayan pulmoner ödem karakterize bir hastalık tablosu olarak ifade edilebilir. Laboratuarda kendini diffüz radyolojik infiltrasyonlar ve oksijen tedavisine dirençli arteryel hipoksemi ile gösterir.

Tarihsel olarak bakıldığında Rene T. H. Laennec (1781-1826), XIX. yüzyılın ilk yarısında kardiyak kökeni olmayan bir akciğer ödeminden bahsetmiş ve bu süreci tanımlamıştır (7).

ARDS, tarihsel süreç içerisinde travmatik ıslak akciğer, konjestif atelettazi, şok akciğeri, Da Nang akciğeri gibi isimler almış ise de ARDS adını 1967 yılında Ashbaugh ve arkadaşları tarafından yapılan tanımlama ile almıştır (20).

Ashbaugh, takip ettiği 12 hastasında ortak özellikler olduğunu görmüş akut başlangıçlı dispne, hipoksemi, diffüz akciğer infiltrasyonları, azalmış solunum sistemi kompliyansı olduğunu ve konjestif kalp yetmezliği bulguları olmadığını görmüş ve bu tanımlamayı yapmıştır(21).

1988 yılında, Murray ve arkadaşları tarafından PaO_2/FiO_2 , total respiratuar kompliyans, PEEP düzeyi ve radyolojik infiltrasyonların yaygınlığı olmak üzere dört komponentten oluşan LIS (Lung Injury Score =Akciğer Hasarlanma skoru) skorunu tanımladılar. Her bir komponente 0, 1, 2, 3, 4 puan verilir ve toplam puan dörde bölünerek elde edilen puan, 0,1-2,5 = hafif-orta akciğer hasarını ve $\geq 2,5$ ise ağır akciğer hasarını (ARDS) gösterir.

1992 yılında, "American European Consensus Conference (AECC)", ALI ve ARDS tanımlarını yapmıştır (22). (Tablo 2)

Tablo 3.Amerika Avrupa Uzlaşı Konferansı 1992 (22)

Klinik	Akut Akciğer Hasarı	ARDS
Başlangıç	Akut	Akut
Hipoksemi	$PaO_2/FiO_2 \leq 300$ (40kPa)	$PaO_2/FiO_2 \leq 200$ (27kPa)
Radyoloji	Pulmoner ödem ile uyumlu bilateral infiltratif görünüm	Pulmoner ödem ile uyumlu bilateral infiltratif görünüm
Nonkardiyak Neden	Sol atriyal hipertansiyonunun klinik bulgusu olmaması veya Pulmoner kapiller kama basıncı ≤ 18 mmHg	Sol atriyal hipertansiyonunun klinik bulgusu olmaması veya Pulmoner kapiller kama basıncı ≤ 18 mmHg

AECC' nin tanımlaması sonrasında bazı sorunlar su yüzüne çıkmıştır. Bu tanımlanın katı sınırlar ile kabul edilmesi halinde AECC'nin yaptığı ARDS tanımlamasının duyarlılığı %83, özgüllüğü %51 olarak sonuç verir (8). Burada ki temel problemler kardiyak patolojileri ile birlikte akut akciğer ödemi mevcut hastaların bu tanıya dâhil edilememesi, plevral efüzyon gibi patolojileri hem gaz değişimini bozması hem de radyografik olarak benzer görünüme sahip olmasıdır. Yine ek Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) gibi ek ko morbidite nedeni hastalıkların PaO₂/FiO₂ oranlarının düşüklüğü nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar vermesi sorun teşkil eder.

1998 yılında AECC ARDS için yeni bir uzlaşma toplantısı yapmıştır. Kısaca GOCA (Gas exchanges, Organ failure, Cause, Associated disease) diye bilinen sınıflama sisteminin kullanımı önerilmiştir. Bu sınıflama gaz değişimi bozukluğunun oranı, organ hasarı mevcudiyeti, ARDS' nin sebebi ve ilişkili hastalık kullanılarak yapılmıştır. Bu sistemle yapılan çalışmalarda hastalığın prognozu ve mortalitesiyle korelasyonun zayıf olduğu tespit edilmiştir. GOCA sisteminin kullanımı yaygınlaşmadan terk edilmiştir (27).

2011 yılı Kasım ayına kadar güncel bir tanımlama yapılamamıştır. Bu tarihte Berlin/Almanya'da " Avrupa Yoğun Bakım Tıbbi Derneği(ESICM)" 24. Kongresi gerçekleştirilmiştir. ARDS' nin yeni tanımı sunulmuştur (17). Önerilen yeni Berlin ARDS tanımı şunlardır (Tablo4).

Tablo 4.ARDS' de Berlin Uzlaşısı 2011 (12)

Kriter	Hafif	Orta	Ağır
Başlangıç Zamanlaması	Bir hafta içinde başlayan klinik bulgular ve/veya yeni gelişen solunum semptomları		
Hipoksemi	PaO ₂ /FiO ₂ =201-300 PEEP/ CPAP≥5	PaO ₂ /FiO ₂ ≤200 PEEP≥5	PaO ₂ /FiO ₂ ≤100 PEEP≥10
Ödem Nedeni	Kalp yetmezliği ve/veya sıvı yüklenmesi ile açıklanamayan solunum yetmezliği		
Radyolojik Görünüm	Bilateral opasiteler*	Bilateral opasiteler*	En az üç kadranı kapsayan opasiteler*
Ek Fizyolojik Problemler	-	-	CRS< 40mL/cmH ₂ O VEcorr>10 L/dk
* Efüzyon, nodül, kitle veya lobar/akciğer kollapsı ile açıklanamayan opasiteler CRS: İstirahat sırasında akciğer kompliyansı VEcorr= VExPaCO ₂ /400 (vücut yüzey alanı ile düzeltilmiş dakika ventilasyonu)			

Vilar ve ark. yaptığı bir yayında ARDS insidansı 2001 yılında 82.4/100.000, 2008 yılında 38.9/100.000 ve en son olarak 2011 yılında 7.2/100.000 olarak bulunmuştur (1). İnsidansındaki bu azalmanın, genel olarak hastaların özellikle yoğun bakımda yatanların tedavi, takip ve destek tedavilerindeki ilerleme ve mekanik ventilasyon stratejilerindeki gelişmelere bağlı olduğu düşünülmektedir.

1960'lı yıllarda hastalığın tanımlanma sürecinde mortalitesi %90 olarak bildirilmekteydi. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan bir çalışmada, 2005 yılında yılda yaklaşık 200.000 ALI ve ARDS hastası olduğu ve hastalığın mortalitesinin yaklaşık %40 olduğu öngörülmüştür (6).

ARDS etiolojisinde pulmoner veya ekstrapulmoner nedenler yer almaktadır. ARDS sıklık sırasıyla; primer pnömoni, sepsis, gastrik aspirasyon, majör travma sonrası şok ve hemoraji gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Tablo 5.ARDS Etiolojisinde Rol Oynayan Hastalıklar ve Risk Faktörleri (6)

Pulmoner	Ekstrapulmoner
Aspirasyon Pnömonisi	Sepsis
Enfeksiyöz Pnömoni	Septik Şok
Suda Boğulma	Bakteriyemi
Pulmoner Kontüzyon	Akut Pankreatit
Toksik İnhalasyon	Yanık
Kan Transfüzyonu	Çoklu Travma
Yağ Embolisi	Reperfüzyon Hasarı
Septik Emboli	Kafa Travması
Amniyotik Sıvı Embolisi	

2.2.2. Sepsis ve Akut Respiratuar Distres Sendromu

Yapılan çalışmalarda her yıl hastaneye başvuran sepsis ve septik şok tanısı alan hastaların ARDS insidansı %6-7 oranında tespit edilmiştir(22,24). Sepsis ve septik şok sonrası oluşan sistemik inflamatuvar sitokinler kan dolaşımına geçerek sistemik inflamatuvar cevaba yol açmaktadırlar. Bu sistemik cevabın en önemli bulgularından birisi akut akciğer

hasarı olup mortaliteyi önemli oranda arttırmaktadır (6, 7, 20, 23). Sepsis ve septik olgularında akciğer hasarının derecesi belirgin olarak artmakta olup mortalite oranları inhalasyon hasarının şiddetine bağlı olarak %45-78 arasında bildirilmektedir (25).

Sepsis ve ARDS birlikteliğinde; akut organ yetmezliği, komorbid hastalık ve yaşı içeren skorlama sistemi olan, hastalığın ciddiyet ve şiddetini gösteren APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II Score), SAPS2 (Simplified Acute Physiology 6 Score), SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score) skoru gibi skorlama sistemlerinde işaret ettiği üzere mortalite oranları, mekanik ventilatör tedavisi ihtiyacı süresi ve yoğun bakımda kalış süresinin artar.

2.2.3. Akut Respiratuar Distres Sendromu Fizyopatolojisi:

Epitel hasarına bağlı olarak; bronkospazm, mukozal ödem ve epitel nekrozu gelişir. Burada en önemli zedelenme yüzey gerilimini sağlayan sürfaktan'ın sentezlendiği Tip II pnömositlerde olmaktadır. Bronşiyal epitelyal alanlardaki ani kayıplara alveoler sürfaktan azalmasında eşlik etmesi, alveolar kollaps ve atelektazi ile sonuçlanarak Akut Respiratuar Distres Sendromu (ARDS) gelişimine zemin hazırlar (22, 26, 27).

Sepsis sonrası ilk 6-48 saat içerisinde hasarlanan dokulardan salınan çeşitli inflamatuvar mediatörlere bağlı olarak mikrovasküler permeabilite artar. Sepsis sonrası gelişen akciğer hasarının patogeneğinde; sitokinler, araziidonik asit metabolitleri, serbest oksijen radikalleri (SOR), nitrik oksit (NO) ve peroksinitritler gibi aktif radikaller, kompleman komponentleri ve koagülasyon faktörleri rol oynamaktadır (17, 28).

2.2.4. Akut Respiratuar Distres Sendromunun Tedavisi:

Ashbaugh ve ark. tarafından ilk tanımlamasından bu yana 50 yıl geçmesine ve özellikle son 30 yıldır üzerinde yoğun çalışmalar yapılmasına rağmen, ARDS için etkin ve özellikli bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Yoğun bakım uygulamalarında iyileşme, gelişmeler ve ARDS tedavisinde kullanılan modern mekanik ventilasyon manevralarıyla akciğer hasarını azaltmaya yönelik çalışmalar, ARDS mortalitesinde azalmaya yol açmıştır. Akut akciğer hasarı ve ARDS tedavisinde etkinliği kesin olarak gösterilmiş bir yöntem bulunmamaktadır. Tedavide amaç akut akciğer hasarına yol açan nedenin tedavisi, kardiyorespiratuar desteğin sağlanması ve akciğer hasarına yönelik hedef tedavilerin uygulanmasıdır. Yeterli gaz değişiminin sağlanmasına yönelik MV tedavileri, farmakolojik ve destek tedaviler ALI/ARDS tedavisinin temel taşlarıdır(29, 30).

ARDS'nin akciğerle ilgili (pulmoner) ve akciğer dışı (ekstrapulmoner) birçok farklı nedenle ortaya çıkması, bir hastalıklar bütünü/ sendrom olması, tanı kriterlerinin etiyojijiyi

tam olarak tanımlayamaması ve başladıktan sonra şiddetli inflamatuvar yanıtla seyretmesi tedaviyi zora sokmaktadır. Yapılan tüm çalışmalara rağmen ARDS'ye neden olan patofizyolojinin tedavisi end-organ hasarı geliştiğinden mümkün olamamakta ve uygulanan tedaviler semptomatik ve destekleyici olmaktan öte gidememektedir. ARDS'nin tedavisinde en önemli basamak etiyolojiyi tanımlamak ve varsa buna yönelik tedavileri hızla başlatmaktır(30).

2.2.4.1. Altta Yatan Hastalığın Tedavisi:

ARDS tanılı hastanın başlangıç tedavisinde, olayı başlatan nedenin erken tanımlanması ve tedavisi önemli bir yere sahiptir. Bakteriyel ya da fırsatçı enfeksiyonu olan hastalara spesifik antimikrobiyal ajanların başlanması gereklidir. Etiyolojisi belli değilse; sepsis, SIRS, septik şok bulunan hastalara geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavinin ampirik başlanması önerilir. İntraabdominal kaynaklı sepsis durumlarında mümkünse erken uygun cerrahi müdahalenin yapılması; yoğun bakım süresi ve sağ kalım oranları üzerine etkilidir. Aspirasyon, pankreatit, toksik gaz inhalasyonu, masif transfüzyona bağlı gelişen ARDS durumunda, olayın tekrarlanmasının engellenmesi ve uygun destek tedavilerinin sağlanması dışında ek tedavi gerekmemektedir.

2.2.4.2. Ventilasyon tedavisi:

ARDS tedavisinde mekanik ventilasyon (MV) olmazsa olmaz özellikte hayat kurtarıcı bir tedavi modalitesidir. ARDS'nin hafif formları noninvaziv pozitif basınçlı ventilasyondan fayda görebilirse de, ağır formlarda invaziv mekanik ventilasyon şarttır. ARDS'li olgularda MV tedavisi oldukça zordur. ARDS'de MV'nun amacı; altta yatan neden tedavi edilene ve akciğerler iyileşene kadar minimal komplikasyonla yeterli oksijenizasyonu sağlayarak destek tedavisi vermektir. Hastanın oksijenlenmesini sağlamakta klasik ventilasyon yöntemleri yeterli olmamakla beraber kırk seneye yakın süredir yeni teknikler geliştirilmektedir, ne yazık ki bu tedavi yöntemlerinin faydaları olduğu gibi komplikasyonları da vardır. Bunlar klasik olarak yüksek basınçtan (barotravma) veya yüksek volümden (volütravma) kaynaklanan pnömotoraks, bronko-alveoler fistül-rüptür gibi makroskopik komplikasyonlardır. ARDS bilinen en şiddetli seyreden restriktif akciğer hastalığıdır. Bu nedenle ki klasik mekanik ventilasyon tedavisinden ayrılan yönleri mevcuttur. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki MV'nun en önemli komplikasyonlarında neden; yüksek basınçlı mekanik ventilasyondur. Bu

yüzden ARDS'li olgularda mekanik ventilasyon desteği verilirken tercih edilecek yöntem öncelikle basınç kontrollü modlar olmalıdır(31).

Gattinoni ve arkadaşlarının tarif ettiği ARDS'deki 'baby lung' modeli göz önünde bulundurulacak olursa, volüm ve baro travmadan korumak için düşük tidal volümlü düşük basınçlı ventilasyon stratejileri uygulamak gerekir. Tavsiye edilen tidal volüm $< 6 \text{ mL/kg}$ 'dır. Bu modda mekanik ventilatör, havayollarına uyguladığı akışı kontrol altında tutar, hava yollarında oluşan basıncın kullanıcı tarafından belirlenmiş basınç seviyesini geçmemesini sağlar. Aynı zamanda, ekspirasyon sonunda da kullanıcı tarafından belirlenmiş PEEP seviyesinin altına inmeyecek şekilde ekspiratuar valfi kontrol eder(32).

ARDS olgularında alveollerin etrafındaki parankim dokusu infiltre olduğundan havalandırılabilir akciğer volümü ciddi ölçüde azalmıştır. Ancak bu hasarlanma homojenize değildir. Bazı bölgelerde konsolidasyon ve nekroz olabildiği gibi bazı bölgeler ise hiç etkilenmemiş olabilir. Bu iki üç durum arasında orta düzeyde etkilenen bölgeler çoğunluktadır ve gaz alışverişi de aynı oranda, lezyonların ciddiyetine paralel olarak etkilenmiştir. Konsolidasyon alanlarındaki alveoller, gaz alışverişindeki fonksiyonlarını yitirmişlerdir. Orta düzeyde etkilenmiş bölgelerde genellikle alveoller kollabe olmuş ve rekrütment manevraları ile açılabilir, gaz alışverişine tekrar kazandırılabilir durumdadırlar. Yüksek tidal volümün kullanıldığı klasik mekanik ventilasyon yöntemleri bu akciğerler için uygun değildir. Yüksek volümlü ventilasyon alveol ve kapiller yüzeylerinin mekanik strese maruz kalmaları sonucu alveollerin aşırı gerilmesine ve yırtılmasına yol açarak inflamatuvar yanıtın uzamasına neden olur (33). Uygunsuz ventilasyon manevraları yeni bir inflamatuvar süreci tetikleyebileceği gibi uzak organ hasarına neden olabilecek mevcut inflamatuvar süreçte de rol oynayabilir(34). İlk olarak Dreyfus ve ark. tarafından mekanik ventilatör ilişkili gelişen ALI/ARDS, sonraki yıllarda VILI (ventilator induced/associated lung injury; VİAH, ventilatör ilişkili akciğer hasarı) olarak tanımlanan bu komplikasyonun, sıklıkla yüksek tidal volüm stratejisiyle mekanik ventilasyon yapılan hastalarda meydana geldiği ve mortaliteyi yükselttiği bildirilmiştir (34, 35). Yüksek tidal volüm (V_t) ile ventile olan olgularda ve in-vitro çalışmalarda; alveollerin gerilmesine bağlı olarak, alveol endotelinin IL-8 salgıladığı, alveol makrofajlarının MIP-2 salgılaması sonucu lökositinfiltrasyonuna yol açtığı, VİAHgelişen olguların kan örneklerinde yüksek düzeyde TNF- α reseptörü olduğu ve bu reseptör düzeyinin mortalite ile orantılı olduğu gözlemlenmiştir (35, 36, 37). İnflamatuvar hasar gelişmiş akciğerleri tedavi etmeye çalışırken daha çok hasara yol açılabileceğinin görülmesi, yoğun bakım ortamında yeni sorgulamaları da beraberinde getirdi. Nitekim yeni bir Uluslararası

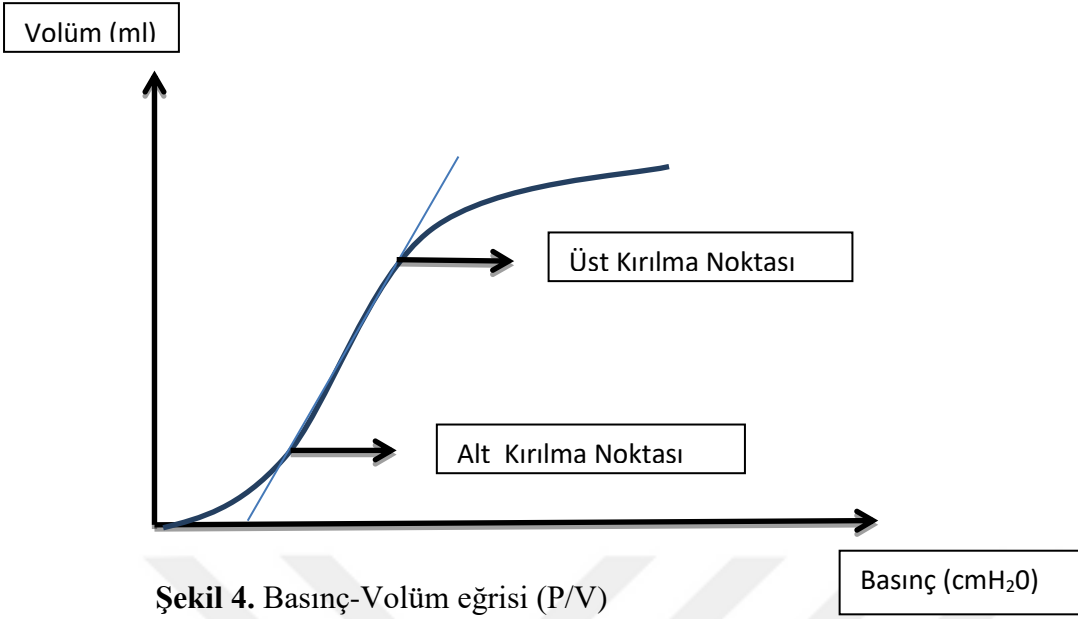
Konsensüs Konferansı ile 1999 yılında VİAH tanımı benimsendi ve tüm bu bulgular, yeni ventilasyon stratejilerinin geliştirilmesinin kaçınılmaz olduğunu gösterdi (38).

Ventilatör tedavisinin en önemli ayağı olarak pozitif ekspirasyon sonrası basıncı (positive end expiratory pressure=PEEP) gösterebiliriz. PEEP'in fonksiyonel rezidüel kapasiteyi arttırması, atelektaziye engel olması, ödem sıvısının alveolden interstisyel alana geçişini sağlması ve sürfaktan aktivitesini arttırması gibi olumlu etkileri vardır. PEEP hastadan hastaya göre değişmekle birlikte, titre edilerek ya da basınç volüm eğrisinde alt ve üst infleksiyon noktalarını tespit ederek her hasta için ideal seviye hesaplanabilir. Hedef; $FiO_2 < 0.6$ iken hemodinamiyi bozmadan arteriyel oksijen saturasyonunu > 0.90 tutan PEEP seviyesini titre etmektir(39). Hickling ve arkadaşları düşük tidal volüm, basınç sınırlı ventilasyon ve permisif hiperkapniyi içeren "lung protective ventilation" modelini 1990 yılında yayınladı (40). Permisif hiperkapnide dikkat edilen $PCO_2 < 60$ mmHg iken $pH > 7.2$ 'ye kadar müsaade edilir. Ancak permisif hiperkapni tedavisi için yüksek kafa içi basıncı, ciddi pulmoner hipertansiyon ve konvulziyon kontrendikasyon nedenleridir. 1995 Amato ve arkadaşları alternatif akciğer koruyucu bir model geliştirdiler. Bu alternatif modeli "open lung" modeli olarak adlandırdılar (41). Open lung modelinde çok kısa süreli yüksek basınç, hemen sonrasında düşük tidal volüm ve akciğer atelektazisini engellemek içinde yüksek PEEP hedeflenmiştir. Bu modelde yüksek basınçla atelektazi önlenecek, düşük tidal volüm ile akciğer hasarının önüne geçilecekti. Ayrıca yüksek PEEP düzeyi ile tekrar kollaps oluşumu engellenmesi hedeflenmişti. Ventilatör tedavisinde inspirasyon ekspirasyon oranı 1/2-1/3 olarak ayarlanabilir. Konvansiyonel terapiye yanıtızsız ciddi ARDS vakalarında basınç kontrollü ventilasyon modunda, open lung modeliyle eş zamanlı inspirasyon ekspirasyon oranını tersine çeviren inverse ratio (IR) uygulaması yapılabilir (42). Bu sırada sedasyon, kas gevşetici uygulamaları gerekebilir. Hedef düşük tepe basınçlarla atelektazik alveollerin açılmasıdır.

Bunun üzerine kapsamlı bir araştırma için ARDSNet'i oluşturan 11 kuruluş tarafından ARMA çalışması yapıldı. Çalışmada yüksek V_t (12 ml/Kg) ile düşük V_t (6 ml/Kg) stratejileri karşılaştırıldı. ARMA araştırmasının ara analizinde düşük tidal volüm ile ventile edilen olgularda daha düşük mortalite (% 31,0 ve % 39,8) tespit edilmesi üzerine araştırma erken sonlandırıldı(39). En son olarak Parsons ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada düşük tidal volüm ile ventile edilen ARDS'li olgularda kan IL-6 ve IL-8 düzeylerinin hızla düştüğünün gözlemlenmesi düşük tidal volüm ile ventilasyonun gerekliliğini ve önemini bir kez daha kanıtlamış oldu (38). Birkaç takip eden patogenez ile ilgili çalışmada ise ALI ve ARDS tanısı olan hastaların düşük tidal volüm stratejisi ile ventile edilmesinin plazma inflamatuvar

mediatör düzeylerini (IL-6, IL-8, soluble TNF reseptör 1 ve 2) ve sürfaktan protein D, alveoler tip 2 epitel hücre yapımını azalttığı gözlemlendi (34, 38, 43).

Önceleri sadece atelektazileri önlemek amacıyla kullanılan PEEP artık alveollerin açık tutulmasını amaçlayan stratejinin bir parçası oldu. ARDS Network grubunun bir çalışmasında düşük Vt ile solutulan hastaların PEEP düzeylerinin artırılmasının klinik sonuçları daha da iyileştirdiği, akciğer hasarının daha az geliştiği, mortaliteyi azalttığı ve ventilatörden ayrı geçirilen gün sayısını ve ventilatöre bağlı kalma süresini azalttığı gösterilmiştir (52). Bu mekanik ventilasyon stratejisi ve PEEP uygulanması ile alveollerin tamamen kapanmasının engellenir. Solunum işine fonksiyonel olarak kazandırılmış alveollerin tekrar kollabe olması engellenir. Bu, geri kazandırılan alveollerin tekrar açılıp kapanmasından kaynaklanan yeni inflamatuvar reaksiyon oluşumu ve veya mevcut reaksiyonun şiddetlenmesine neden olacak olaylar zincirini de engellemiştir. PEEP değeri toplam havayolu basıncının bir parçasıdır. ($P_{tot} = PEEP + P_{insp}$). Barotravma riskini azaltmak için maksimum basınç seviyesinin 30-35 cmH₂O'yu geçmemesi hedef olarak belirlenir; bu durumda PEEP ne kadar yüksek olursa, havayollarında akışa bağlı gelişen inspiratuvar basınç (P_{insp}) orantılı olarak düşecektir ve dolayısıyla oluşan Vt azalacaktır. Bu nedenle PEEP düzeyi iyi belirlenmelidir. Bu durum ideal PEEP düzeyi kavramını gündeme getirmiştir. İdeal PEEP;basınç-volüm (P/V) eğrisinin statik olarak çizimi ile elde edilir(44,45). P/V eğrisi çok düşük akışla ve küçük basamaklarla basınç artışı sağlanarak elde edilen eğridir. Akut akciğer hasarlı olgularda bu eğri sigmoid şeklinde gözlenir. Hasarlı akciğerlerin değişik volümlerde farklı kompliyans değerleri olduğunu gösteren bu eğride, alt ve üst infleksiyon noktaları vardır. Alt infleksiyon noktasına kadar olan kısımda alveoller açılır. Üst infleksiyon noktasından sonrası ise basınç artışına rağmen volüm artışının azaldığı ve alveollerin aşırı gerilmeye başladığı kısımdır Bu iki noktaların arasında tüm alveollerin açık olması nedeniyle lineer olarak seyreden eğrinin eğimi en iyi kompliyans değeridir. Alt infleksiyon noktası“ideal PEEP” değeri olarak kabul görür.



Şekil 4. Basınç-Volüm eğrisi (P/V)

PEEP uygulamalarının kabul görmesinden sonra bir takım araştırmacı açma manevraları (rekrütment manevraları) üzerinde yoğunlaştılar. İlk olarak Lachman ve ark. tarafından tanımlanan ‘akciğerleri aç ve açık tut’ görüşü yeniden değerlendirilmeye alınarak J. Richard ve arkadaşları tarafından kullanıma sokuldu. Rekrütment manevralarının oksijenlenmeyi arttırdığı ancak bu etkinin geçici olduğu görülmüştür(45, 46).

Yüksek PEEP ve düşük tidal volüm ile solutulan ARDS’li hastalarda frekansın arttırılmadığı ekspiryum süresinin uzatılmadığı durumlarda PaCO₂ yükselmesine bağlı olarak respiratuar asidoz gelişir. ARDS’li hastalarda periferik vasküler direnci azaltması, beyin perfüzyonunu artırması, kardiyak debiyi artırması, asit ortamda oksijenin hemoglobinden daha kolay ayrılması ve oksijen diffüzyonunu artırması nedeni ile pH 7,25-7,30 olacak düzeyde hafif respiratuar asidoz ve permisif hiperkapniye müsaade edilir(55,56). Fakat pCO₂<60, pH>7.25 hedeflenmelidir. Frekans arttırılarak yapılan CO₂ kontrolünde ekspiryum tam olarak sonlanamaması intrinsek PEEP (PEEP_i) oluşumuna neden olur. ARDS hastasında PEEP_i oluşuyorsa bunu önlemek adına ekspiratuar akım kontrolü, ekspiryum süresi uzatma manevrası yapılabilir. Bu da mekanik ventilatörde ayarlarında inspiryum/ekspiryum (I/E) oranı üzerinden yapılabilir.

Yüksek oksijen yüzdeleri ile küçük alveollerin kollabe olma riski doğar. Oksijenin direkt toksik etkisi ve serbest oksijen radikallerin oluşumunun artması nedeni ile yüksek doz O₂ verilmesinden kaçınılmalıdır. Arteriyel oksijen satürasyon > %90-93 tutulması ve kısa zaman

içinde $FiO_2 < \% 60$ kadar azaltılması hedeflenmelidir. Sonrasında arteriyel kan gazıtakibinde PaO_2/FiO_2 oranı düzeldikçe PEEP desteğinin düşürülmesi hedeflenmesidir.

Yüksek frekanslı ventilasyon (YFV) ise standart tedaviye dirençli vakalarda denenmiş yüksek frekanslı özel bir ventilatör kullanılarak 1-5 mL tidal volüm ile 60-300 frekans olacak şekilde kullanılan bir yöntemdir. Konvansiyonel ventilasyon modlarına bir üstünlüğü kanıtlanmamış olup standart tedaviye dirençli olgularda kullanılabilir.

2.2.4.3. Pron Pozisyon:

Özellikle erken dönemde verilen Pron pozisyonunun oksijenizasyon üzerine olumlu yanıt verdiği dair çalışmalar mevcuttur (47). Pron pozisyonu etkisini fonksiyonel respiratuar kapasiteyi artırarak, ventilasyon perfüzyon dağılımını değiştirerek, postural drenajı kolaylaştırarak, diafragmanın hareketsiz bölgelerini serbestleştirerek ve lenfatik akıma yardımcı olarak sağlar. Pron pozisyonun mortalite oranlarında düşüş sağladığına dair yayınlar da mevcuttur(47).

2.2.4.4. Ekstrakorporeal Yaşam Tedavisi (EYT, ECLS=Extracorporeal Life Support):

1972'de Hill ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir (48). Amaç akciğeri dinlenme sürecine alırken oksijen alımını membran oksijenizasyonu ile sağlamaktır. Uygulamada iki ayrı teknik söz konusudur. Ekstrakorporeal membran oksijenizasyonu (ECMO) ve yüksek akımlı venoarteriyel bypass kullanılabilir. Ekstrakorporeal CO_2 removal (ECCO₂R) ile düşük akımlı venö-venöz bypass kullanarak oksijenizasyon yanında CO_2 de atılımı da sağlanır. Yapılan iki çalışmada ağır ARDS de yaşam oranını %46-66 olarak belirtilmiştir (49,50). ECMO uygulanarak yapılan iki prospektif, randomize çalışmada kontrol grubuna kıyasla klinik sonuçlarda herhangi bir fark olmadığı gösterilmiştir (51,52).

2.2.4.5. Likit Ventilasyon (LV)

Perfluorokarbon (PFC)renksiz ve inert oksijen taşıyabilen, düşük yüzey gerilimli bir sıvıdır. Parsiyel ve total olmak üzere iki ayrı teknik kullanılmıştır. Parsiyel LV'de akciğerler tidal volüm kadar PFC ile doldurulur ve hasta konvansiyonel mekanik ventilatörlerle havalandırılır(52). Total LV'de ise akciğerler tamamen PFC ile doldurulur ve hasta özel mekanik ventilatörle havalandırılır. Yapılan iki çalışmada fizyolojik direncin azaldığı, statik akciğer kompliyansının düzeldiği gösterilmiştir. Ancak LV'nin klinik kullanımda rutine girmesi için yeter sayıda çalışma mevcut değildir.

2.2.4.6. Sıvı Rejimi:

Amaç kardiyak debi, kan volümü ve oksijen sunumunu optimal seviyede tutacak en düşük pulmoner kapiller oklüzyon basıncını sağlamaktır. Ekstravasküler akciğer sıvısının azaltılmasını sağlayan çalışmalarda mortalitenin anlamlı olarak düştüğü gösterilmiştir(40, 41). Hastaya kristaloit mi kolloid mi verilmesi gereklidir sorusunun kesin bir yanıtı olmamakla birlikte genel kural iyi bir monitorizasyon sağlanarak hastanın sıvı yükünden korunmasıdır. Kolloid sıvılar ve kristaloitler arasında üstünlük gösterilememiş olsa da, ekstrasellüler kompartman dağılımında farklılar olması nedeni ile aynı etkiyi göstermesi için kolloidlere göre 3 kat daha fazla miktarda kristaloit replasmanı gereklidir. Ancak kristalloitlerin daha fazla ödem oluşturma potansiyeli mevcuttur. Bu nedenle kolloid sıvılar daha fazla tercih edilmektedir (53,54)

Santral venöz kateter takılması hem intravenöz tedavilerin devamlılığını kolaylaştıracak hem de sıvı resüsitasyonunda monitorizasyon için yarar sağlayacaktır. Akciğer ödemi pulmoner basınç sorunudur. Bu yüzden pulmoner yatakta hidrostatik basıncı 18mmHg üzerine çıkararak sıvı resüsitasyonundan kaçınılmalı, intravasküler hidrostatik basıncı azaltacak sıvı kısıtlaması, diüretikler gibi manevralarda faydalı olabilir. Pulmoner yatakta basıncın azaltılması, pulmoner ödemin azaltılması gaz değişiminde düzelme sağlayabilir. Bu yüzden olsa gerektir ki yeterli dolaşımın sağlanmasına yeter izin verecek sıvı kısıtlaması, albümin replasmanı ve diüretik tedavi birlikteliği sık kullanılan bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımın mortalite üzerine olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (40).

ARDS Network, ALI/ARDS'li hastalarda sıvı replasmanın değerlendirildiği bin kişilik bir çalışma yapmıştır. Çalışmada konservatif sıvı tedavisinin mortalite ve ventilatöre bağlı geçirilen sürede azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada PKKB (Pulmoner kapiller kama basıncı) ve SVB (Santral venöz basınç) monitorizasyonu da karşılaştırılmıştır. PKKB monitorizasyonun, SVB monitorizasyonuna göre mortalite, yoğun bakımda kalış süresi, ventilatörden ayrılma süresi karşılaştırıldığında üstün olmadığı görülmüştür (41).Yine de intravasküler sıvı miktarının, optimal sıvı desteği miktarının net değerlendirilemediği ve ek organ yetmezliklerinin geliştiği hastalarda sıvı desteği ve vazo aktif, Vazopressör desteği dozlarının düzenlenmesi için PKKB takibi yapılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir. İntravasküler volümün ileri derecede azaltılması halinde kardiyak output ve dokulara oksijen dağılımı olumsuz etkilenebilir. Delinger ve ark. 2004 ve 2008 yılında yaptıkları çalışmada

yeterli doku perfüzyonun sağlanması için uygun sıvı resusitasyonu için hedefler belirlemiştirler (42,43).

Optimal sıvı resüstasyonu için hedefler:

- Ortalama arter basıncı > 70 mm-Hg
- İdrar çıkışı > 0,5 ml/kg/saat
- Santral venöz basınç (SVB) : 8-12 mm-Hg
- PKKB: 14-18 mm-Hg
- Santral venöz O₂ Satürasyonu > % 70

Sıvı replasmanı ile belirtilen hedeflere ulaşamaz ise hastalara vazoaktif (dobutamin) ve vazopressör (dopamin, noradrenalin, adrenalin) ilaç desteği başlanmalıdır. Ayrıca hematokrit düzeyi <% 30, hemoglobin <10 mg/dl olan hastalara da eritrosit replasmanı yapılmalıdır.

Farmakolojik tedaviler açısından değerlendirildiğinde: ARDS için net bir farmakolojik tedavi olmamakla birlikte ARDS' deki fizyolojik anomaliler için verilecek tedaviler ve inflamatuvar yanıtlar için verilebilecek tedaviler mevcuttur.

2.2.4.7. Sürfaktan Tedavisi:

İnstitasyon yoluyla verilmesi halinde alveoler yüzey gerilimini azaltması ve akciğer kompliyansının artırması yoluyla geçici oksijenizasyon düzelmeleri bildirilmiştir. Ziyadesiyle yeni doğanın sıkıntılı solunum sendromu tedavisinde kullanımı ile başarılı sonuçlar verse de ARDS için kullanımında olumlu sonuç alınamamıştır ve tedavide yeri yoktur. Ancak Likit ventilasyonu veya nitrik oksit inhalasyonu gibi tedavilerle kombine edilerek fizyolojik etkisi arttığı görülmekle birlikte mortalite ve MV süresi üzerine etkisi olmadığı görülmüştür(57).

2.2.4.8. İnhale Nitrik Oksit (NO):

Nitrik oksit etkisini endotel düz kaslarında relaksasyon olarak gösterir. Vazodilatasyon ve sağ-sol şant azaltıcı etkisi meydana gelir. İnhaler olarak kullanıldığından nitrik oksit sistemik etkilerini göstermeden pulmoner arter basıncını azaltır. ARDS tedavisinde, inhale NO tedavisinin akciğer kanlanmasını artırarak oksijenizasyonu artıracığı düşünüldüyse de 2003 yılında yayınlanan altı randomize kontrollü çalışmanın Cochrane meta-analizinde bu tedavi yönteminin oksijenlenmeyi artırıcı etkilerinin geçici olduğu görüldü (58). Oksijenizasyon ilk 24 saatte artarken 48 saatte etkisi tamamen kaybolduğuna dair veriler elde edildi.

2.2.4.9. Aktive Protein C (APC)

Ağır sepsis ve septik şok, önemli ARDS gelişen hastalarda en sık ve önem arz eden nedendir. Sepsise bağlı hiperkoagülasyon, trombin oluşumu gözlenir. Aktive protein C bu etkilerin azaltılması, fibrinolizin uyarılmasını sağlar. Bu etkileriyle rekombinant aktive protein C (drotrecogin alfa)'nin ağır sepsis ve organ yetmezlikli hastalarda ilk ay mortalite de anlamlı azalma sağlandığı bildirilmiştir(42.43.59).

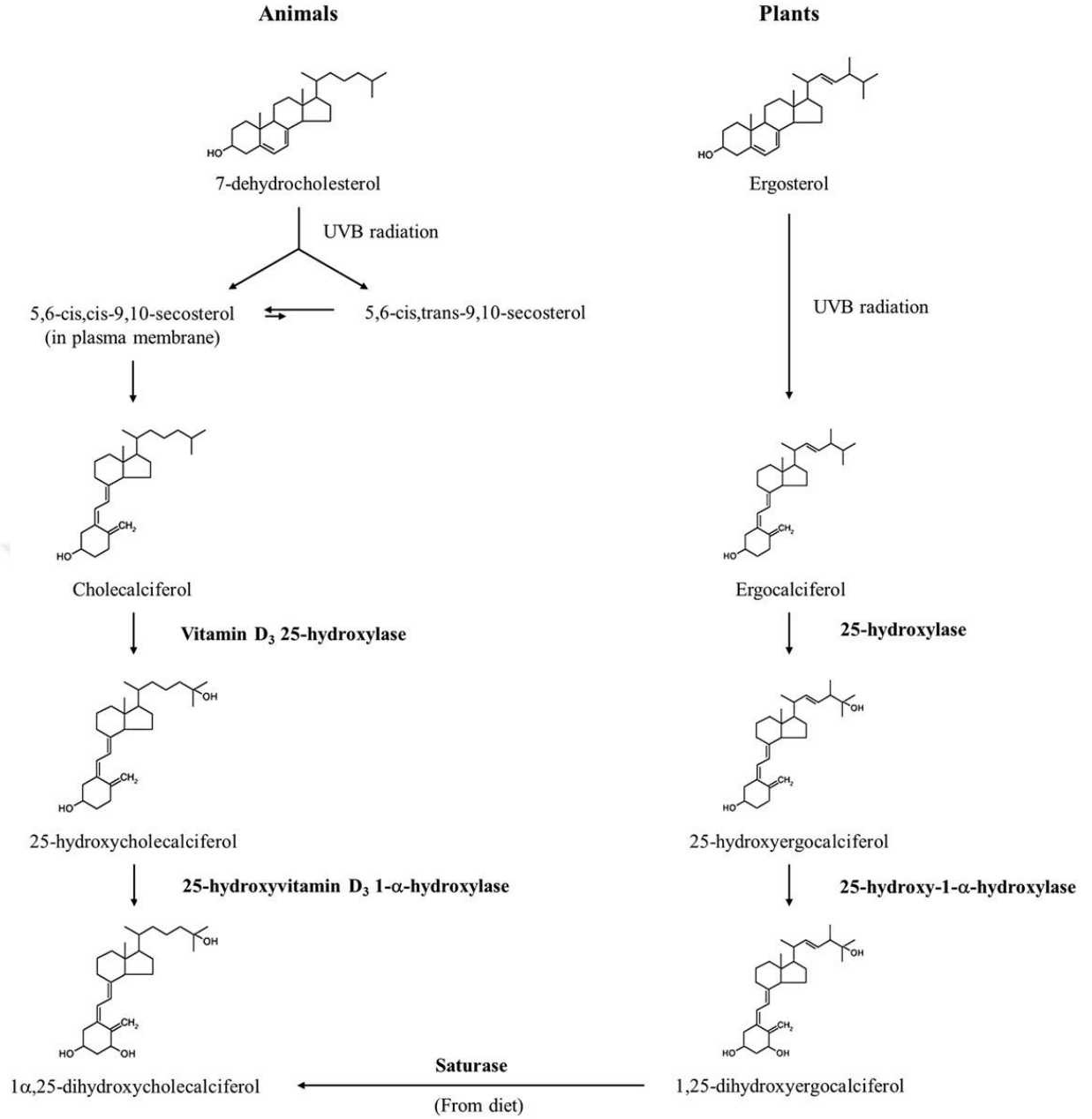
Ayrıca bunlara ek olarak ALI/ARDS tedavisinde adı geçen diğer farmakolojik ajanlar antioksidanlar(asetilsistein), prostoglandin inhibitörleri (indometazin), vazodilatatörler (sodyumnitroprussid), fosfodiesteraz inhibitörleri (pentoksifilin) ve tromboksan sentez inhibitörleri(ketokonazol)dir.

ARDS'deki akut inflamatuvar yanıt için kullanılabilecek terapötik ajanlar prostaglandin E1, ibuprofen, glukokortikoidler, vitamin D, ketokonazol, pentoksifilin/ lisofilin, N-asetilsistein, Süperoksit dismutaz ve katalaz mimetikleri anti-endotoksin anti-sitokinler (Afelimomab, TNFR füzyon protein, İnterlökin-10, İnterlökin-1 reseptör antagonisti), Kemokin (CCRI) antagonisti, anti-trombin, anti-C5a, nötrofil elastaz inhibitörü, keratinosit büyüme faktörü, gen terapisi gibi tedavilerden bahsedebiliriz. Standart tedavide yerleri olmayıp rutin kullanımları için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (60, 61, 62)

2.2.5. Akut Respiratuvar Distress Sendromu Tedavisinde D Vitamininin Rolü

2.2.5.1. D vitamini

Vitaminler eser miktarlarda organizma reaksiyonlarında önemli görevler alan, vücutta yapılamayan ve vücuda dışarıdan alınmadıkları takdirde yoksunluğuna neden olan maddelerdir. Eksikliğinde kendine has klinik tablolar ortaya çıkar. Hormon ise kana salgılanarak yakın ve uzak dokularda regüle edici görevleri olan kimyasal maddedir. Bu açıdan bakıldığında VD'i vitamin değil de hormon olarak değerlendirmek daha doğrudur. Ancak Vitamin D'nin tarihsel isimlendirme olarak kullanımı mevcuttur.



Şekil 5. D vitamini kimyasal formülü ve biyosentezi (103).

Deride güneş etkisiyle Vitamin D dönüşümü oluşuktan sonra karaciğerde 25 Hidroksi Vitamin D (25OHD') daha sonra böbrekte aktif vitamin D olan 1,25 Hidroksi Vitamin D (1,25OHD)'ye dönüşür.

Vitamin D eksikliğinde yetişkinlerde osteoporoz, osteomalazi ve çocuklarda raşitizme neden olur. VD eksikliği ayrıca kardiyovasküler hastalık, metabolik sendrom, kanser gibi hastalıklara eşlik ederken multipl skleroz, romatoid artrit, tip 1 diyabet vb. otoimmün sistem hastalıklarıyla artmış birliktelik içindedir. VD eksikliğinin telomeraz aktivitesi üzerinden yaşlanmayı hızlandırdığı ve yaşam sürecini etkilediği öne sürülmüştür. VD eksikliğinin

tafininde 25OHD3 düzeylerinin en iyi gösterge olduğu kabul edilir. Kan 25OHD3 konsantrasyonlarının 30 ng/mL'nin üzerinde idamesi VD yeterliliğini gösterirken, 20-29 ng/mL arasında yetersizliği olarak tanımlanır. Bu değer 20 ng/mL'nin altına düştüğünde ise VD eksikliği olarak tanımlanır. VD işlevlerini nükleer Vitamin D Reseptörleri (VDR) üzerinden görür. Sadece böbrek kemik ve paratiroid barsak hücrelerinde değil de birçok dokuda (kalp kası hücreleri, akciğer vb.) VDR'lere rastlamak mümkündür. VD düzeyleri bağırsaktan kalsiyum emiliminin kontrolünde önemli olduğu kadar, böbrek dışı dokularda, sitokin rolü oynayarak konakçının immün yanıtlarını düzenlemek üzere, feedback mekanizmalarıyla parakrin ve otokrin etkiler göstermek için 1,25 (OH)2D3'ün yapımını düzenler.

Deriden gelen VD3 ile diyetle alınan VD2 biyolojik olarak inaktiftirler. Kana geçtiklerinde önce karaciğer parankiminde yüksek kapasiteli sitokrom P450'lerden, 25 hidroksilaz enzimi vasıtasıyla 25 hidroksivitamin D3 (25OHD3)'e dönüşür. Bu mikrozomal enzim CYP2R1'in substrat olarak en çok VD'ye affinitesi vardır. Depolanmadan karaciğerden hemen kana salıverilir ve serumda biyolojik yarı ömrü 12-19 gündür. 25OHD3 serumda bol miktarda mevcut en stabil metabolittir ve VD'nin serumdaki en iyi göstergesidir. 25OHD3, daha sonra böbrekte mitokondriyal CYP27B1 hidroksilaz ile aktif hormon olan [1,25 dihidroksi VD3 (1,25 (OH)2D3 = Kalsitriol)]'e, gıdalarla alınan VD2 (ergosterol) 1,25 dihidroksi VD2 [1,25(OH)2D2= Kalsidiol]'ye dönüşür. Böbrekte ki enzimatik reaksiyon, PTH tarafından kontrol edilir, PTH'nin sentezi serumdaki Ca ve P ile regüle edilirse de ek olarak hipokalsemi, hipofosfatemi, GH, PRL tarafından uyarılması söz konusudur. Osteositlerden salgılanan fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF-23), Ca mobilizasyonunu sağlamak üzere artmış olan PTH ve CYP27B1 hidroksilaz gen ekspresyonunu azaltarak 1,25(OH)2D3 sentezini süprese eder. CYP27B1 hidroksilaz, VD reseptörüne çok yüksek affinitelidir. Hedef dokularda 1,25(OH)2D3'ün yönlendirildiği genlerin ekspresyonunu değiştirir. Böbrek ve bağırsaktan, Ca ve P absorpsiyonu 1,25(OH)2D3 tarafından artırılır. 25OHD3 ve 1,25(OH)2D3, 25 ve 24 hidroksilaz (CYP 24) enzimiyle, biyolojik olarak inaktif olan 24,25(OH)2D3 dönüştürülerek suda eriyen kalsitroik asite katabolize edilir. FGF-23, CYP24 ekspresyonunu artırır. Dolaşımdaki 24,25(OH)2D3 düzeyleri, dolaşımdaki 25OHD3 düzeyleri ile yakından ilgilidir. Dolaşımdaki 25OHD3 düzeyleri, serum 24,25(OH)2D3 düzeylerinin 10 misli daha fazla ve ortalama serum Kalsitriol düzeylerinden 500-1000 defa daha yüksektir. VD3 ile VD2'nin metabolizmaları benzerdir. Oral VD3 alımı aynı miktardaki VD2'ye göre %70 daha yüksek 25OHD3 serum düzeyleri yaratır(64,65).

Glomerüler filtrasyon 50 mL/dakika'nın altına inmesi halinde böbreklerin VD yapımı üzerindeki fonksiyonları zarar görür. 1,25(OH)2D3 yapımı azalır, Ca malabsorpsiyonu, sekonder hiperparatiroidizm ve sonuçta osteoporoz ve osteomalazi meydana gelir. Kalsitriol, hem oral Ca'un bağırsaktan absorpsiyonunu, hem de tübüler reabsorpsiyonunu aktif olarak sağlar. Ancak VD olmadığında diyetdeki kalsiyumun sadece %10-15'i ve fosforun %60'ı bağırsaktan emilir. VD eksikliğinde Kalsitriol fizyolojik Ca değerlerini koruyamaz.

90'lı yılların sonunda ki çalışmalara kadar aktif VD hedef organlarının sadece bağırsak, böbrek ve kemik olduğu sanılıyordu. Vitamin D reseptörü (VDR)'nün 30'dan daha fazla dokuda bulunduğu bilinmektedir. Endotel, düz kas, miyokard, beyin, prostat, meme, kolon hücreleri, immün hücreler vb. bunlar arasındadır (66,67).

Dolaşımdaki 1,25(OH)2D3'ün diğer steroid hormonlar gibi hücre membranlarını ve sitoplazmayı geçer, nükleusa ulaştığı ve burada VDR' üne bağlanarak işlev gördüğü tespit edilmiştir. Nükleer retinoik asit reseptörüne bağlanarak transkripsiyon faktörü işlevi gördüğü gen ekspresyonunda, protein sentezinde görevli olduğu anlaşılmıştır. Hücre siklusları veya hümmoral mekanizmalarla(örn. immün veya hematopoietik sistem) ile ilgili birçok kaskada bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bunlardan bazıları böbrekten renin, pankreastan insülin, makrofajlardan katelisidin yapımını, lenfositlerden sitokin salınımını, kardiyomiyositlerle vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon ve büyümesini regüle eder.

Önceleri, 25OHD3'ün 1 α hidroksilasyonunun sadece böbrekte yapılabildiği ve 1,25(OH)2D3'ün mineral metabolizmasını kontrol ettiği düşünülürken, bugün 1,25(OH)2D3'ün lokal olarak çeşitli dokularda otokrin veya parakrin şekilde(keratinositler, kolon ve prostat hücreleri, solunum sisteminin epitel hücreleri de dâhil olmak üzere, birçok nonrenal dokularda) oluştuğunu öğrenmiş bulunmaktayız. Bu dokularda 1,25(OH)2D3, hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonu ile ilgili olayları kontrol eder(68). Dakikalar içinde spesifik intraselüler metabolik yolların aktivasyonunu oluşturan, membrana bağlı VDR de tanımlanmıştır. İyonize Ca ile oluşan kas kasılmaları, sinir uyarı iletimleri ve diğer ani oluşan, gereğinde hayat kurtaran diğer fizyolojik olaylar bu yolak vasıtasıyla gelişmektedir.

VDR'ü olan dokularda 1- α hidroksilaz için 25OHD3 substrat olarak kullanılır. Vücutta Ca metabolizmasından sorumlu olmayan dokular 25OHD3'ü kalsitriol yapmak için kullanırlar. Serumdaki düşük 25OHD3 düzeyleri hücre içi yeterli kalsitriol oluşamamasından sorumlu olabilir.

Vitamin D'nin evrimsel gelişimde farklı fonksiyonları mevcuttur: Bunlar lokal olarak dokularda ve bir sitokin olarak parakrin veya otokrin etkileriyle dolaşımda bir hormon şeklinde fonksiyon göstermektedir.

Tek hücreli canlıdan insana kadar olan geniş bir yelpazede, sitokin rolüyle dış çevreden mikroorganizma taaruzuna karşı organizmayı korur. Bu görevi yerine getirirken 1,25(OH)2D3 sitokin olarak monosit-makrofajlardan sentez edilir ve VDR ile etkileşimle organizmada mikrobik ajanlara karşı yanıtları yönlendirir. Monosit-makrofajlarda 1,25(OH)2D3 yeterli miktarda sentezi sonrası aktive olmuş ve VDR eksprese eden T ve B lenfositleriyle etkileşime geçer. Bu fonksiyonuyla da immün yanıtı regüle eder. Sentezlenen miktarın yetersizliği immün yanıtta down regülasyonu için yeterli neden olarak görülür(69).

2.2.5.2. Vitamin D Eksikliği

İnsan vücudunun ideal kemik ve vücut sağlığı için VD düzeyleri önemlidir. Normokalsemi durumunu devam ettirmek yeterli Ca emilimi için olmazsa olmazdır. 25OHD3 serum düzeyleri genel olarak VD düzeylerinin bir belirleyicisi olarak kabul edilmektedir. Serumda ölçülen 25OHD3 düzeyinin < 20 ng/mL (50 nmol/L) olması durumu VD eksikliği olarak tanımlanır. 25OHD3 düzeyleri 30-40 ng/mL oluncaya kadar, PTH düzeyleri ile ters orantılı ilişki gösterir. Bu düzeyde PTH en düşük değerlerine ulaşır. 25OHD3 düzeylerinin 20 ng/mL (veya 50nmol/L) altında olması aşikâr VD eksikliği olarak kabul edilir. Bu değerde eksikliğe ait kas iskeletle ilgili sorunlar ortaya çıkar. 25OHD3 düzeyinin 21-29 ng/mL (50-75 nmol/L) olması halinde ise VD yetersizliğinden bahsedilir. Böyle bir tanım dikkate alındığında VD yoksunluğu veya yetersizliğinin dünya üzerinde 1 milyar insanda bulunduğunu söylemek yanlış olmayacaktır. VD yeterlilik düzeyi ise > 30 ng/mL olan 25OHD3 düzeyiyle tanımlanır(70). VD intoksikasyonu 25OHD3 düzeylerinin 150-200ng/mL olduğu durumdur.

VD eksikliğinde görülen en iyi bilinen klinik durumları özetlemek gerekirse, kemik hastalıkları (osteomalazi, osteoporoz, raşitizm), kas sisteminde zayıflama ve kas güçsüzlükleri kas iskelet sistemi hastalıklarından bahsedilebilir.

VD eksikliğinde iskelet sistemi dışı etkileri değerlendirirken birçok dokuda VDR'ü bulunduğunu göz ardı etmemek gerekir. Bu dokular arasında barsak hücreleri, kolon enterositleri, karaciğer hücreleri, osteoblastlar, kondrositler, prostat, plasenta, meme, over, hipofiz, pankreas, kas, distal renal hücreler, deri fibroblast ve keratinositleri, epidermal hücreler, aortik endotel hücreleri, dolaşımdaki immün hücreler (monositler, transforme olmuş B hücreleri, aktive olmuş T hücreleri gibi) nöronlar ve beyin sayılabilir ve 1,25(OH)2D3 bu dokularda etkilidir. Bazı doku ve hücreler 25(OH)2 D3 1- α hidroksilaz enzimini eksprese ederler. Direkt veya indirekt olarak 1,25(OH)2D3, 200'ü aşkın geni kontrol eder. Bu genler

arasında hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu, apoptozisi ve anjiyogenezisi kontrol eden genlerde bulunmaktadır. VD hücre proliferasyonunu normal ve kanser hücrelerinde azaltır ve terminal değişimlerini sağlar.

2.2.5.3. Vitamin D ve Enfeksiyon Hastalıkları :

1,25(OH)2D3 güçlü bir immünmodülatördür. VD Monosit makrofaj siteminden sitokin üretimi ve antimikrobiyal peptidlerin salınımı için gereklidir. VD'nin biyosentez sırasında bir ara madde olarak görev alma olasılığı yapılan insan çalışmalarıyla gündeme getirilmiştir (71) . İnsan monosit-makrofaj Toll like reseptör (TLR) yolağının, patojenle ilişkili membran örneklerinin (PAMP) aktivasyonu, (*Mycobacterium tuberculosis*'teki gibi mikrobik ajanların uyardığı PAMP aktivasyonu gibi) bu hücrelerde CYP27 B1 hidroksilaz ve VDR genlerinin ekspresyonunu başlatır (72).

VD'nin immünomodülatör etkisi ile ilgili ilk deliller;

1.Düşük 25OHD3 düzeyleri olan kişilerin *Mycobacteriumtuberculosis* enfeksiyonuna daha hassas olduğu görülmüştür.

2.VD düzeyleri düşük ve hastalığı olanların daha ağır geçirdikleri fark edilmiştir. (73).

Konakçı etken mikroorganizma lipopolisakkaritleriyle veya mikro organizma ile karşılaştırıldıklarında, VDR genini ve25(OH)2D3 CYP27B1 alfa hidroksilaz genini “up-regule” eder. Artmış 1,25(OH)2D3 yapımı, süreç enfeksiyon ajanlarını tahrip edebilecek bir peptid “cathelicidin” senteziyle sonlanır. VD yetmezliği veya eksikliğinde makrofajlar, CYP27B1 hidroksilaz için yetersiz substrat 25OHD3 varsa, lokal olarak yetersiz 1,25(OH)2D3 oluşur ve bu 1,25(OH)2D3'ün, makrofaj VDR'e bağlanmasını azaltır, sonuç olarak mikroorganizmaya yöneltilen bağışıklık yanıtı zayıflar. Serum 25OHD3 düzeyleri, 20 ng/mL altına indiğinde ise monosit ve makrofajlar VD-VDR sistemi üzerinden bu immün yanıtı başlatamazlar.

Mycobacterium tuberculosis dışı mikrobiyal hastalıklarda da 25OHD3 düzeylerinin etkileri araştırıldığında; üst solunum yolu enfeksiyonlarının 25OHD3 düzeylerinin daha fazla düştüğü kış aylarında en sık görüldüğü gösterilmiştir. Ayrıca mevsimden bağımsız olarak serum25OHD3 düştüğünde üst solunum yolu enfeksiyonlarının sıklığının ve şiddetinin arttığı görülmüştür (74).

2.2.5.4. Vitamin D ve Otoimmünite:

VD'nin otoimmünite üzerindeki etkilerine göz atacak olursak hem kazanılmış bağışıklık hem de doğal bağışıklık üzerine etkili olduklarından bahsedebiliriz. VD'nin immünomodülatör etkileri yapılan invitro çalışmalarla keşfedilmiştir.

Bu üç önemli keşif:

- İnsanlarda aktif inflamatuvar hücrelerde VDR varlığının tespiti
- Aktif VD nin T hücre proliferasyonu üzerine inhibe edici özelliği
- Granülom oluşumu ile karakterize (sarkoidoz, tüberküloz) hastalıklarda

1 α hidroksilaz ekspresyonu ile aktif VD üretme becerisinin tespitidir(75).

Bu invitro çalışmalar üzerine in vivo çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar in vitro çalışmalar ile paralellik arz etmektedirler. Bu sonuçlar:

- Psöriyazis gibi hiperproliferatif hastalıkların kontrol ve tedavisinde aktif VD kullanımı
- Granülomatöz hastalıkların seyri sırasında aktif VD üreten makrofajların dolaşıma geçmesiyle oluşan hiperkalsemi, hiperkalsiüri
- Deri ve akciğer tüberkülozunda yüksek rakımlı bölgelerde güneşe maruziyetin faydalarının gözlemlenmesi (76)

Bağışıklık hücrelerinde ve primer lenfoid organlarda (kemik iliği ve timus) VD reseptörünün belirlenmiş olması ve aktive olmuş dendritik hücrelerin VD sentez ettikleri gösterildiğinde VD'nin immün regülatör sistemin bir parçası olabileceği düşünülmüştür. Kemik iliği ve timusta immün sistem gelişimi ve değişimi söz konusudur. Bağışıklık sisteminde hem mononükleer hücrelerde, dendritik hücrelerde, antijen sunan hücrelerde hem de aktive T-B lenfositlerde bulunduğu görülmüştür. Sessiz CD4 hücreleri düşük konsantrasyonlarda VDR eksprese ederler, ancak aktive olduklarında ekspresyon beş misli artar. 1,25(OH)2D3'ün kazanılmış, antijen spesifik immün yanıt üzerine etkisi T lenfosit proliferasyonunun inhibisyonu (özellikle Th1 kolu üzerine) ile karakterizedir. CD4 T hücrelerinin 1,25(OH)2D3 ile tedavi edilmesi, Th1 hücre proliferasyonunu ve sitokin yapımını inhibe eder; bu fonksiyonunu IL-2 ve IFN- γ 'nın CD4 hücreleri tarafından salgılanmasını azaltıp, IL-5, IL-10 yapımını artırarak gerçekleştirir. T hücre yanıtını TH₂'nin baskınlığına iter. Bazı gözlemlerde ise hem Th1 ve hem de Th2 hücrelerinden, sitokin yapımının (IL-4 dâhil) inhibisyonu gözlenmiştir. 1,25(OH)2D3 ile IL-6 ekspresyonu inhibe

edilir. IL-6 işlevsel olarak Th17 hücrelerinin uyarır. Th17 hücreleri, otoimmün reaksiyonun önemli bir komponentidir. Aktif VD nin Th 17 hücrelerinde inhibitör görev yaparak proinflamatuvar sitokinlerin (IL-2, IL-3, IFN-gama, TNF-alfa) üretimini azalttığı gösterilmiştir(77).

1,25(OH)2D3 fagositozu, makrofajlar tarafından bakteri öldürülmesini uyarır. Ancak dendritik hücrelerin ve makrofajların antijenprezente etme kapasitelerini süprese eder; makrofajların, lenfositlerde antijen sunumunda hücre yüzeyinde MHC-II moleküllerinin ekspresyonunu azaltır. B hücrelerinde VD, antikör salınımını ve otoantikör yapımını inhibe eder(78).

Özetle VD nin immün sistem üzerine etkilerine bakacak olursak; yapılan çalışmalarda VD' nin T helper (Th) 2 hücrelerini uyararak antiinflamatuvar sitokinleri (IL- 4, IL-5, IL-10, TGF-beta) arttırdığını, Th 1 ve Th 17 hücrelerini inhibe ederek proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1,IL-2, IL-3, IL-& IFN-gama, TNF-alfa) üretimini azalttığını söyleyebiliriz. Aktif VD'nin B hücre prekürsörlerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını önleyerek, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını inhibe ettiğinden bahsedilebilir (79).

CD4 T hücreleri Th 1, Th 2 ,(Treg) ve süpresör T hücrelerine dönüşebilir. Treg hücreleri self toleransın idamesini sağlayan hücrelerdir. Aktif D vitamini CD4 T hücrelerinin Treg hücrelerine dönüşümünü artırır. D vitamini eksikliği durumunda Treg sayı ve aktivitesi azalır ve otoimmün hastalıkların gelişimi artar (80).

Kısaca VD'nin otoimmün hastalıklardaki etkilerini inceleyen çalışmalara bakılacak olursa; inflamatuvar artrit, otoimmün diyabet, inflamatuvar barsak hastalıkları ve deneysel alerjik ensefalit (multipl skleroz için bir model) gibi birçok deneysel modelde aktif D vitamini uygulaması bu hastalıkların önlenmesi ve/veya tedavisini sağlamıştır. (81, 82, 83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma prospektif, randomize, kontrollü deneysel bir çalışma olarak planlandı. Kafkas Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Araştırmaları Etik Kurulu (HADYEK) onayı (KAÜ-hadyek/2015-058) alındıktan sonra Multidisipliner Deneysel Hayvanlar Laboratuvarı'nın olanakları kullanılarak yapıldı.

3.1. Denekler :

Çalışmada ağırlığı 250-350 gr olan 36 adet erkek wistar cinsi rat kullanıldı. Atatürk Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Laboratuvarı'ndan sağlanan denekler standart rat yemi ve su ile ad libitum beslendiler. D vitamini hipovitaminozuna sokulacak grup oda sıcaklığında mutlak karanlık ortamda tel kafeslerde yaşatıldı. Diğer üç grup oda ısısında 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda tel kafeslerde yaşatıldılar. Cerrahiden 6 saat önce sadece su içmelerine izin verildi. Deney süresince hayvanların vücut sıcaklığı sabit tutuldu.

3.2. Anestezi Uygulaması:

Deneklere 50 mg/kg ketamin (Ketalar®, Pfizer Pharma GMBH, Almanya) ve 10 mg/kg xylazine hidroklorid (Alfazyne®, %2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Hollanda) intraperitoneal olarak uygulanarak anestezi sağlandı.

3.3. Deneysel Grupları:

36 adet rat randomize olarak 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 deki (Normovitaminoz+ Lipolisakkarit grubu) 10 adet rat ad libitum ile beslendi. 12. haftaya kadar 12'şer saat aydınlık/ karanlık dönüşümüne sokuldu. Deneklerin D vitamini düzeyleri ölçülerek normovitaminoz oldukları saptandı. 12. hafta da ratlar tartıldı. 7,5 mg/kg lipolisakkarit (LPS) insuflasyon ile verildi. LPS maruziyetinden sonra ölüm skalasında ratların klinik olarak sepsise girişi gözlemlendi.

Grup 2 deki (hipervitaminoz+ LPS grubu) 10 adet rat ad libitum ile beslendi. Ratların tartılarına göre 10 IU VD/g VD replasmanı yapıldı. 12. haftaya kadar 12'şer saat aydınlık/ karanlık dönüşümüne sokuldu. 12. hafta da ratlar tartıldı. Deneklerin d vitamini düzeyleri ölçülerek Hipervitaminoz oldukları saptandı. 7,5 mg/kg Lipopolisakkarit (LPS) insuflasyon ile verildi. LPS maruziyetinden sonra ölüm eğrisinde ratların klinik olarak sepsise girişi gözlemlendi.

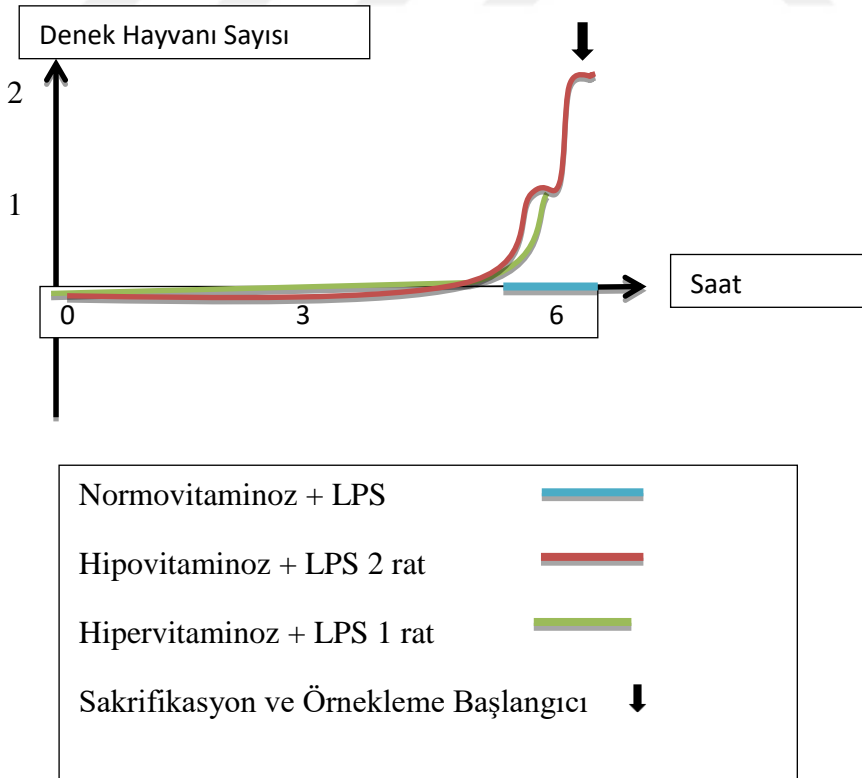
Grup 3 deki (hipovitaminoz+ LPS grubu) 10 adet ratda D vitamini hipovitaminozu oluşturmak için mutlak karanlık ortam koşulları sağlandı ve VD' den yoksun diyetle beslenip

takibe alındı. 12. haftaya kadar mutlak karanlık ortamda tel kafesler içinde yaşatıldı. 12. hafta da ratlar tartıldı. Deneklerin D vitamini düzeyleri ölçülerek hipovitaminoz oldukları saptandı. 7,5 mg/kg lipopolisakkarit (LPS) insuflasyon ile verildi. LPS maruziyetinden sonra ölüm skalasında ratların klinik olarak sepsise girişi gözlemlendi.

Grup 4 deki 6 adet rat negatif kontrol grubu olarak belirlendi. 12 hafta boyunca ad libitum ile beslendi. 12. hafta da deneklerin D vitamini düzeyleri ölçülerek normovitaminoz oldukları saptandı. Negatif kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı.

3.4. Deneş Protokolü:

Tüm gruplardaki deneş hayvanlarının 12. haftanın sonunda vitamin D düzeyleri ölçüldü. Protokole uygun şekilde uygulanan beslenme ve aydınlık/karanlık protokolleri sonucunda, hedeflenen normovitaminoz / hipovitaminoz / hipervitaminoz gruplarının oluşturulduğı saptandı. Sonrasında her deneş tartılarak genel anestezi altında insuflasyon ile lipopolisakkarite [LPS; E.Coli O55:B5 (Sigma-Aldrich Corporate Offices St. Louis, USA)] maruz bırakıldı. Çalışma boyunca ratların normotermik (37°C) olması için, çalışma ortamının sıcaklığı ısıtıcı bir lamba ile korundu. Negatif kontrol grubu için çalışma başlatılırken bir yandan da LPS maruziyetinde ki gruplar için ölüm eğrisi çizildi (Şekil 6).



Şekil 6. Ölüm Eğrisi

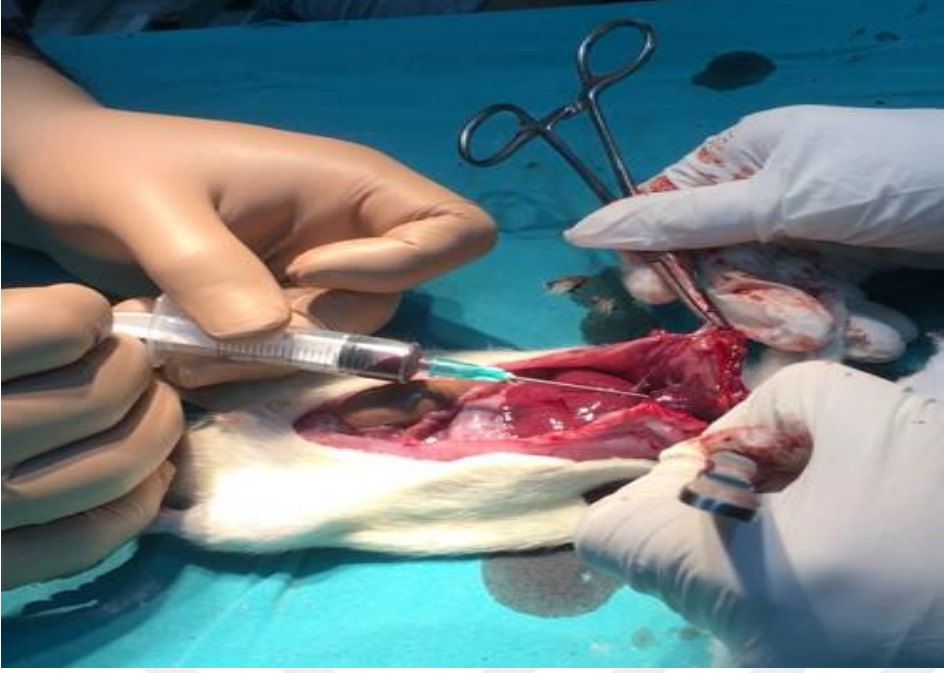
Ölüm eğrisi üzerinde görüldüğü üzere 6. saatin sonuna doğru hipovitaminoz grubunda 2, hipervitaminoz grubunda ise 1 ratın gözlem sırasında septik şokta olduğu görülerek kan ve doku örneklerinin alınımına geçildi.

3.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması:

LPS verilmesinden yaklaşık 6 saat sonra tüm deneklerden 50 mg/kg ketamin (*Ketalar*® , Pfizer Pharma GMBH, Almanya) ve 10 mg/kg xylazine hidrokloride(*Alfazyne*®, %2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Hollanda) anestezisini altında torakotomi sonrası kalpten kan alınarak sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Akciğerler patoloji çalışılması için alındı. Sağ akciğer histopatolojik incelemeler için %10 tamponlanmış formol çözeltisi içerisinde saklandı. Sol akciğerden ise biyokimyasal işlemler (NFkB-iNOS ölçümleri) için %0.9'luk NaCl ile yüzeysel yıkama ve kurutma işlemlerinin ardından mikro santrifüj (eppendorf) tüplerine yerleştirilerek, ölçüm yapılacağı güne kadar -80°C'de derin dondurucu içinde korundu.



Resim 1. Cerrahi Uygulama



Resim 2. Kalp ponksiyonuyla kan örneği alınması

3.6. Akciğer Dokusunun ve Kan Örneđlerinin Çalışılması

3.6.1. Biyokimyasal Analiz:

Serumda sitokin çalışımı için düz biyokimya tüpüne 3'er cc kan alındı. 2000 devirde 10 dk santrifüj edilerek serum ve plazma örneğleri elde edildi. Elde edilen örneğler eppendorf tüpleri içerisine konularak soğuk zincir prensiplerine uygun şekilde analiz süresine kadar -80 derecede saklandı. Tüm deneklerin akciğerlerinden alınan doku örneğleri +4 derecede serum fizyolojik ile yıkanıp kurulandı. Eppendorf tüpler içine alınarak soğuk zincir prensiplerine uygun olarak analiz süresine kadar -80 derecede saklandı. Tüm biyokimyasal analizler çift çalışma şeklinde gerçekleştirildi.

3.6.2 Moleküler Analiz:

RNA Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılan iNOS ve NFK β gen ekspresyon analizleri için kullanılacak olan total RNA hazır ticari kit (Anti-iNOS antibody [NOS-IN] Abcam Bristol UK) kullanarak izole edildi.

Analiz için akciğer dokusundan 10 mg alındı ve sıvı azot içiresinde dondurularak bir havan içeresinde ezildi. Ezilen donmuş dokunun erimesine izin verilmeden üzerine 600 μ l

lizis buffer (RNA izolasyon reaktifi) konuldu ve kit kılavuzunda belirtildiği gibi 14000 devirde santifürüjlenerek süpernatant ayrı bir tüpe aktarıldı. Sonrasında süpernatant miktarı kadar % 70'lik etanol eklenerek vortekslendi. Bu şekilde hazırlanan ve içerisinde RNA bulunan çözelti, toplama tüplerine monte edilen kolonlara aktarıldı. Santrifüjle kolonlardan geçirildi. Bu lizatın toplama tüpünde kalan kısımları döküldü. RNA'yı daha saf elde edebilmek amacıyla kolon yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. En son kolondan elüsyon çözeltisi geçirilerek RNA saf olarak elde edildi. Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı nanodropta (ND 1000) optik dansitelerinden hareketle (OD260/280) belirlendi. RNA izolasyonu işleminin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi. OD260/280 oranı 1,7 ve üzerinde olan RNA'lar çalışmada kullanıldı. RNA'lar kullanılabilir formda olup olmadığının belirlenmesi için % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve spesifik 18S ve 28S bantları görüldü. Müteakiben cDNA sentezine geçildi.

3.6.3. cDNA Sentezi ve Real Time QRT-PCR Çalışmaları

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait RNA'dan 1 µg alınarak önce Reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Ticari cDNA sentez kiti (ThermoFisher Scientific High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Katalog Numarası 4368814) kullanılarak sentez edilen her bir örneğe ait cDNA 'den 1 µl alınarak RT-PCR analizlerinde kullanıldı. PCR tüplerine Sybr Green PCR Master Mix ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklendi. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, daha önceki çalışmalar referans alınarak belirlenen temel dizgelerinin sentezi yaptırılarak (metebion) elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerden her bir reaksiyonda yaklaşık 100 ng (2,5-3 µl) düzeyinde kullanılmıştır. Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı. Bu hesaplamada; $\Delta\Delta Ct = (C_{thedef\ gen} - C_{tNFK\beta})_{denek\ grubu} - (C_{thedef\ gen} - C_{tNFK\beta})_{kontrol\ grubu}$ formülü uygulanarak hesaplanan değer, her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi, misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak NFKB geni kullanıldı ve her bir örneğe ait NFKB gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

3.6.4 Serum TNF α , IL1 ve IL-10 Analizi:

ELISA yönteminin prensibi, özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyona dayanır. Bu teknikte işaretli antijen veya antikor tayin edebiliriz. İşaretli konjugatın hazırlanmasında işaretleyici olarak enzim kullanılır. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra ayırma işlemi yapılır ve ortama bir substrat ilave edilerek spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi ölçülür.

Katı faz (Matriks): Manüel ELISA yöntemlerinde kullanılan, genellikle çukurlarına analitlerin (antikor veya antijen) bağlı olduğu 96 çukurlu mikroplyetlerdir.

Antikor: IgG fraksiyonlarıdır.

Enzim ve substratlar: Konjugatın işaretlenmesinde en sık kullanılan alkalen fosfataz (AP) ve horse-radish peroksidaz (HRP) enzimleridir.

AP için BCIP/NBT (5-bromo-4chloro-3-fosfat indolyl/Nitro mavi tetrazolium)

HRP için TMB (tetramethylbenzidine) kullanılır.

Yıkama: ELISA yönteminde her bir safha arasında fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) ile yıkama işlemi önemli yer tutmaktadır.

Durdurma: ELISA'nın son safhası olan 'reaksiyon durdurulması' basamağında asidik ve bazik çözeltiler (H_2SO_2 , HCL, NaOH) kullanılır.

Kardiyak ventrikülün apeksinden 5 ml kan örneği sarı kapaklı biyokimya tüplerine alındı. Alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra serum süpernatantı deneylerin gerçekleştirileceği güne kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Sıçanlarda bazı immünolojik reaksiyonların tespit edilebilmesi amacıyla ticari olarak satın alınan kitler kullanıldı. Bu kitler;

Serum TNF α , IL-1 ve IL-10 düzeyleri ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile ticari kitler kullanılarak analiz edildi. (Rat IL-1- β ELISA Kit, Elabscience, Catalog No: E-EL-R0012, Rat IL-10 ELISA Kit, Elabscience, Catalog No: E-EL-R0016, Rat TNF- α ELISA Kit, Elabscience, Catalog No: E-EL-R0019)

Deney başlamadan önce 96 kuyucuklu mikroplyetler ve kit içeriğinde yer alan tüm kimyasallar oda ısısına getirildi. İlk 7 kuyucuk kit içeriğinde bulunan standartlar için kullanıldı. Sekizinci kuyucuk ise boş bırakıldı. Diğer kuyucuklara ise 100 μ l serum örnekleri dağıtıldı. Ardından, mikroplyet $37^{\circ}C$ 'de 90 dakika boyunca etüve bırakıldı. Tüm kuyucuklara

100 µl miktarında Biotinylated Detection Antibody eklendikten sonra mikroye t tekrar 37°C’de 60 dakika bekletilmek suretiyle inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından 3 basamaklı yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Yıkama işlemleri tüm kuyucuklara uygulandıktan sonra, 100 µl miktarında HRP konjugat eklenerek mikroye t tekrar 37°C’de 30 dakika bekletilmek suretiyle inkübasyona bırakıldı. Beş tekrarlı yıkama işlemleri gerçekleştirildi ve 90 µl Substrate Reagent tüm kuyucuklara eklenerek 15 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Son olarak, reaksiyonu durdurmak amacıyla tüm kuyucuklar 50 µl stop solüsyonu koyuldu ve spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri kit içeriğinde verilen formüller yardımıyla hesaplandı. TNF α , IL-1- β ve IL-10 sitokin seviyeleri niceleyici olarak tayin edildi.

3.6.5 İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimya, immünolojik kurallara dayanan varlığı araştırılan antijenlere karşı geliştirilmiş, monoklonal veya poliklonal özellikteki antikorlar aracılığıyla dokudaki antijeni gösterme yöntemidir. Çalışmamızda LPS ile indüklenmiş akut akciğer hasarında ortaya çıkan immün hücre yanıtını tespit etmek amacıyla rat akciğer dokularından hazırlanan parafin kesitlerde CD 68 immünohistokimyasal (IHC) boyama yapıldı. Değerlendirmeye tabi tutuldu. Bunun için monoklonal Mouse anti-CD68 (Clone KP. Ready to use, Ventana Medical Systems, Inc. Arizona, USA) antikor kullanıldı.

3.6.6. IHC Boyama Prosedürü

Akciğer dokuları %10’luk tamponlu nötral formalinde 72 saat bekletildikten sonra parafin içine gömüldü. Leica RM2125RT mikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) yardımıyla alınan 4 mikronluk kesitler hazırlandı. IHC protokolü ultraView Universal DAB Detection Kit kullanılarak Roche/ventan (BenchMark Ultra) IHC cihazının otomatik boyama modülü kullanılarak tamamlandı. Pozitif şarjlı lamlar (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) üzerine alınan kesitler deparafinize edilmek için 65 derecede 30 dakika ksilende 30 dakika bekletildi. %96’lık alkol ile muamele edilerek ksilen giderildi. Kesitler 60 derecede etüvde 4 defa 10 dakikalık sürelerle tutuldu. Sonrasında sırasıyla çeşme suyu ve distile ile yıkandı. Antijen geri kazanım işlemine geçildi. EDTA buffer pH 6,0 antijen anmaster (10x, heat induced epitope) solüsyonu kullanıldı. 10 ml sitrat buffer solüsyonuna 90 ml distile su eklenerek dilüe edildi. Lamlar 3 kez sudan geçirildi. Primer antikor CD68 kesitlere, kapatacak şekilde damlatıldı. Sonrasında oda sıcaklığında 2 saat beklenerek kesitler PBS ile 5 dakika yıkandı. Lamlara biotine bağlanacak olan Streptavidin Peroxidase (Kat No: TS-125-HR, Neomarkers, Fremont, CA, ABD) damlatılıp 15 dakika daha bekletildi. Lamlar distile su ile

yıkılarak PBS solüsyonunda 5 dakika daha bekletildi. AEC ile 10 dakika süreyle inkübasyon yapıp ardından distile su ile yıkandı. Mayer Hematoksilen solüsyonunda 1 dakika tutuldu. Zıt boyama sağlandı. Lamlar musluk suyunda yıkanıp, sonrasında %5'lik amonyak solüsyonuna batırıldı. Tekrar musluk suyundan yıkanıp Gliserol jel kullanılarak lamel ile kapatıldı. Preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX43 ve DP21 kamera sistemi) ile değerlendirildi. CD 68 pozitifliğinin saptanabilmesi için x40 objektif ile randomize olarak minimum 10 alan tarandı.

Boyanma yüzdelerine göre skora aşağıdaki gibidir;

- (0) = Boyanma yok
- (1) = < %20 Boyanma
- (2) = %20-40 Boyanma
- (3) = > %40 Boyanma

3.6.7. Histopatolojik İnceleme

Yapılacak histopatolojik inceleme için ratlardan alınan akciğer dokularından kesitler alındı. Formolin ile 24 saat tespit edildi. Sonrasında akciğer spesimenleri örneklendi ve parafine gömülerek her bir parafin örnekten Hemotoksilen & Eozin (H&E) boyaları için 4 µ, immünohistokimyasal boyalar için 3µ kalınlığında kesitler alındı. Akciğer spesimenlerinin rutin işlem sonrasında hazırlanan Hemotoksilen & Eozin kesitlerinde bronşit, talenjiektazi, atelektazi, bronkopnömoni, interalveolar septal konjesyon, intralveolar hemoraji ile lökosit ve lenfosit hücre infiltrasyon vb. patolojik durumlar araştırıldı. Bütün patoloji preparatları aynı patolog tarafından değerlendirildi. Grupların dağılımı ve Ho, H1 hipotezlerinden patoloğa bahsedilmedi. Değerlendirilme esnasında patoloğa eşlik edilerek değerlendirme kayıt altına alındı.

Akciğerlerde gözlenen patolojik değişiklikler 4 skor üzerinden tanımlanarak sınıflandırıldı.

- (0) = Hasar yok
- (1) = Az hasar veya histolojik değişiklikler
- (2) = Orta derecede hasar veya histolojik değişiklikler
- (3) = İleri derecede hasar veya histolojik değişiklikler

3.6.8. Hematoksilen & Eozin Boyama

Tüm gruplardaki sıçanlardan alınan beyinler içinde % 4'lük formaldehit içeren şişelere bırakıldı. Bu amaçla dokular aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

1. Akarsuda yıkama (gün boyu)
2. %70'lik Alkolde 1 gece bekletme,
3. %80'lik Alkolde 1 saat bekletme,
4. %96'lık Alkolde 1 saat bekletme,
5. %96'lık Alkolde 1 saat bekletme,
6. %100'lük Alkolde 1 saat bekletme,
7. %100'lük Alkolde 1 saat bekletme.
8. Ksilende 10 dakika bekletme,
9. Ksilende 10 dakika bekletme.
10. Ksilen + boncuk parafin karışımında 60°C'lik etüvde 1 saat bekletme,
11. Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 1 saat bekletme,
12. Boncuk parafinde 60°C'lik etüvde 2 saat bekletildi.

Daha sonra dokular parafin bloklara gömülerek kesit alınması işlemlerine hazır hale getirildi. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT) ile kesilen 5 µm'lik kesitler cam lamalar üzerine alındı ve boyama amacıyla aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

1. Ksilolde(20 dk.) bekletme
2. Ksilolde (10 dk.) bekletme
3. %80'lik Alkol (10 dk.) bekletme
4. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde (5 dk.) bekletme
5. Çeşme suyunda yıkama
6. Hematoksilen boyasında (1 dk.) bekletme
7. Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarma
8. Eozin solüsyonunda (1 dk.) bekletme
9. Suda (1 dk.) bekletme yıkama
10. %80'lik Alkolde (10 dk.) bekletme
11. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde (10 dk.) bekletme
12. Ksilol serilerinde (20 dk.) bekletildi
13. Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.
14. Işık mikroskobu altında değerlendirme yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemler (frekans, ortalama, ortanca, minimum, maksimum, standart sapma) kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıklar incelenirken normal dağılım gösteren nicel veriler için bağımsız örneklem t testi, normal dağılım göstermeyen nicel veriler için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıklar incelenirken kategorik veriler için Ki Kare ve Fisher's Exact testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık seviyesi için $p < 0.05$ kullanılmıştır. Çalışmamız için yapılan istatistiksel analizlerde tüm parametreler her bir grup için ayrı ayrı değerlendirildi. Çalışma aralığı dışında kalan uçdeğerler ile doku örneklerinin yetersiz olması nedeniyle değerlendirmeyen veriler çalışma dışı bırakıldı.



4. BULGULAR

Çalışmamız randomize olarak 4 gruba ayrılan 36 Wistar rat üzerinde yapıldı.

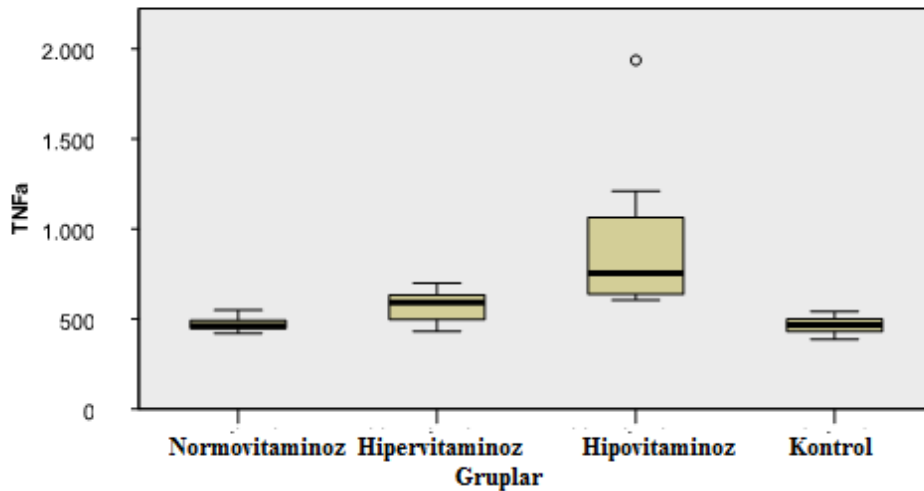
4.1 Serum IL-1, IL-10 ve TNF- α Değerlerinin Analizi

Serum IL-1, IL-10 ve TNF- α düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalarda; 1. ve 3. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanırken ($p < 0,05$), 1. ve 2. grup arasında ($p > 0,05$) ve 2. ve 3. grup arasında ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (Tablo 6).

Tablo 6. IL 1, TNF α ve IL 10 Değerlerinin Gruplara Göre Analizi

	Normovitaminoz (n=10)	Hipervitaminoz (n=10)	Hipovitaminoz (n=10)	Kontrol (n=6)	<i>p</i>
IL 1	601,47 \pm 82,64	622,98 \pm 64,98	935,32 \pm 322,69	374,87 \pm 30,7	0,02
TNFα	471,3 \pm 37,17	568,86 \pm 88,13	898,6 \pm 411,77	481,53 \pm 59,22	0,01
IL 10	173,08 \pm 51,41	173,39 \pm 53,54	87,67 \pm 34,12	38,85 \pm 6,36	0,01

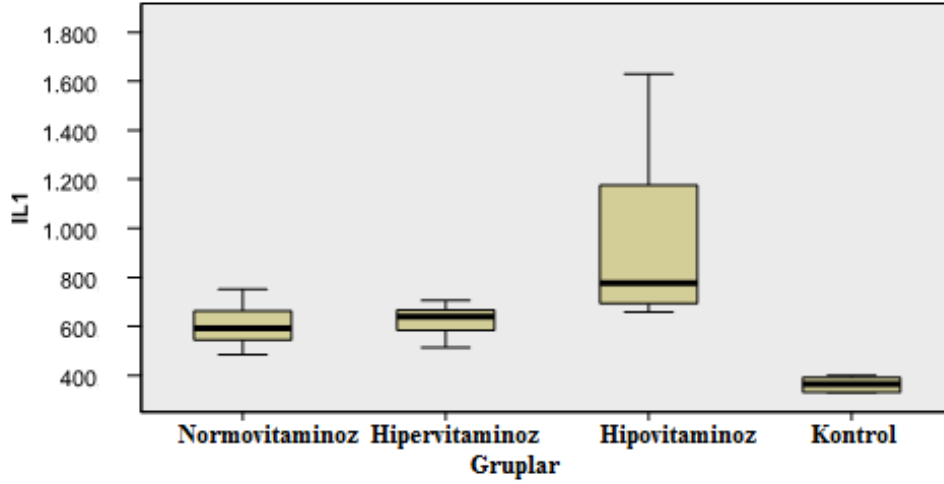
Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.
IL 1: İnterlökin 1, TNF α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa, IL 10 :İnterlökin 10.



Grafik 1. Gruplar arasında TNF- α dağılımı

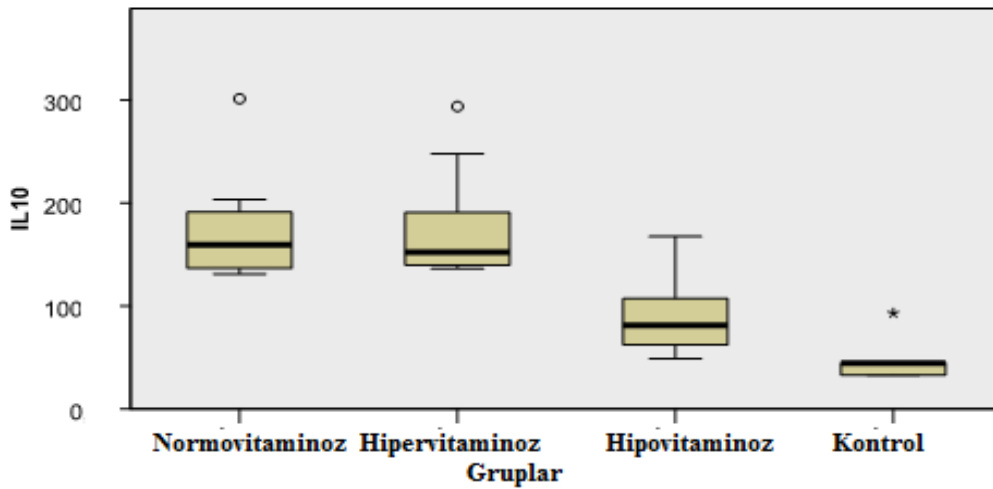
Serum TNF- α düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalarda; 1. ve 3. grup arasında istatistiksel

olarak anlamlı farklılıklar saptanırken ($p < 0,05$) , 1. ve 2. grup arasında ($p > 0,05$) ve 2. ve 3. grup arasında ($p > 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (Tablo 6). Serum TNF- α değerlerinin gruplara göre dağılımı Grafik 1’de gösterilmektedir



Grafik 2. IL-1 gruplar arası dağılımı

Serum IL-1 düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p = 0,02$). Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda; 1. ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ($p > 0,05$), 1. ve 3. grup arasında ($p = 0,034$) ve 2. ve 3. grup arasında ($p > 0,05$) istatistiksel olarak farklılık görülmedi.



Grafik 3. IL-10 Gruplar arası dağılım

Serum IL-10 düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p=0,01$). Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda; 1. ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ($p>0,05$), 1. ve 3. grup arasında ($p=0,044$) ve 2. ve 3. grup arasında ($p=0,049$) istatistiksel olarak farklılık görüldü.

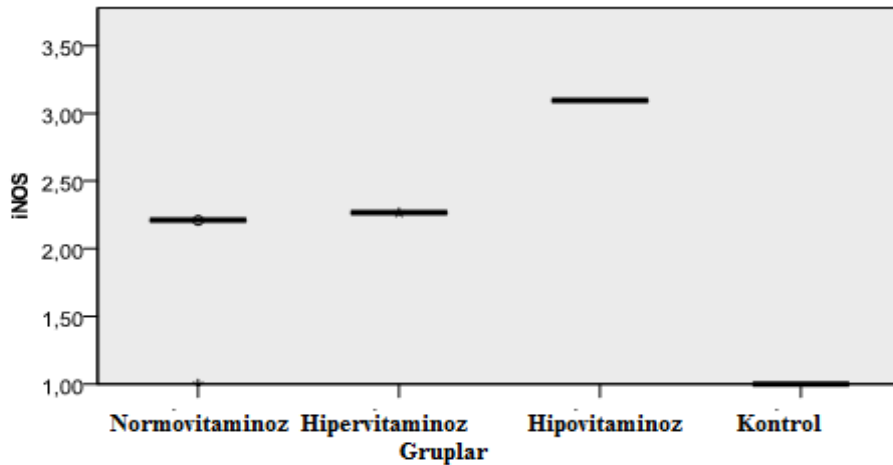
4.2 Dokudaki iNOS ve NFK β Değerlerinin İstatistiksel Analizi

Dokuda PCR ile elde edilen iNOS ve NFK β düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p=0,01$) (Tablo 7).

Tablo 7. iNOS ve NFK β Değerlerinin Gruplara Göre Analizi

	Normovitaminoz (n=10)	Hipervitaminoz (n=10)	Hipovitaminoz (n=10)	Kontrol (n=6)	<i>p</i>
NFKβ	1,29 \pm 0,04	1,70 \pm 0,01	1,91 \pm 0,01	1 \pm 0,01	0,01
iNOS	2,09 \pm	2,27 \pm 0,01	3,1 \pm 0,01	1 \pm 0,01	0,01

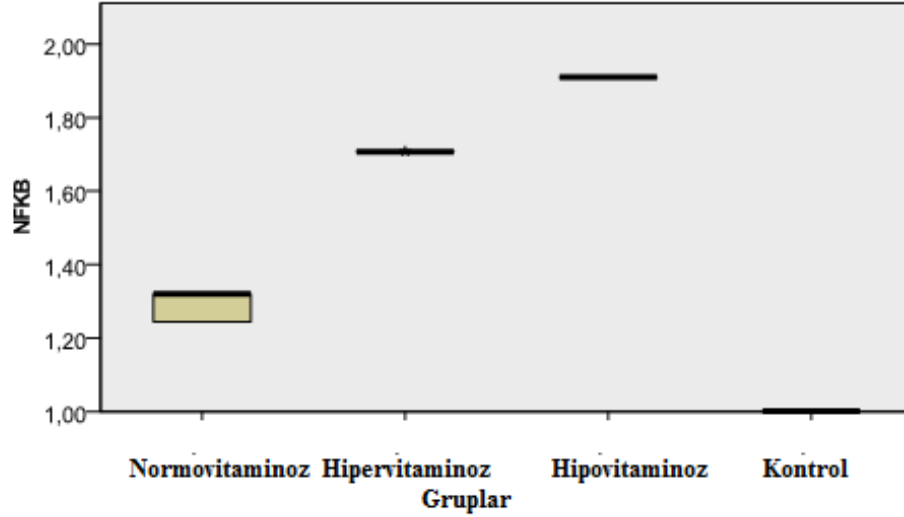
Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.
NFK β : Nükleer Faktör Kappa B, iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz



Grafik 4. Gruplar iNOS arası dağılımı

Dokuda PCR ile elde edilen iNOS düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p=0,01$). Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda; 1. ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ($p>0,05$), 1. ve 3. grup

arasında ($p=0,01$) ve 2. ve 3. grup arasında ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi.



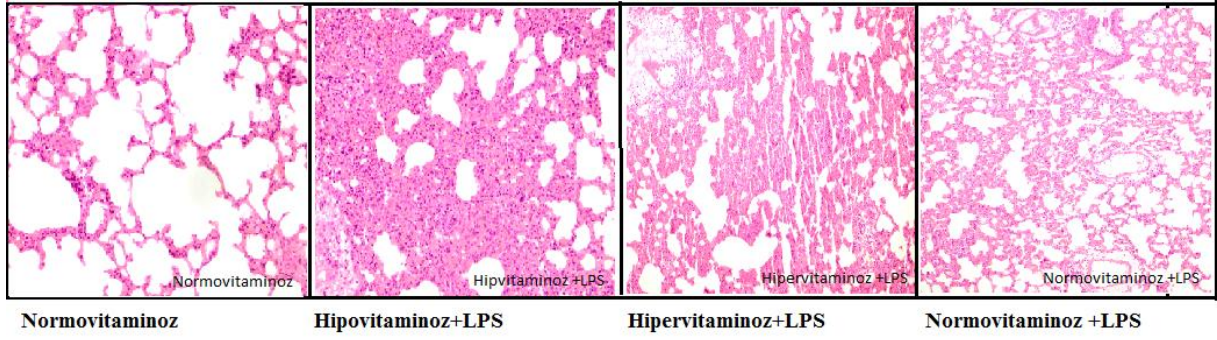
Grafik 5. Gruplar arasında NFKB dağılımı

Dokuda PCR ile elde edilen NFKB düzeyleri için yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p=0,01$). Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda; 1. ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı ($p>0,05$), 1. ve 3. grup arasında ($p=0,01$) ve 2. ve 3. grup arasında ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi.

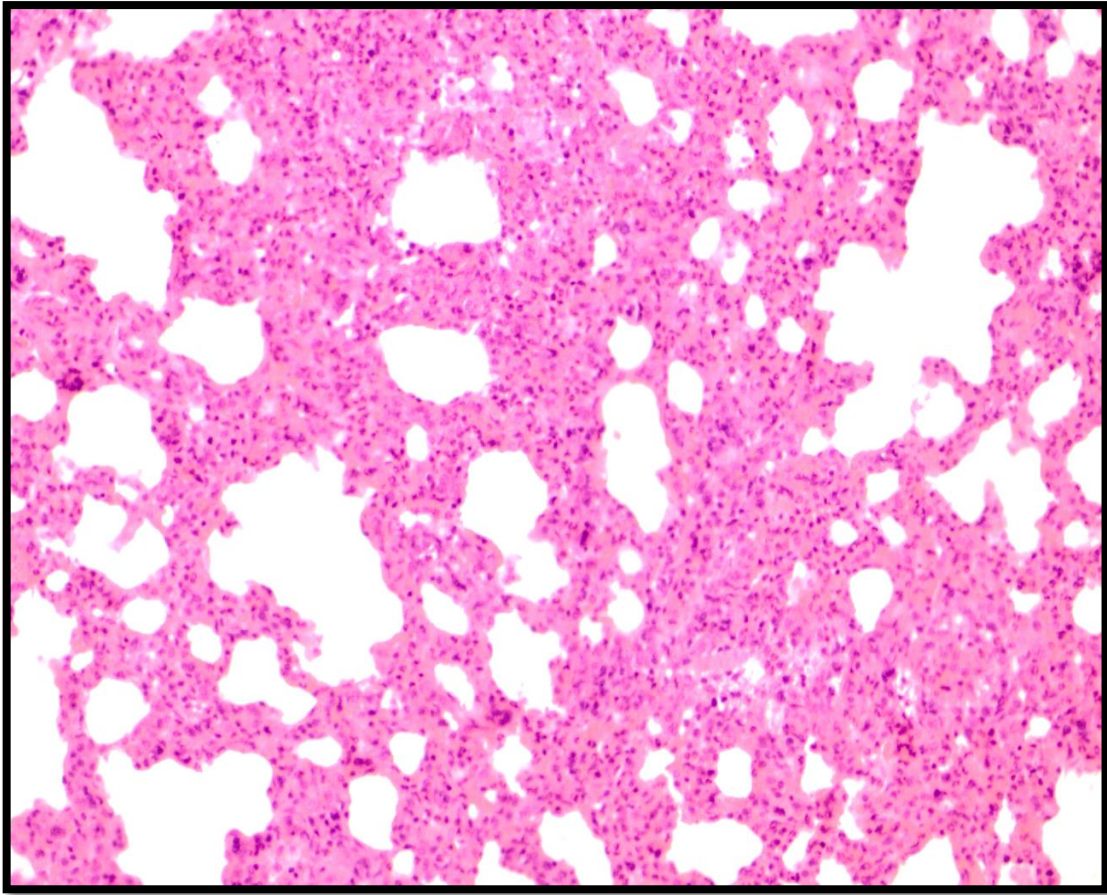
4.3. Akciğer Histopatolojisi

Akciğer dokusunun ışık mikroskopunda histopatolojik hemotoksilen eozin (H & E) incelemesi yapıldı. İncelemede lökosit ve lenfosit hücre infiltrasyonu ile alveolar kollaps, intraalveolar septal kanama, intraalveolar septal konjesyon ve telanjiektazi durumları değerlendirildi (Resim 3, 4, 5, 6, 7).

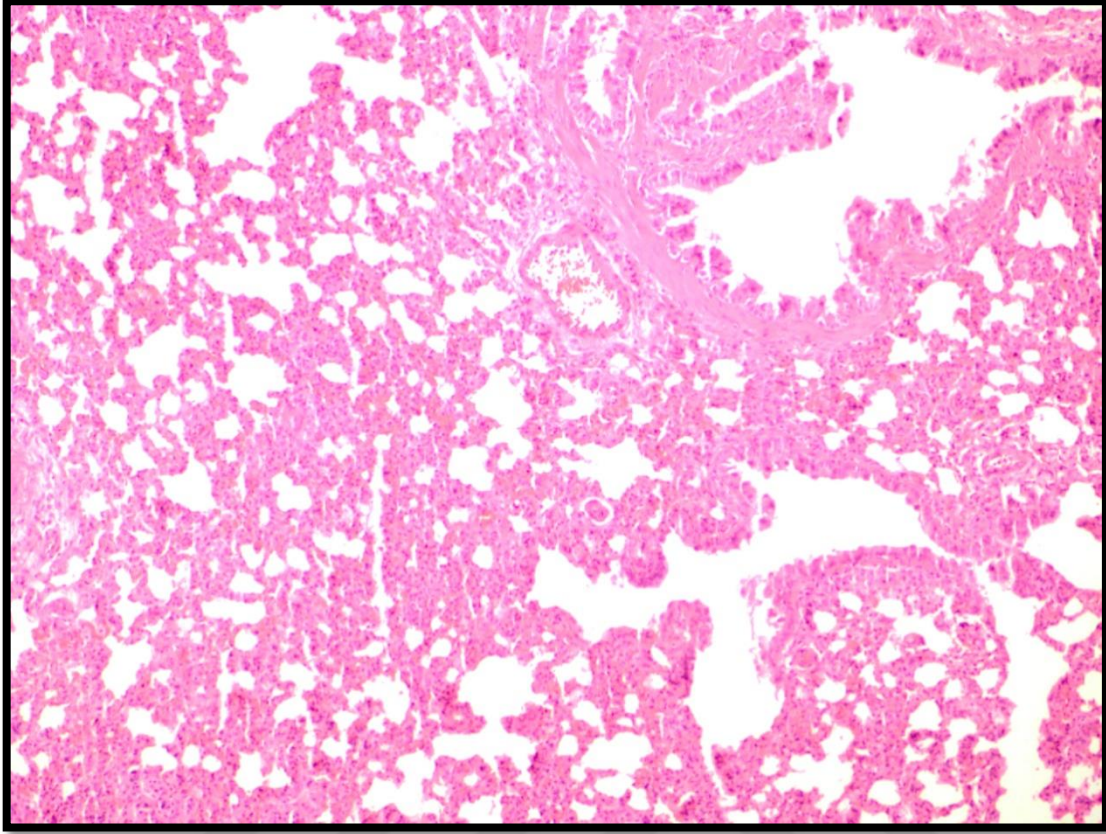
Tüm histopatolojik parametreler bir arada değerlendirildiğinde elde edilen toplam histolojik skor ortalamalarına göre gruplar arasında farklılıklar saptandı. Yapılan değerlendirme sonucu; ağır-orta derece hasarlanmanın sadece hipovitaminoz grubunda olduğu görüldü. Hipovitaminoz grubunda hafif derecede histopatolojik değişikliklerin en az sıklıkta olduğu saptandı. Buna karşın normovitaminoz ve hipervitaminoz gruplarında ağırlıklı olarak hafif histopatolojik değişikliklerin olduğu gözlemlendi (Resim 3).



Resim 3. Gruplara Göre Akciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi (H&E, x20). Hipovitaminoz grupta hasarın daha şiddetli olduğu görülmektedir.

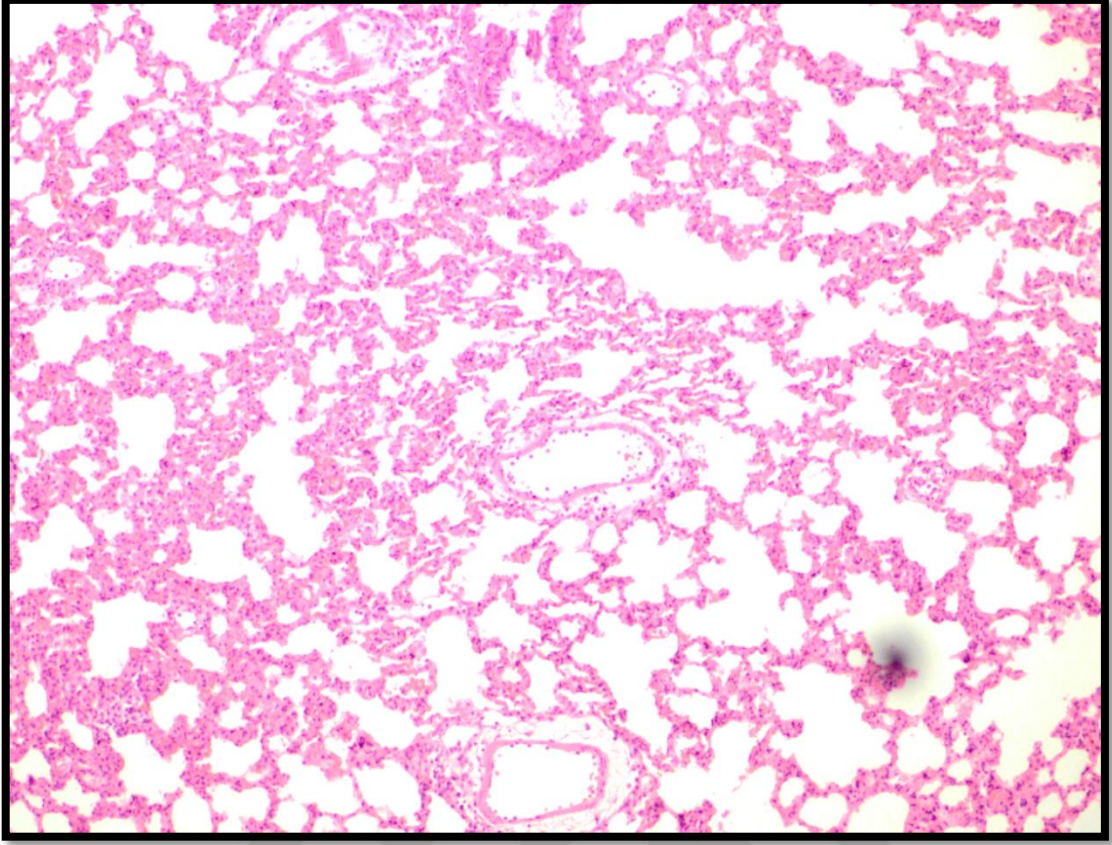


Resim 4. Grup 3'den (hipovitaminoz) Alınan Akciğer Dokusunun Histopatolojik Görüntüsü (H&Ex20). Alveoller arası septalarda genişleme, interstisyel aralıkta yoğun mikstip iltihabi hücre infiltrasyonu (özellikle nötrofil), alveolar destrüksiyon izlenmektedir. İnflamasyon skoru 3 idi. Yoğun lenfoid agregat görünümü saptandı.

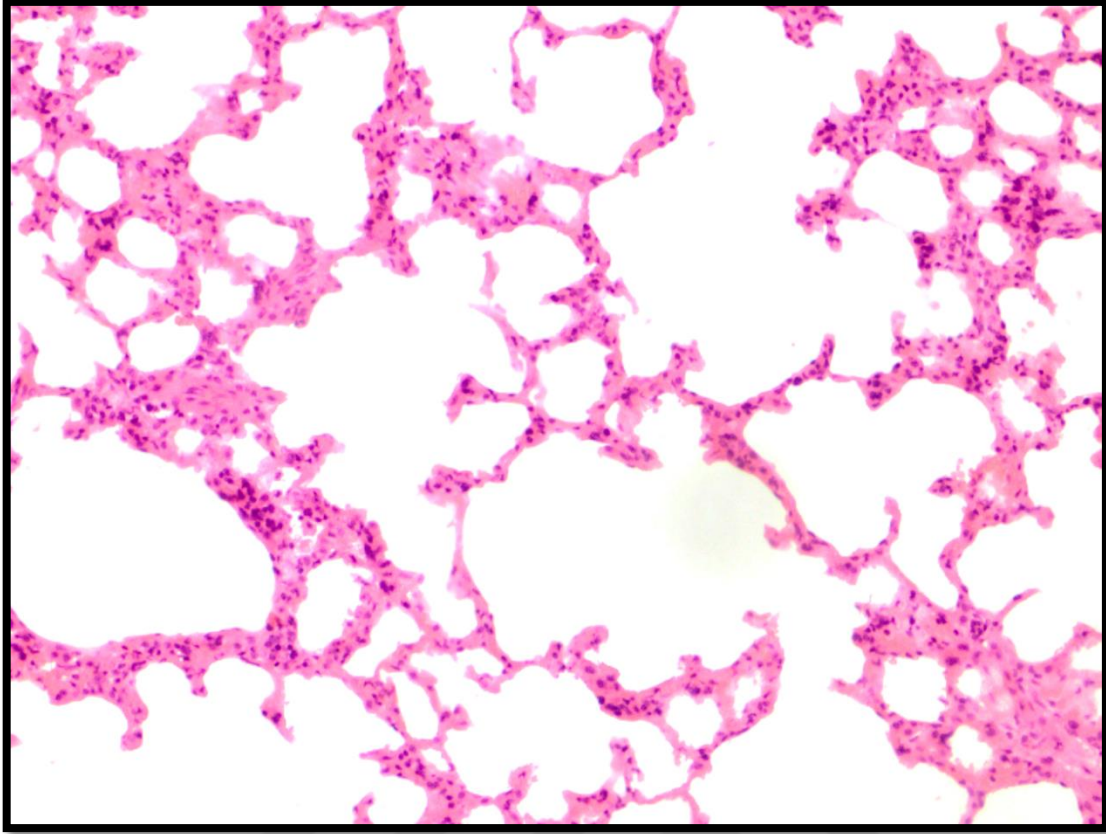


Resim 5. Grup 2'den (hipervitaminoz) Alınan Akciğer Dokusunun Histopatolojik Görüntüsü (H&E x20). İnteralveolar stromada lökosit infiltrasyonu Hipervitaminoz + LPS grubunda alveoller arası septalar genişleme daha az olup, alveolleri destrükte ederek ortadan kaldıran yoğun miks tip iltihabi hücre infiltrasyonu interstisyel aralıkta izlenmekle birlikte bu oran daha azdır. Çok sayıda nötrofil ve arada eozinofil lökositler dikkati çekmektedir.

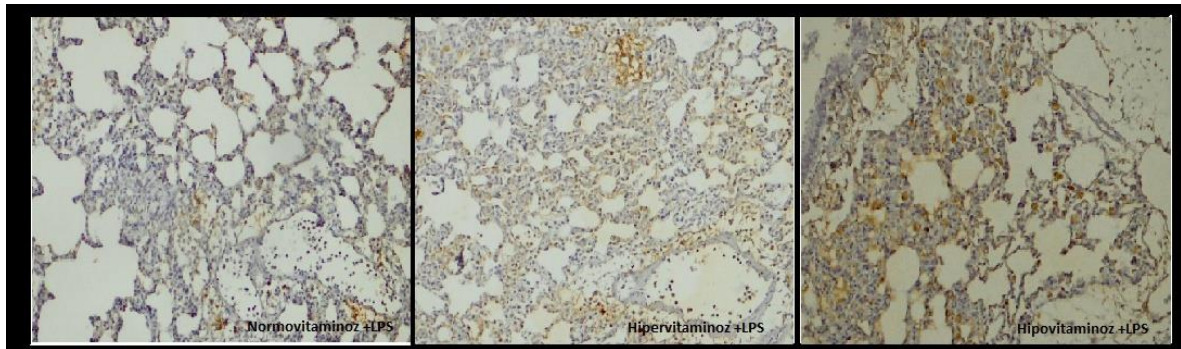
Hipervitaminoz +LPS grubunda fokal alanlarda aktif inflamasyon, vasküler konjesyon gözlemlendi. İnflamasyon skoru 2 olarak belirtildi.



Resim 6. Alveoller arasında orta hafif inflamasyon (H&E x10). Normovitaminoz + LPS grubunda eksuda kitleleri, aktif iltihabi değişiklikler izlenmektedir. İnflamasyon skoru 1.



Resim 7. Grup 1'den (normovitaminoz) Alınan Akciğer Dokusunun Histopatolojik Görüntüsü (H&E x20). Alveoller arasında hafif inflamasyon. Normovitaminoz grubunda eksuda kitleleri, aktif iltihabi değişiklikler, destrüktif görünümizlenmedi. İnflamasyon skoru 1. Normovitaminoz, negatif kontrol grubunda inflamasyon izlenmedi. İnflamasyon ve buna destrüktif yanıtı dair bulgu görülmedi.



Resim 8. Gruplara Göre Akciğer Dokusunun İmmünohistokimyasal İncelenmesi (CD68x20) Normovitaminoz ve hipervitaminoz grupta sadece fokal boyanma alanları mevcutken, hipovitaminoz grupta yoğun boyanma alanları dikkati çekmektedir.

Tablo 8.Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Analizlere Göre Grupların İnflamasyon Skorları

	Grup 1 (Normovitaminoz)	Grup 2 (Hipervitaminoz)	Grup 3 (Hipovitaminoz)
H&E Boyama ile İnflamasyon Skoru	1	2	3
CD 68 Boyama ile İnflamasyon Skoru	1	2	3

5. TARTIŞMA

Sepsis ve ARDS yoğun bakımlarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. ARDS ileri solunum yetmezliği ile seyreden mekanik ventilatör ihtiyacına yol açan ciddi bir restriktif hastalıktır. Literatürdeki çalışmalarda ARDS'nin etiolojisinin, ek hastalık varlığının, mevcut akut organ yetmezlikleri sayısı ve şiddetinin, sepsis, septik şok, barotravmaya sekonder pnömotoraks birlikteliğinin mortalite oranları üzerine etkili oldukları gözlenmiştir. Ayrıca PaO₂/FiO₂ oranı, pH düzeyi, SOFA, SAPS, APACHE II skoru gibi parametrelerin prognoza dair öngörülerde kullanılabilir olduğundan bahsedilmiştir (84,85). Septik şok yoğun bakım ünitelerinde sık rastlanan bir sendromdur. Bu inflamatuvar sendromun majör komplikasyonu organ yetmezlikleridir (90, 91). Özellikle de sepsis ve inflamatuvar sürecin odağı akciğerler ise yetmezliğe giren ilk organ olarak akciğerler karşımıza çıkar. Akut akciğer hasarı ile ağır sepsis, septik şok birlikteliği morbidite ve mortalite oranlarının artmasına neden olur (12, 13, 14). Ağır sepsis, Septik şok tablosuna eşlik eden akut kardiyovasküler sistem yetmezliğinin doku perfüzyonunda bozulmaya neden olduğu, ARDS'deki inflamatuvar hasarın iyileşmesinde gecikmeye yol açtığı bilinmektedir. Sepsise bağlı ensefalopati de hastaların yoğun bakımda kalış süresini ve mekanik ventilatöre bağlı kalma süresini dolayısı ile ventilatöre bağlı akciğer hasarı oluşumunu artırdığı görülmüştür. Kronik kalp yetmezliği, siroz gibi bilinen kronik organ yetmezliği tanıları olan ve ağır sepsis/septik şok birlikteliği gösteren ARDS hastalarında prognozun daha kötü ve mortalite oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Yoğun bakıma yatırılan kritik hasta grubundaki ARDS prevelansının %5-15 arasında değiştiği gözlenmiştir(85, 86, 87, 88). Avrupa yoğun bakım ünitelerinde gerçekleştirilen ALIVE çalışmasında, kabul edilen hastaların %7,1'inde ve mekanik ventilasyon tedavisi alan hastaların da %16,1'inde akut akciğer hasarı (ALI) saptanmıştır. ALI hastalarının % 55'inin ARDS ye ilerlediği gözlenmiştir (12). Rubenfeld ve ark. tarafından yapılan meta-analizde; ARDS mortalite oranının % 41 ile %60 arasında değiştiği bildirilirken, ALIVE çalışmasında ARDS'nin mortalitesi %57,9 olarak tespit edilmiştir (12, 89).

DeneySEL çalışmamızda, yukarıda bahsedilen faktörlerin dışında birbirinden farklı VD düzeylerinin yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan sepsis ilişkili ARDS hastalarında mortalite ve morbidite üzerine etkileri olup olmadığını gözlemlemek hedeflenmiştir. Bu çalışmada amaç sitokin fırtınası süreci olarak değerlendirebileceğimiz sepsis+ septik şok+ ARDS dönemlerinde VD'nin immünomodülatör olup olmayacağını değerlendirmek idi.

Direkt yolla oluşan akciğer hasarına bağlı gelişen olgular primer (pulmoner) ARDS olarak tanımlanırken, akciğer dışı nedenlere bağlı gelişen durumlara sekonder (ekstra pulmoner) ARDS olarak tanım getirilmiştir. 2003 yılında Goss ve ark. yaptığı çalışmada primer akut akciğer hasarında klinik bulguların daha ağır olduğu gösterilmiştir. Prognoz açısından değerlendirildiğinde ise kötü bir prognoza sahip oldukları, sağ kalım oranlarının sekonder olgulara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda daha ağır klinik oluşturabilmek amacıyla insüflasyonla LPS verilerek primer ARDS oluşumu sağlandı. Bu amaçla da ratlarda sepsis ve akut akciğer hasarı oluşturuldu (12, 86, 87, 88).

ARDS'de mortaliteyi arttıran faktörlere baktığımızda; ileri yaş, kronik karaciğer hastalığı, akciğer dışı organ yetmezliği, sepsis, çoklu organ yetmezliği ilk akla gelenlerdir. ALIVE çalışmasında yaş ile ilintili olarak benzer yönde değişikliklerin olduğu, ARDS'de yaş arttıkça mortalite oranının yükseldiği saptandı(12) Ancak Gong ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada çoklu travma ve septik şok mevcudiyetinde mortalitenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (125). Yapılan diğer çalışmalarda gözlenildiği üzere Alzheimer, demans, serebrovasküler hastalık gibi kronik santral sinir sistemi hastalıkları ve kardiyovasküler problemleri mevcut ARDS hastalarında, hastalığın şiddeti açısından dikkatli olunmalı ve destek tedavilerinin başlanmasında gecikmeler önlenmelidir (12, 89).

Sepsis ve ARDS birlikteliğinde destek tedavilerinin değerlendirilmesi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Genel olarak ARDS hastalarında kanıtlanmış olan koruyucu mekanik ventilatör stratejilerinin, sıvı resüstasyonu ve inotrop desteğinin yoğun bakım öncesi süreçte en uygun şartlarda uygulanamaması, altta yatan etiyolojik etkene yönelik doğru tedavinin zamanında başlanamaması nedeni ile ağır sepsis/septik şok geliştiği düşünülmektedir. Sonuç olarak ARDS hastalarının yoğun bakıma geliş sürecinin uzadığı, destek tedavilerin ideal ölçülerde verilmediği durumlarda mortalite oranlarının arttığı düşünülmektedir. Uygunsuz mekanik ventilatör stratejilerinin kollabe alveoller üzerinde oluşturduğu hasar üzerine yayınlar yapılmış olup, olası mekanik ventilatör ilişkili akciğer hasarında mevcut inflamatuvar şiddet artabildiği gibi yeni bir inflamatuvar yanıtta oluşturabilir. Düşük tidal volüm, optimum PEEP gibi akciğer koruyucu mekanik ventilatör stratejileri gündeme getirilmiştir (39,45, 46, 47, 50, 51, 123).

Çalışmamızın asıl hedefi VD tedavisinin ARDS destek tedavileri arasına girip girmeyeceğini araştırmak oldu. Çünkü VD eksikliği bir pandemi olarak adlandırılacak kadar sık görülmektedir. Ve bu yüksek epidemiyolojik oranlar ARDS hastalarının tedavisinde göz önünde bulundurulmalıdır. Bir hormon olarak işlev gören parakrin etkili VD'nin akciğer

maturasyonu, doku onarımı, düz kas hücre proliferasyonu ve diferasyonu üzerine etkilerini değerlendiren VD eksikliğinin astım vb. hastalıklarla ilişkili olduğunu ifade eden çalışmalar mevcuttur (92, 93, 94, 95). Yine bu çalışmalarda intrauterin VD eksikliğinin çocukluk çağı astımı ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada VD replasmanı ile astım semptomlarının hafiflediği görülmüştür (92, 93, 94, 95, 124).

VD vücuda iki kaynaktan sağlanır. Bunlar diyet ve 290-315 dalga boyu arasında gün ışığı maruziyeti sonrası ciltte başlayan üretim zinciridir. Epidermal hücrelerde bulunan UVR'i güneş ışığına maruz kaldıktan sonra ergosterolün fotoliz ürünlerinden VD üretimini uyarır. VD sentez süreci başlar. Bu sürecin kontrolü pitüiter gland ve karaciğer, böbrek fonksiyonları üzerinden yapılır.

VD görevini Ca-P homeostazisi üzerinde ifa ederken bir yandan da steroid yapılı bir hormon davranışı gösterir. Hücre zarından geçerek nükleusta spesifik mRNA'lara ulaşır. Gen ekspresyonunda rol oynar. VD'nin genomik işlevi lenfokinler, onkogenler, poliaminler ve kalsiyum bağlayıcı protein gibi ürünlerin biyosentezini açıklar. VD oksidatif strese karşı hücre membranını ve hücre proteinlerini koruma görevini lipid membrana peroksidaz atağını inhibe ederek gösterir. VD bir yandan kanser hücrelerinde apoptozisi uyarırken, diğer yandan da endojen ve eksojen etkileri ile DNA'nın ikili sarmal yapısını koruyarak kromozomal yapının stabilizasyonunu sağlar. Ayrıca VD yetişkin alveoler tip II hücrelerin ihtiyacı olan DNA sentezini uyarır. Bu mekanizma üzerinden epitelyal hücre çoğalmasını, farklılaşmasını sağlar ve DNA hasarını onarır (96, 97, 98). Antioksidanlar DNA hasarı oluşmasını engelleyici etkiye sahiptir. Ancak antioksidanların lipid peroksidaz üzerindeki süprese edici etkilerinin sınırlı olması nedeniyle DNA hasarının azaltılmasındaki fonksiyonları da kısıtlıdır. VD de lipid peroksidazı süprese ederek antioksidanların fonksiyonlarına katkıda bulunur. Lizozomal membranı stabilize eder ve nükleus yapısı üzerinde koruyucu etki gösterir. Bu işlevi demir bağımlı peroksidasyonun inhibisyonu üzerinden gösterir (99, 100, 101, 102).

İngilterede Cheng-Shuin He ve ark. yaptığı derlemede gösterildiği üzere VD eksikliği olgularında, VD desteğinin mortaliteyi azaltıcı etkileri mevcuttur (103). Biyolojik veriler VD'nin antiinflamatuvar özellikler sergilediğini göstermiştir. Sadegeshi ve ark. yaptığı çalışmada bu işlevi monositlerin TLR'e sunumunda down regülasyon ile sağladığı hiporesponsif bir yanıtı bahsetmektedir. Sitokinler üzerinden seyreden bu hiporesponsif yanıtla birlikte, membran stabilizasyonu ve antimikrobiyal özelliklerinden bahsedilmektedir. Çalışmamız ile karşılaştırıldığında çalışmamızda daproinflamatuvar sitokinlerin regülasyonunda benzer sonuçlar gözlenmiştir (103, 104, 105, 106, 107, 108).

VD eksikliği, kritik hastalarda yoğun bakım yatış süresini arttırmaktadır (109, 110). McKinney ve ark. yaptığı çalışmada düşük VD düzeylerinin kısa ve uzun dönemde mortaliteyi arttırdığı saptanmıştır (111). Barnett ve ark. 478 hasta içeren çalışmada benzer sonuçlar elde etmiş ve ALI/ARDS şiddeti ile VD eksikliği arasında sıkı bir ilişkiden bahsedilmiştir (113).

Dancer ve ark. yaptığı çalışmada ise serum VD düzeyleri ile ARDS oluşma riski üzerine anlamlı bir ilişki saptanmış, yine aynı çalışmada preoperatif serum VD düzeyleri ile postoperatif ARDS oranları arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir. ARDS oluşan hastalarda VD düzeyleri normal olan gruba nazaran, VD eksikliği mevcut grupta ilk bir ay içinde mortalite oranlarında anlamlı artıştan bahsedilmiştir (114). Bu çalışmada ayrıca LPS ile oluşturulan akut akciğer hasarı sonrası bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısında TNF α düzeyleri ölçülmüştür. Bizim çalışmamız ile de paralel olarak hipovitaminoz gruptaki serum TNF α düzeylerinde artış tespit edilmiştir (114).

Ashtari ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 94 multipl sklerozis hastasında VD replasmanı sonrası antiinflamatuvar bir sitokin olan IL 10 değerleri ölçülmüştür. Otoimmün bir süreç olan MS'te VD replasmanı sonrası IL 10 düzeylerinde artış görülmüştür (115). Bu sonuç bizim çalışmamızda ki hipovitaminoz ve hipervitaminoz grupları arasındaki IL 10 düzeyleri ile benzerlik taşımaktadır. Bizim çalışmamızda da hipovitaminoz grubu IL 10 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanırken, normovitaminoz grupta ise IL 10 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır.

VD eksikliğinde, inflamatuvar süreçteki proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF α) artışının şiddetli olacağından bahsedilmiştir. VD düzeyleri fizyolojik sınırlara geldiğinde proinflamatuvar sitokinlerde bir down regülasyon gelişmesi beklenmektedir. Muller ve ark. LPS ile indüklenen timosit hücre kültüründe yaptıkları çalışmada kültür ortamına VD eklemiş, IL-6 sekresyonunda azalma yaptığını gözlemişlerdir (116). Thien R ve ark.'nın interlökin-4 (IL-4) pozitif hücre kültüründe yaptıkları çalışmada kültür ortamına eklenen D vitamininin IL-4 pozitif hücrelerin proliferasyonu arttırdığını göstermişlerdir (117). VD'nin IL-6 sekresyonunda artma yaptığını ancak bu oluşan IL-6'nın Th1 farklılaşmasında inhibisyon, Th2 farklılaşmasında exitasyon yaptığını görmüşlerdir (117). Bizim çalışmamızda da buna paralel olarak çalıştığımız proinflamatuvar sitokinlerin (IL 1, IL 10) düzeyleri hipovitaminoz grupta yükselirken normovitaminoz grupta göreceli olarak daha düşük seyretti.

Hohman ve ark.'nın artık tarihsel değeri olan çalışmalarında VD'nin NFK β 'nin biosentezini down regüle ettiği gösterilmiştir. Çalışmamızda da hipovitaminoz grubuyla

diğer grupların NFK β düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu, NFK β düzeylerinin hipovitaminoz grupta daha yüksek olduğu gözlemlendi .

Dulla ve ark. yaptıkları çalışmada, oksidatif hasarın sonucunu gösteren bir parametre olan iNOS üretiminin VD tarafından baskılandığını göstermişlerdir. VD'nin düşük olduğu durumlarda oksidatif hasar şiddetinde artış söz konusudur (126). Çalışmamızda VD düzeyi düşük grupta iNOS ölçümleri yüksek çıkmıştır. Bu açıdan bakıldığında çalışmamız benzer sonuçlar içermektedir.

ARDS'de gözlenen histopatolojik değişiklikler üzerine yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere akut dönemde akciğerlerde önce nötrofil infiltrasyonu sonrasında vasküler permeabilite artışı saptanır. Bunu takiben proinflamatuvar sitokinler tarafından makrofajlar uyarılır. Akciğerlerde İnterstitiyel bölgelerde belirgin düzeyde ödem görülür. Kronik dönemde ise diffüz hücre ölümü fibrozis gelişir. Shi Y ve ark. yaptığı çalışma nötrofil infiltrasyonu, intersitiyel ödem VD eksikliği mevcut ratlarda yüksek seyretmiştir (128). Bizim çalışmamızda ARDS'nin akut fazı değerlendirilmiş olup yapılan H&E ve CD68 boyamalarında interstitiyel ödem, nötrofil infiltrasyonu ve makrofaj hakimiyeti görüldü. Bu değişiklikler hipovitaminoz grupta daha yoğun olarak gözlenmiştir. Bu açıdan çalışmamız Shi Y. ve ark.'nın çalışması ile uyumludur.

Özetle anti inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 hipovitaminoz grupta düşük seyretmiştir. Proinflamatuvar özellikteki TNF α , IL-1 ise hipovitaminoz grupta daha yükseklere çıktığından; yetersiz VD'nin proinflamatuvar sitokinler üzerine down regülasyon işlevini yerine getiremediğini düşünmekteyiz. Ayrıca hipovitaminoz gruptaki yüksek iNOS oksidatif hasarı desteklerken, yüksek NFK β de agreeve iltihabi yanıtı desteklemiştir. İmmünohistokimyasal değerlendirmede de hipovitaminoz grupta görülen enflamatuvar değişikliklerin daha şiddetli seyrettiği görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

ARDS yoğun bakımlarda sık karşılaşılan önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. ARDS, ağır sepsis ve septik şok birlikteliğinde mortalite oranları daha da artmaktadır. Sepsise bağlı sitokin fırtınasında meydana gelen kısır döngü ile birlikte süreç çıkmaza girmektedir. Yine ARDS hastalarında uygunsuz mekanik ventilatör stratejileri inflamatuvar yanıt oluşturmakta ve/veya bu mevcut inflamatuvar yanıtın şiddetini arttırmaktadır. Bir immünomodülatör olarak görev alan VD'nin bu süreçte proinflamatuvar sitokinler(IL-1, IL6,TNF α , vb.) üzerine inhibisyonu, antiinflamatuvar sitokinler (IL-10,IL-4, vb.) üzerine uyarıcı etkileri ARDS'nin sitokin fırtınası üzerinde faydalı etkiler oluşturabilir. VD bir yandan olası mikrobiyal ajanların fagositozunu stimüle ederken, bir yandan da aşırı sitokin salınımını düzenleyebilir. Bu nedenle akut akciğer hasarı gelişen hastalarda erken tanı ve yoğun bakım desteği sağ kalımı artırmaktadır. Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan akciğer hasarının birbirinden farklı VD düzeylerinde moleküler seyri incelendi. Normovitaminoz grup ile hipovitaminoz grup arasında oksidatif hasar ve inflamatuvar ürünler açısından yapılan istatistiksel analiz sonuçları ($p<0.05$) anlamlı olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarla VD eksikliğinin akciğer hasarında şiddeti arttırdığı kanısına vardık. Dolayısıyla ARDS hastalarında inflamasyonun baskılanması, sitokin fırtınasının kontrol altına alınması pulmoner hasar şiddetinin kontrolü açısından VD'nin kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

7. ÖZET

Amaç: ARDS çoğunlukla sepsis nedeniyle abartılı bağışıklık sistemi yanıtı ile seyreden bir süreçtir. Deneysel çalışmamız birbirinden farklı D vitamini (VD) düzeyleri olan ratlarda lipolisakkarit ile indüklenen akciğer hasarı düzeylerini incelemek, VD hipovitaminozunda akciğer hasarının şiddetinin artıp artmadığını araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Kafkas Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu (HADYEK) onayı alındıktan sonra, ağırlığı ~300 gr olan 36 adet wistar cinsi rat 4 gruba ayrıldı. Gruplar; ad libitum ile beslenen Normovitaminoz+ Lipopolisakkarit (LPS) grubu (Grup 1; n=10), Hipervitaminoz + LPS grubu (Grup 2; n=10) ve Hipovitaminoz grubu+ LPS (Grup 3; n=10), Normovitaminoz grubu (Grup 4; n=6 Negatif kontrol grubu) olarak belirlendi. 4 haftalık wistar cinsi ratlar 12. haftaya kadar beslenerek grupların hedef VD düzeylerine ulaşması sağlandı. D vitamini hipovitaminozuna sokulmak istenen Grup 3 mutlak karanlık ortam koşulları sağlanarak VD'den yoksun diyetle beslenerek takibe alındı. 10 haftanın sonunda kuyruk venlerinden alınan kan örneklemeleriyle biyokimyasal olarak D vitamini düzeylerini saptandı.

Nazal insüflasyon ile LPS verildikten sonra klinik takibe alınan ratlar çalışmanın 6-12. saatinde anestezi altında sakrifiye edildi. ELISA için sol atriumdan kan örneklemeleri yapıldı. Sol akciğerler H&E ve CD 68 boyama için kullanılırken, sağ akciğerler NFKβ ve iNOS çalışmaları için kullanıldı.

Bulgular: Histopatolojik olarak yapılan incelemede akciğer dokuları karşılaştırıldığında normovitaminoz grubun akciğerleri hipovitaminoz gruba göre daha sağlıklı olarak değerlendirildi. Hipovitaminoz grubunda IL1, TNFα düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek seyretti (p=0,02, p=0.01). IL10 düzeyleri hipovitaminoz grubunda anlamlı olarak düşük bulundu (p=0,01). iNOS ve NFKβ düzeylerinin ise hipovitaminoz grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek seyrettiği gözlemlendi (p=0,01).

Sonuç: Hipovitaminoz gruba oranla diğer iki grupta (hipervitaminoz, normovitaminoz) aşırı immün yanıtın sınırlandığı saptandı. Hipovitaminoz grupta LPS ile indüklenen akciğer hasarının daha şiddetli olduğu, hem histopatolojik olarak hem de ELISA ve PCR ile gösterildi.

ABSTRACT

Aim: ARDS is a disease that mostly related with increased alveoli-capillary permeability caused by exaggerated inflammatory response which occurs after sepsis. Our experimental study aims to investigate the degree of lung injury induced with lipopolysaccharide (LPS) on rats which have different levels of vitamin D.

Materials and Methods: Study approval was received from Kafkas University Ethical Committee of Experimental Animal Studies (HADYEK). Approximately 300g weightened, 36 Wistar rats were divided into 4 groups and fed ad libitum Normovitaminosis + LPS (Group 1; n=10), hypervitaminosis + LPS (Group 2; n=10), hypovitaminosis + LPS (Group 3; n=10), and normovitaminosis (Group 4; n=6 negative control group). 4 weeks old Wistar rats fed for 12 weeks to achieve target VD levels. Hypovitaminosis group was generated with low VD diet and hosted in darkness. VD levels studied biochemically by analysing blood samples from tail veins at the end of week 10. All rats received LPS with nasal insufflations and observed for 6-12 hours before sacrifice. Blood samples that taken from left atrium was used for ELISA. Left lungs were used for H&E and CD 68 staining, right lungs were used for NFK β and iNOS examinations.

Measurements: Hypovitaminosis group showed more pathological findings after histopathologic examinations according to other groups. IL1, TNF α levels in the hypovitaminosis group were statistically significantly higher ($p = 0.02$, $p = 0.01$) rather than other groups. IL10 levels were significantly lower in the hypovitaminosis group ($p = 0.01$). There was a statistically significant increment in iNOS and NFK β levels in hypovitaminosis group ($p = 0,01$).

Conclusion: Excessive inflammatory response was diminished in hypervitaminosis and normovitaminosis groups according to hypovitaminosis group. Histopathologic examinations, ELISA and PCR results were showed that LPS induced lung injury was more severe in hypovitaminosis group according to other groups.

8. KAYNAKLAR

1. Duane J. Funk, Parrillo J, Kumar A. Sepsis and Septic Shock: A History Crit Care Clin 25 (2009) 83–101
2. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature2002;420:885-91.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, and Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000 The new england journal of medicine 2003;348:1546-54
4. Cavaiillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. Scand J Infect Dis2003;35(9):535-44.
5. Duane J. Funk, Parrillo J, Kumar A. Sepsis and Septic Shock: A History Crit Care Clin 25 (2009) 83–101
6. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. Annu Rev Pathol 2011;6:147-63.
7. Yawn J, Lawrence LA, Carroll WW, Mulligan JK. Vitamin D for the treatment of respiratory diseases: Is it the end or just the beginning? J Steroid Biochem Mol Biol 148:326 –337, 2015.
8. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign guidelines for the management of severe sepsis and septic shock. Crit Care Med 2004;32:858–873
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
10. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated cost of care. Crit Care Med2001;29:1303-10
11. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, and Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000 The new england journal of medicine 2003;348:1546-54
12. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study Crit Care Med. 2006;34:344-53
13. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM.

- Surviving Sepsis Campaign guidelines for the management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004;32:858–873
14. Cinel İ. Sepsiste Patogenez Türkiye Klinikleri *J Surg Med Sci* 2006,2(32):8-20
 15. Yalçın A, Gürsoy B. Sepsis İmmünopatogenezi Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 5(3):25-29
 16. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348/2:138-150.
 17. Brun-Buisson, C., et al., Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med*, 2004. 30(1): p. 51-61
 18. Doyle, R.L., et al., Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 152(6 Pt 1): p. 1818-24.
 19. Suchyta, M.R., et al., The adult respiratory distress syndrome. A report of survival and modifying factors. *Chest*, 1992. 101(4): p. 1074-9.
 20. Bird ML, Hill KD, Robertson I, et al. The association between seasonal variation in vitamin D, postural sway, and falls risk: An observational cohort study. *J Aging Res* 2013;751310, 2013.
 21. Çalışkan T, Çiftçi F *Yoğun Bakım Dergisi* 2013;11(1):13-20 Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS): Dün, Bugün, Yarın
 22. Thompson PB, Herndon DN, Traber DL, Abston S. Effect on mortality of inhalation injury. *J Trauma* 1986;26:163-165.
 23. Villar J, Blanco J, Anon JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambros A, et al; ALIEN Network. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med* 2011;37:1932-41.
 24. Mikkelsen ME, Shah CV, Meyer NJ, Gaieski DF, Lyon S, Miltiades AN, et al. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome in patients presenting to the emergency department with severe sepsis. *Shock* 2013;40:375-81.
 25. Gajic O, Dabbagh O, Park PK, Adesanya A, Chang SY, Hou P, et al. Early identification of patients at risk of acute lung injury: evaluation of lung injury prediction score in a multicenter cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:462-70.
 26. Tredget EE, Shankowsky HA, Taerum TV, Moyasa GL, Alton JD. The role of inhalation injury in burn trauma. *Ann Surg* 1990;212:720-727.

27. Gavino R, Johnson L, Bhandari V. Release of cytokines and apoptosis in fetal rat Type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide: modulatory effects of dexamethasone and pentoxifylline. *Cytokine* 2002;20:247-255.
28. Till GO, Beauchamp C, Menapace D. Oxygen radical dependent lung damage, following thermal injury of rat skin. *J Trauma* 1983;23:269-277.
29. Tharratt RS, Alan RP, Albertson TE. Pressure controlled inverse ratio ventilation in severe adult respiratory failure. *Chest* 1988;94:755-62
30. Abel SJ, Finney SJ, Brett SJ et al. Reduced mortality in association with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax* 1998;53:292-4.
31. Vasilios Koulouras V., Papathanakos G, Papathanasiou A. Et al. Efficacy of prone position in acute respiratory distress syndrome patients: A pathophysiology-based review *World J Crit Care Med* 2016 May 4; 5(2): 121-136 ISSN 2220-3141
32. Gattinoni L, Pesenti A, Avalli L, et al. Pressure-volume curve of total respiratory system in acute respiratory failure. CT study. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:730-6.
33. Gillette, M.A. and D.R. Hess, *Ventilator-induced lung injury and the evolution of lung-protective strategies in acute respiratory distress syndrome*. *Respir Care*, 2001. **46**(2): p. 130-48.
34. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med*, 2000. 342(18): p. 1301-8.
35. Dreyfuss, D., et al., Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis*, 1985. 132(4): p. 880-4.52
36. Tschumperlin, D.J., J. Oswari, and A.S. Margulies, Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 162(2 Pt 1): p. 357-62.
37. Quinn, D.A., et al., Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*, 2002. **93**(2): p. 517-25.
38. Parsons, P.E., et al., Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. **288**(3): p. L426-31.
39. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome

The Acute Respiratory Distress Syndrome Network *N Engl J Med* 2000; 342:1301-1308 May 4, 2000 DOI: 10.1056/NEJM200005043421801

40. Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R. Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1990;16:372-7.
41. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al. Beneficial effects of the open lung approach with low distending pressure in acute respiratory distress syndrome. A prospective randomized study on mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1835-46.
42. Tharratt RS, Allan RP, Albertson TE. Pressure controlled inverse ratio ventilation in severe adult respiratory failure. *Chest* 1988;94:755-62.
43. International consensus conferences in intensive care medicine: Ventilator-associated Lung Injury in ARDS. This official conference report was cosponsored by the American Thoracic Society, The European Society of Intensive Care Medicine, and The Societe de Reanimation de Langue Francaise, and was approved by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(6): p. 2118-24.
44. Brower, R.G., et al., Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 2004. **351**(4): p. 327-36.
45. Dambrosio, M. et al. Effects of positive end-expiratory pressure and different tidal volumes on alveolar recruitment and hyperinflation. *Anesthesiology*, 1997. **87**(3): p.495-503.
46. Richard, J.C., et al., Influence of tidal volume on alveolar recruitment. Respective role of PEEP and a recruitment maneuver. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**(7): p. 1609-13.
47. Vollman KM. Prone positioning for the ARDS patient. *Dimens Crit Care Nurs* 1997;16:184-93.
48. Hill JD, O'Brien TG, Murray JJ, et al. Prolonged extracorporeal oxygenation for acute post-traumatic respiratory failure (shock-lung syndrome). Use of the Bramson membrane lung. *N Engl J Med* 1972;286:629-34.
49. Anderson HD, Steimle C, Shapiro M, et al. Extracorporeal life support for adult cardio-respiratory failure. *Surgery* 1993;114:161-72.
50. Zwischenberger JB, Conrad SA, Alpard SK, et al. Percutaneous extracorporeal arteriovenous CO₂ removal for severe respiratory failure. *Ann Thorac Surg* 1999;68:181-7.

51. Zapol WM, Snider MT, Hill JD, et al. Extracorporeal membrane oxygenation in severe acute respiratory failure. A randomized prospective study. *JAMA* 1979;242:2193-6.
52. Hirschl R, Pranikoff T, Wise C, et al. Initial experience with partial liquid ventilation in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 1996;275:383-9.
53. Dellinger, R.P., et al., Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med*, 2008.
54. Choi, P.T., et al., Crystalloids vs. colloids in fluid resuscitation: a systematic review. *Crit Care Med*, 1999. **27**(1): p. 200-10.
55. Lachmann, B., Open up the lung and keep the lung open. *Intensive Care Med*, 1992. **18**(6): p. 319-21.
56. Hickling, K.G., et al., Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low-volume, pressure-limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study. *Crit Care Med*, 1994. **22**(10): p. 1568-78.
57. Kwo, J. and L.M. Bigatello, Ancillary therapies for acute respiratory distress syndrome. *Int Anesthesiol Clin*, 1999. **37**(3): p. 65-83.
58. Sokol, J., S.E. Jacobs, and D. Bohn, *Inhaled nitric oxide for acute hypoxic respiratory failure in children and adults: a meta-analysis*. *Anesth Analg*, 2003. **97**(4): p. 989-98.
59. Wiedemann, H.P., A.C. Arroliga, and J.J. Komara, Jr., *Emerging systemic pharmacologic approaches in acute respiratory distress syndrome*. *Respir Care Clin N Am*, 2003. **9**(4): p. 419-35.
60. Jepsen, S., et al., *Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study*. *Crit Care Med*, 1992. **20**(7): p. 918-23.
61. Radermacher, P., et al., *Prostaglandin E1 and nitroglycerin reduce pulmonary capillary pressure but worsen ventilation-perfusion distributions in patients with adult respiratory distress syndrome*. *Anesthesiology*, 1989. **70**(4): p. 601-6.
62. Slotman, G.J., et al., *Ketoconazole prevents acute respiratory failure in critically ill surgical patients*. *J Trauma*, 1988. **28**(5): p. 648-54.
63. Holick MF. McCollum award lecture, vitamin D: new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:619-30.
64. Holick MF. Vitamin D: a delightful health perspective. *Nutr Rev* 2008; 66:182-94.

65. Trang H, Cole DE, Rubin LA, Pierrtos A, Siu S, Vieth R. Evidence that VD3 increases serum 25hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:854-8
66. Nemere I, Carson F. Membrane receptors for steroid hormones: a case for spesific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Com* 1998; 248:442-9.
67. De Luca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15:2579-85.
68. Bouillon R, Cameliet G, Daci E, Seagart S , Verstuyf A. Vitamin D Metabolism and Action. *Osteoporos Int* 1998; 8:13-9.
69. Liu PT, Stenger S, LI H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Activation of human TLR 2/1 triggers a vitamin D receptor-dependent antimicrobial response. *Science* 2006; 311:1770-3.
70. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Ips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005; 16:713-6.
71. Liu PT, Stenger S, LI H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Activation of human TLR 2/1 triggers a vitamin D receptor-dependent antimicrobial response. *Science* 2006; 311:1770-3.
72. Adams JS, Hevison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4:80-90.
73. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systemic review and meta-analysis. *Int J Epidemioloji* 2008; 37:113-9.
74. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo Jr Ca. Association between serum 25 hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition examination Survey. *Arch Intern Med* 2009; 169:384-90.
75. Bikle D. Nonclassic Actions of Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(1): 2634
76. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, et al. The Nonskeletal Effects of Vitamin D: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* 2012; 33(3): 456492
77. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358: 15001503
78. Sözen T Hacettepe Tıp Dergisi 2011; 42:14-27 D hormonu: Guncel gelişmeler

79. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179: 16341647
80. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 24052411
81. Adorini L. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell Immunol* 2005; 233: 115124
82. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15: 25792585 8
83. Ponsonby AL, McMichael A, van der Mei I. Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology* 2002; 181182: 7178
84. Esteban, A., et al., Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *Jama*, 2002. **287**(3): p. 345-55.
85. Monchi, M., et al., Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(4): p. 1076-81.
86. Goss, C.H., et al., Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit Care Med*, 2003. **31**(6): p. 1607-11.
87. Bersten, A.D., et al., Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(4): p. 443-8.
88. Roupie, E., et al., Prevalence, etiologies and outcome of the acute respiratory distress syndrome among hypoxemic ventilated patients. SRLF Collaborative Group on Mechanical Ventilation. Societe de Reanimation de Langue Francaise. *Intensive Care Med*, 1999. **25**(9): p. 920-9.
89. Rubenfeld, G.D. and M.S. Herridge, Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*, 2007. **131**(2): p. 554-62.
90. Douzinas, E.E., et al., The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **155**(1): p. 53-9.
91. Neuhof, H., Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*, 1991. **95**: p. 7-13; discussion 13-4.
92. Bozzetto S, Carraro S, Giordano G, Boner A, Baraldi E. Asthma, allergy and respiratory infections: the vitamin D hypothesis. *Allergy* 67: 10–17, 2012

93. Eder W, Ege MJ, von ME. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 355: 2226–2235, 2006.
94. Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol* 120: 1031–1035, 2007
95. Sakurai R, Shin E, Fonseca S, Sakurai T, Litonjua AA, Weiss ST, Torday JS, Rehan VK. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and its 3-epimer promote rat lung alveolar epithelial-mesenchymal interactions and inhibit lipofibroblast apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L496–L505, 2009.
96. P.P. Minghetti, A.W. Norman, $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D₃ receptors: gene regulation and genetic circuitry, *FASEB J.* 2 (1988) 3043–3053.
97. J.W. Pike, N.W. Sleator, Hormone-dependent phosphorylation of the $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃ receptor in Mouse fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131 (1985) 378–385.
98. C.W. Tabor, H. Tabor, Polyamines, *Ann. Rev. Biochem.* 53 (1984) 749–790.
99. G.W. Burton, Antioxidant action of carotenoids, *J. Nutr.* 119 (1989) 109–111.
100. H. Wiseman, M. Cannon, H.R.V. Arnstein, D.J. Barlow, The structural mimicry of membrane steroids by tamoxifen: evidence from cholesterol coefficients and molecular modeling for its action as a membrane antioxidant and an anticancer agent, *Biochim. Biophys. Acta* 1138 (1992) 197–202.
101. H. Wiseman, P. Quinn, B. Halliwell, Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. Mechanisms of antioxidant action of tamoxifen and relevance to its anticancer and chemopreventive actions, *FEBS Lett.* 330 (1993a) 53–56.
102. H. Wiseman, Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action, *FEBS Lett.* 326 (1993b) 285–288.
103. P. Lanteri, G. Lombardi, A. Colombini et al. Vitamin D in exercise: Physiologic and analytical concerns journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim.
104. Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Wetterslev J, Simonetti RG, Bjelakovic M, Gluud C: Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2011, 7, CD007470.
105. Lagishetty V, Misharin AV, Liu NQ, Lisse TS, Chun RF, Ouyang Y, McLachlan SM, Adams JS, Hewison M: Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. *Endocrinol* 2010, 151(6):2423–2432.

106. Pistolic J, Cosseu C, Li Y, Yu JJ, Filewod NC, Gellatly S, Rehaume LM, Bowdish DM, Hancock RE: Host defence peptide LL-37 induces IL-6 expression in human bronchial epithelial cells by activation of the NF-kappaB signaling pathway. *J Innate Immun* 2009, 1(3):254–267.
107. Schaubert J, Oda Y, Buchau AS, Yun QC, Steinmeyer A, Zugel U, Bikle DD, Gallo RL: Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Invest Dermatol* 2008, 128(4):816–824.
108. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, Zugel U, Steinmeyer A, Pollak A, Roth E, Boltz-Nitulescu G, Spittler A: Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 2006, 36(2):361–370.
109. Lee P, Eisman JA, Center JR: Vitamin D deficiency in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009, 360(18):1912–1914.
110. Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, Tangpricha V: Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med* 2009, 7:28.
111. McKinney JD, Bailey BA, Garrett LH, Peiris P, Manning T, Peiris AN: Relationship between vitamin D status and ICU outcomes in veterans. *J Am Med Dir Assoc* 2011, 12(3):208–211.
112. Venkatram S, Chilimuri S, Adrish M, Salako A, Patel M, Diaz-Fuentes G: Vitamin D deficiency as associated with mortality in the medical intensive care unit. *Crit Care* 2011, 15(6):R292.
113. Barnett N. , Zhao Z. , Koyama T et all. Vitamin D deficiency and risk of acute lung injury in severe sepsis and severe trauma: a case-control study. *Annals of Intensive Care* 2014;5
DOI: 10.1186/2110-5820-4-5 © Barnett et al.; licensee Springer. 2014
114. Dancer RCA, et al. Vitamin D deficiency contributes directly to the acute respiratory distress syndrome (ARDS) *Thorax* 2015;70:617–624. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206680
115. Ashtari F, Toghianifar N, Zarkesh-Esfahani SH, Mansourian M. Short-term effect of high-dose vitamin D on the level of interleukin 10 in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.
116. Muller K, Diamant M, Bendtzen K. Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunol Lett* 1991;28:115-120.

117. Thien R, Baier K, Pietschmann P, et al. Interactions of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 with IL-12 and IL-4 on cytokine expression of human T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:683-689.
118. MacLaughlin, J. and Holick M.F. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3 *Journal of Clinical Investigation* 1985; 76 : 1536-8
119. Tharratt RS, Alan RP, Albertson TE. Pressure controlled inverse ratio ventilation in severe adult respiratory failure. *Chest* 1988;94:755-62
120. Abel SJ, Finney SJ, Brett SJ et al. Reduced mortality in association with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax* 1998;53:292-4.
121. Vasilios Koulouras V., Papathanakos G, Papathanasiou A. Et al. Efficacy of prone position in acute respiratory distress syndrome patients: A pathophysiology-based review *World J Crit Care Med* 2016 May 4; 5(2): 121-136 ISSN 2220-3141
122. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome
The Acute Respiratory Distress Syndrome Network *N Engl J Med* 2000; 342:1301-1308 May 4, 2000 DOI: 10.1056/NEJM200005043421801
123. 123. Sepsis and Acute Respiratory Distress Syndrome: Recent Update Kim W. , Hong S. ISSN: 1738-3536(Print)/2005-6184(Online) • *Tuberc Respir Dis* 2016;79:53-57
124. Holick M. F. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: Mechanisms of action *Molecular Aspects of Medicine* Volume 29, Issue 6, December 2008, Pages 361–368 *Emerging Roles of Vitamin D*
125. Gong M. N., Thompson B. T., Williams P. et al Clinical predictors of and mortality in acute respiratory distress syndrome: Potential role of red cell transfusion *Crit Care Med.* 2005 Jun;33(6):1191-8.
126. Dulla YA, Kurauchi Y, Hisatsune A. et al Regulatory Mechanisms of Vitamin D3 on Production of Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines in Microglial BV-2 Cells.
127. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016 Feb 23;315(8):801-10.
128. Shi Y, Liu T, Fu J et all. Vitamin D/VDR signaling attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury by maintaining the integrity of the pulmonary epithelial barrier *Molecular Medicine Reports* December 14, 2015 Pages:1186-1194 DOI: 10.3892/mmr.2015.4685