

Sepsiste indüklenebilen nitrik oksit sentaz inhibitörü (İNOS) ve antioksidanların barsak hasarına etkileri

Murat GÖLCÜK¹, Şükrü TOPRAK¹, Mustafa ŞAHİN¹, Sema HÜCÜMENOĞLU², Hatice PAŞAOĞLU³

¹ Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, KONYA,

² Dışkapı SSK Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı, ANKARA

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Amaç: Deneysel sepsis modelinde pentoksifilin, L-arginin ve aminoguanidin'in plazma nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) düzeylerine etkisini belirlemek NO ve MDA düzeyleri ile barsak hasarı arasındaki ilişkiyi ve nitrik oksit inhibitörü aminoguanidin ile tedavinin etkilerini incelemektir. Sepsiste barsaklarda görülen doku hasarının nedeni bakteriyel translokasyon, intestinal iskemidir. Bu hasar ile NO ve serbest oksijen radikallerinin ilişkisi ve aminoguanidin ile tedavinin etkileri araştırılmıştır. **Yöntem:** Çalışmada Wistar albino cinsi 60 rat kullanıldı. Ratlar 10'arlı 6 gruba ayrıldı. Ratlarda çekum ligasyon-perforasyon (ÇLP) yöntemi ile sepsis geliştirildi. Ratlar, Grup I: Sham işlemi, Grup II: ÇLP (sepsis), Grup III: ÇLP + 10 mg/kg L-arginin, Grup IV: ÇLP + 15 mg/kg Aminoguanidin, Grup V: ÇLP + L-arginin + Aminoguanidin [aynı dozlar], Grup VI: ÇLP+ 15mg/kg Pentoksifilin şeklinde gruplara ayrıldı. İşlemden 24 saat sonra ratlardan NO, MDA, lökosit tayini için kan örnekleri ve doku hasarını belirlemek için ileum örnekleri alındı. **Bulgular:** Lökosit sayısı ÇLP uygulanan gruplarda anlamlı olarak arttı. NO düzeyleri sepsis grubu ve L-arginin grubunda anlamlı olarak yükselirken, Aminoguanidin ve Aminoguanidin+L-arginin gruplarında sham grubuna benzer bulundu. ÇLP uygulanan gruplarda barsak doku hasarı, sham grubuna göre anlamlı olarak yüksekti, ancak Pentoksifilin, Aminoguanidin ve Aminoguanidin+L-arginin gruplarının değerleri sepsis ve L-arginin gruplarına göre anlamlı olarak düzelmeye gösterdiler. Sepsis ve L-arginin gruplarındaki MDA düzeyleri sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. **Sonuç:** Sepsiste oluşan barsak doku hasarına artan MDA ve NO düzeylerinin neden olduğunu ve bu hasarı önlemek amacıyla pentoksifilin ve aminoguanidin tedavi protokollerine eklenebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, NO, MDA, Aminoguanidin,

Selçuk Tıp Derg 2004; 20:74-79.

SUMMARY

Objective: Nitric oxide (NO) and free oxygen radicals have been implicated in the pathogenesis of intestinal damage and intestinal circulatory dysfunction in sepsis. The aim of this study is to investigate the effects of pentoxifyllin, L-arginin and Aminoguanidine on plasma malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels, and to determine the relations between MDA and NO levels on intestine pathology. **Methods:** 60 Wistar Albino rats were used in this study. The rats were divided into 6 groups, each containing 10 subjects. Sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) method. Group I: Sham group, Group II: CLP (sepsis), Group III: CLP + 10 mg/kg L-arginin administration, Group IV: CLP + 15 mg/kg Aminoguanidine administration, Group V: CLP + L-arginin + Aminoguanidine (as groups III and IV) Group VI: CLP+15mg/kg/day pentoxifyllin. Blood samples were taken for the determination of NO, MDA, leukocyte counts, a segment of ileum tissue sample was obtained for determination of tissue damage. **Results:** Leukocyte count increased in CLP induced groups significantly. While NO levels were significantly higher in sepsis and L-arginin groups, the levels in Aminoguanidine and Aminoguanidine + L-arginin groups were similar to Sham group. Intestine tissue damage in sepsis and L-arginin groups were more severe than the other groups. MDA levels in CLP induced groups were found to be higher than the sham group. **Conclusion:** Aminoguanidine and Pentoxifyllin may be added to treatment protocols in sepsis in order to prevent intestinal tissue damage and dysfunction both of which (at least partially) caused by elevated NO levels.

Key Words: Sepsis, nitric oxide, malondialdehyde, aminoguanidine.

Sepsis ve çoğu kez ona eşlik eden septik şok, tedavisi güç, mortalitesi yüksek, insidansı giderek artan ve karmaşık patofizyolojik olayların etkili olduğu bir klinik tablodur(1). Yakın zamanlarda hücre biyolojisinin anlaşılmasında gerçekleşen iler-

lemeler sayesinde sepsisin patofizyolojisi daha iyi anlaşılabilir hale gelmiş, olayda rol alan mediyatörler (TNF, interlökinler, serbest oksijen radikalleri) ve sitokinler tanımlanarak bunların etki mekanizmaları ve vücutta gelişen patofizyolojik ve

metabolik değişimler belirlenmiştir (2). Sepsis ve septik şok esnasında vücudun jeneralize inflamatuvar yanıtında nitrik oksidin (NO) önemli bir mediyatör olduğu gösterilmiştir. Günümüzde yeni tedavi metodları aranmakta olup hedef moleküller NO ve selektif NOS inhibitörleridir (3).

Aminoguanidin hidroklorid, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS)'un selektif inhibitörüdür. iNOS dışındaki diğer NOS enzimleri üzerine potansiyel etkisi yoktur (4).

Normal fizyolojik şartlarda NO sindirim sisteminde sfinkter ve düz kasların tonusunun regülasyonu, intestinal mikrosirkülasyon ve intestinal mukozal bariyerin sağlanmasından sorumludur. NO vertabralılarda sitokrom P-450 redüktaz homoloğu olan ve Nitrik Oksit Sentaz olarak bilinen enzimlerce L-Argininden sentezlenir. Ortamda L-arginin yokluğunda "superoksit" üretimi artar, L-Arginin varlığında "süperoksit" üretimi inhibe olur. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) üç farklı izoenzimi vardır (5); nNOS (nöronal NOS), eNOS (endotelial NOS), iNOS (indüklenebilen NOS). Barsaklarda fizyolojik şartlarda bazal NO üretiminden cNOS sorumludur. Ancak sepsiste, inflamatuvar mediyatörler iNOS'u aktive ederler ve çok miktarda NO üretimine sebep olurlar. Bol miktarda NO üretimide sepsiste görülen patofizyolojik değişiklere sebep olmaktadır (6).

Pentoksifilin, ksantin türevi, fosfodiesteraz inhibitörü bir ilaçtır. Septik hastalara pentoksifilin verilmesi sonrasında TNF seviyelerinde normale gerileme ve buna bağlı hastaların klinik durumlarında düzelleme gözlenmiştir. Pentoksifilin; nötrofillerde serbest oksijen radikalleri (SOR) üretimini ve sitokin üretimini inhibe eder (7).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezinde, Araştırma merkezi yönetim kurulunun onayı ve Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun izni ile yapılmıştır.

Çalışmada 260-300 g (ort: 285 ± 18 g) ağırlıkta Wistar Albino cinsi 60 erkek rat kullanıldı. Ratlar 10'arlı 6 gruba ayrıldı. Sham grubu hariç, diğer gruplardaki ratlarda operatif işlem bölümünde tarif edilen çekal ligasyon-perforasyon (ÇLP) yöntemi kullanılarak sepsis oluşturuldu (8).

GRUP I: (Sham grubu): Kontrol grubu.

GRUP II: (Sepsis grubu): ÇLP yapılarak sepsis oluşturuldu.

GRUP III: (L-Arginin grubu): ÇLP yapılarak sepsis oluşturuldu ve 10mg/kg/gün L-Arginin solüsyon halinde operasyondan 4 ve 8 saat sonra, gavaj ile verildi.

GRUP IV: (Aminoguanidin grubu): ÇLP yapılarak sepsis oluşturuldu ve 15mg/kg Aminoguanidin solüsyon halinde operasyondan 4 ve 8 saat sonra, gavaj ile verildi.

GRUP V: (L-Arginin+Aminoguanidin grubu): ÇLP yapılarak sepsis oluşturuldu ve yukarıdaki dozlarda ve sürede L-Arginin ve aminoguanidin aynı şekilde verildi.

GRUP VI: (Pentoksifilin grubu): ÇLP yapılarak sepsis oluşturuldu ve intramüsküler yolla 15 mgr/kg/gün dozunda Pentoksifilin tek doz halinde işlemden 2 saat sonra (MERCK) verildi.

Operatif İşlem: Ketamin hydrochloride (60mgr/kg) anestezi uygulandı. Ratların karın tıraşı ve betadine solüsyonu ile dezenfeksiyonundan sonra 2 cm lik orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı. Sepsis oluşturmak için ratlarda ÇLP modeli seçildi (8). Laparotomi sonrası çekum izole edildi, çıkan kolon sıvazlanarak çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileoçekal valvin altından 3/0 ipekle bağlanıp çekum ön yüzü 22 numara intraket iğnesi ile iki defa delindi. Sham grubunda ÇLP uygulanmadı, sadece çekum explore edildi. Batın 3/0 ipekle devamlı sütürlerle kapatıldıktan sonra ratlar kafeslerine alındılar ve 22°C'de nemi, ışığı ve ısı kontrol altında tutulan odalarda tutuldular. Ratlara ilaçları belirlenen saatlerde verildi. Ratların postoperatif 12. saatten itibaren standart rat yemi ve içme suyu almalarna izin verildi.

Ratlar 24 saat sonunda; aynı şekilde anestetize edildiler ve dezenfeksiyon uygulandı. Kardiak ponksiyonla yaklaşık 8 cc kan örnekleri alındı. Laparotomi yapılarak ileum örnekleri alındıktan sonra, ratlar sakrifiye edildiler. Alınan kan örneklerinden 1 cc kan Na-EDTA içeren tüplerde lökosit çalışması için ayrıldıktan sonra, kalan 6 cc kanın 3000 devir/dk da 5 dakika santrifüje edilip plazmaları ayrıldı ve plazma NO, MDA, düzeyleri tayini için -80 °C de derin dondurucuda saklandılar.

Kan gazları otomatik cihazlarla hemen deney anında bakıldılar. Lökosit sayımları aynı gün otomatik cihazlarla gerçekleştirildi.

NO Tayini: NO "Nitric Oxide Colorimetric Assay" (Roche Cat No:1756281) yöntemiyle ölçüldü. Nitrojen monoksit ölçümü serum nitritinin ölçüyle bulundu. Örneklerdeki nitrat "Nitrat Redüktaz" enzimi ve Nikotinamid Adenindinükleotid Fosfat (NADPH) yardımıyla Nitrit'e indirgenir.

a) Nitrat + NADPH + H \rightarrow Nitrit+ NADP +H₂O

Ortamdaki nitrit formları sulfanilamid ve N-(1-naphtyl)-Etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girdiğinde "kirmızı-mor menekşe" renginde bant oluşturur.

b) Nitrit +Sulfanilamid + N-(1-naphtyl)-Etilendiamin dihidroklorid \rightarrow Mor-menekşe bant

Bu oluşan bant 550 nm de köre karşı absorbanları okutularak NO düzeyleri tesbit edildi (9).

MDA Tayini: Plazma MDA seviyeleri tiobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanılarak ölçüldü. Yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm de maksimum absorban veren renkli bir kompleks oluşturur. Bir deney tüpüne 2.5 ml %10 luk TCA çözeltisi, üzerine 0.5 ml plazma konularak vortekste karıştırıldı. Tüpün ağzı kapatılıp 90°C deki su banyosunda 15 dk. bekletildi. Sonra çıkartılarak soğuk su altında soğutuldu ve 3000 devir/dk da 10dk santrifüj edildi. Süpernatantdan 2 ml başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine % 0.675 lik TBA çözeltisinden 1 ml eklenerek tekrar 90°C de su banyosuna konuldu ve 15 dk bekletildikten sonra soğuk su altında soğutuldu. Spektrofotometrede 532 nm de köre karşı absorbanları okutuldu. Kör tüpüne numune miktarı kadar distile su konuldu(10).

MDA-TBA kompleksinin 532 nm deki ekstinksiyon katsayısından (1.56×10^5 cm-1M-1) yararlanılarak nmol/ml cinsinden MDA değeri aşağıda belirtilen formülle hesaplanarak bulundu.

Dilüsyon faktörü = 9.09

A=abxc

C=A/abx

C=[A/(1.56X10⁵cm-1M-1x 1cm)]x dilüsyon faktörü

C=[A/1.56x10⁵ M-1]x9.09

C (nmol/ml)=Ax58.27

Dokuların Histopatolojik Değerlendirilmesi:

Alınan doku örnekleri % 10'luk formalin solusyonu içine kondular ve çalışma anına kadar saklandılar.

Parafin blokları hazırlanan dokulardan 5 mikron kalınlıkta kesitler alındı. Bu kesitler Hemotoksilin-Eosin ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında 40 ve 100 büyütmede incelendiler. İncelemeleri, grupları ve hangi kesitin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen bir patoloji uzmanı yaptı. Patolojik bulgular 0-Normal, +1-Hafif, +2-Orta, +3-Ağır olarak yorumlandılar.

Barsaklar: Barsak kesitlerinde villus atrofi, interstisyel ödem, nötrofil infiltrasyonu, lenfosit infiltrasyonu derecesi değerlendirildi.

İstatistik Analizler: Veriler kodlanarak bilgisayar ortamına aktarıldı. İstatistik analizler "SPSS for Windows 10,0" programı yardımıyla yapıldı. Veriler ortalama artı-eksi standart sapma ve yüzde olarak verildi. Kategorik verilerin karşılaştırması "Khi-Kare" testi ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Post Hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. Grupların X ve SD değerleri hesaplandı, tablolar halinde verildi. p<0,05 değeri istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Plazma NO Sonuçları (Tablo1); L-Arginin grubunda plazma NO seviyesi ortalama değeri 42,24±5,87 mic.mol/lt olarak bulundu ve en yüksek ölçüm yapılan grubu oluşturuyordu. L-Arginin grubunda NO seviyeleri sepsis grubu hariç diğer gruplara göre belirgin olarak daha yüksekti ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0,05). L-Arginin grubu ile sepsis grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Plazma MDA sonuçları (Tablo 2), sepsis grubunda plazma MDA seviyesi ortalama değeri 3,88 ±1,02 mic.mol/L olarak bulundu ve en yüksek ölçüm yapılan grubu oluşturuyordu. Sepsis grubunda MDA seviyeleri

Tablo 1. Grupların NO düzeyleri (mic.mol/L)

n	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
1	23.3	38	37.3	30	30	31.5
2	26.5	37.1	38.5	26.5	26.1	31.1
3	27.9	44.4	44.3	32	20.5	35.9
4	27.9	31.6	38	30	30.6	29
5	23.6	41.6	38.3	27	31.5	32.1
6	31.6	34.8	41	29.1	34.3	38
7	27.8	36	37.3	26.1	33.4	38
8	29.8	39.3	44	23.1	26.1	32.8
9	29.8	44.2	48.6	30	34.2	39.3
10	24.6	40.6	55.1	27	22.3	27.2
X	27,8	38,7	42,2	28,0	28,9	33,4
SD	2,780	4,09	5,87	2,60	4,92	6,99

Tablo 2. Grupların MDA düzeyleri (mic.mol/L)

n	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
1	2.05	3.16	3.22	2.69	3.28	1.69
2	1.75	5.63	2.79	3.07	2.43	2.32
3	1.30	2.48	3.05	2.37	3.28	2.21
4	2.30	3.84	2.39	3.15	2.62	1.77
5	1.89	3.39	3.18	3.73	3.04	1.74
6	2.36	4.03	3.15	3.10	2.62	3.16
7	1.56	3.37	2.37	3.18	2.99	1.46
8	1.69	2.97	2.52	3.33	3.42	2.12
9	2.22	4.85	2.37	2.65	4.41	1.58
10	1.56	5.15	3.28	2.28	2.75	2.05
X	1,86	3,88	2,83	2,95	3,08	2,01
SD	0,35	1,02	0,38	0,45	0,57	0,49

diğer gruplara göre belirgin olarak daha yüksekti ($P<0,05$). Yine Pentoksifilin grubunda plazma MDA değerleri kontrol grubu dışındaki tüm gruplardan belirgin olarak düşüktü ($P<0,05$). Plazma MDA değerlerine göre, L-Arginin, L-Arginin+ Aminoguanidin ve Aminoguanidin, grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Lökosit sonuçları; sepsis grubunda plazma lökosit seviyesi ortalama değeri 9210 ± 1885 k/UL olarak bulundu ve en yüksek ölçüm yapılan grubu oluşturuyordu. Kontrol grubunda plazma Lökosit seviyesi ortalama değeri 5156 ± 1216 k/UL olarak bulundu ve en düşük ölçüm yapılan grubu oluşturuyordu. Kontrol grubu lökosit seviyeleri diğer gruplara göre belirgin olarak daha düşüktü ($P<0,05$). Patolojik bulgular; villus atrofsi açısından 2,3,5. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($P<0,05$) görüldü. Ancak 4. ve 6. gruplarda villus atrofsisini benzer şekilde daha az olduğu tesbit edildi ($P<0,05$) (Tablo 3, Şekil 1). İnterstisyel ödem açısından kontrol grubu hariç diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($P>0,05$) (Tablo 4, Şekil 1). Nötrofil infiltrasyonunun, 4. ve 6. gruplarda, diğer gruplara göre daha az olduğu görüldü ($P<0,05$) (Tablo 5, Şekil 1). Lenfosit infiltrasyonunun 4. grupta kontrol grubu hariç diğer gruplara göre daha az olduğu görüldü ($P<0,05$) (Tablo 6).

Tablo 3. Barsaklarda villus atrofsi oluşma derecesi

Doku Hasarı Derecesi	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
	n	n	n	n	n	n
Normal(0)	8	0	0	3	3	7
Hafif (1)	1	3	3	7	6	1
Orta (2)	1	4	3	0	1	2
Şiddetli (3)	0	3	4	0	0	0

Tablo 4. Barsaklarda interstisyel ödem derecesi

Doku Hasarı Derecesi	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
	n	n	n	n	n	n
Normal(0)	6	2	2	5	4	5
Hafif (1)	4	5	7	5	5	4
Orta (2)	0	3	1	0	1	1
Şiddetli (3)	0	0	0	0	0	0

Tablo 5. Barsaklarda nötrofil infiltrasyon derecesi

Doku Hasarı Derecesi	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
	n	n	n	n	n	n
Normal(0)	7	5	5	10	9	10
Hafif (1)	3	4	4	0	1	0
Orta (2)	0	1	1	0	0	0
Şiddetli (3)	0	0	0	0	0	0

Tablo 6. Barsaklarda lenfosit infiltrasyon derecesi

Doku Hasarı Derecesi	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
	n	n	n	n	n	n
Normal(0)	4	1	7	1	7	8
Hafif (1)	5	7	3	9	3	2
Orta (2)	1	2	0	0	0	0
Şiddetli (3)	0	0	0	0	0	0

TARTIŞMA

NO gastrointestinal trakta bir çok fizyolojik olayda hayati fonksiyonlara sahiptir. Barsaklarda fizyolojik şartlarda bazal NO üretiminden cNOS sorumlu olup, bu aktivite intestinal mukozal bariyer ve intestinal mikrosirkülasyonun iskemi-reperfüzyon hasarının tahrip edici etkilerinin en aza indirilmesinden sorumludur (6). İntestinal NO üretimi enzimatik, nonenzimatik, ve bakteriyel yollarla olmaktadır (11). Ancak sepsiste inflamatuvar mediyatörler iNOS'u aktive ederler ve çok miktarda NO üretimine sebep olurlar (6). Herhangi bir uyarıdan sonra iNOS cNOS'tan 1000 kat daha fazla no üretimine sebep olur (6). İNOS aktivasyonu saatler alır



Şekil 1. A: Ratlarda normal barsak dokusu, B: 4. grupta normale yakın bulgular, C ve D: 2. grupta villus atrofsi, nötrofil ve lenfosit infiltrasyonu, interstisyel ödem.

ancak bir kere üretildikten sonra günler boyunca kanda tesbit edilebilir (6). Çok miktarda NO üretiminde sepsiste görülen patofizyolojik değişikliklere sebep olur (6). İntestinal mukozal bariyer fonksiyonları NO'un varlığından da yokluğundan da etkilenirler. NO'un barsaklardaki etkileri; kan akımının regülasyonu, barsak hareketlerinin regülasyonu, düz kas relaksasyonu, immünomodülasyon (lökosit ve trombosit agregasyon ve adhezyonunun düzenlenmesi ve mast hücre stabilizasyonu), antibakteriyel ve antitümoral etki, elektrolit taşıması ve parasellüler permeabilitenin sürdürülmesi şeklinde özetlenebilir (6). Fizyolojik şartlarda NO'un makrofaj ve granülositlerden herhangi bir stres karşısında, serbest oksijen radikalleri ve proteazların salınımını engelleyerek enterositler ve kript hücrelerinin yapısını ve mitokondrial fonksiyonlarını koruduğu belirtilmektedir (12). Yapılan çalışmalarda jejunumda ileuma oranla daha az NO üretildiği ve bu yüzden iskemi-reperfüzyon hasarına ileumdan daha dayanıksız olduğu belirtilmiştir (13). Ancak NO'un aşırı üretildiği durumlarda epitelyal hücre geçirgenliğinin arttığı ve apoptotik yolların aktive olduğu görülmüştür (14).

Sepsiste serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkileri bilinmektedir(6). Aşırı miktarda NO üretiminin olduğu durumlarda NO süperoksid ile birleşerek, kuvvetli bir oksidan olan peroksinitratı meydana getirirler(6). Peroksinitrat bir çok şekilde hücre ölümüne sebep olabilir (DNA'nın parçalanması, mitokondriyal elektron transportunun bozulması vb).Günümüzde bu bilgilerin ışığında yeni tedavi metodları aranmakta olup hedef moleküller NO ve selektif NOS inhibitörleridir (6).

iNOS enziminin sepsisteki deneklerde selektif (aminoguanidin) veya nonselektif (L-NAME) inhibisyonun NO düzeylerini düşürdüğü ve hemodinamik bozuklukları düzelttiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (15). iNOS geni olmayan farelerde sepsis oluşturularak yapılan çalışmalarda NO düzeyinin artmadığı, sepsise ait bulguların hafif seyrettiği ve mortalitenin daha düşük olduğu bildirilmektedir (15). Sepsiste azalmış splantinik akıma bağlı gelişen mezenterik vazokonstriksiyon intestinal mukozada asidoza, iskemiyeye, bakteriyel translokasyona ve endotoksin emiliminin artışına sebep olur. İşte bütün bu olayların aminoguanidin ile geri çevrilebildiği belirtilmektedir(16). İnsan çalışmalarında sepsiste görülen endotoksin ve sitokinlerin sebep olduğu

hipotansif şokun aminoguanidin ile düzeldiği görülmüştür (6). Yapılan çalışmalar sepsisin erken döneminde iNOS inhibisyonunun klinik tabloyu düzelttiğini, geç dönemde ise iNOS inhibitörleri ile tedavinin faydasının olmadığını belirtmektedirler (17).

Çalışmamızda sepsis oluşturulan deneklerin hemodinamik parametreleri ölçülmedi.

Aminoguanidin ve Aminoguanidin ile L-Argininin birlikte verildiği grupların plazma NO düzeyleri Sham grubu ile benzer bulundu ve sepsis oluşturulmasına rağmen NO düzeylerinde artış gözlenmedi. Aminoguanidin sepsise ve L-Arginine bağlı NO artışını etkin olarak önlemektedir. Ortamda L-Arginin olmasına rağmen NO düzeylerinin artmaması Aminoguanidin'in iNOS'u başarı ile inhibe ettiğini göstermektedir. Çeşitli çalışmalarda sepsiste iNOS olmaksızın deneklere L-Arginin verilmesinin hemodinamiyi değiştirmedeği ve bu enzimin ancak L-Arginin varlığında aktive olduğu bildirilmiştir (15). Bizim bulgularımız bu verilerle uygunluk göstermektedir. iNOS inhibisyonu dolaşımda bulunan L-Arginin kullanılmasını ve sentezini önlemiştir.

Mehta ve ark. (18) endotoksemik şok geliştirdikleri domuzlarda, L-Arginin'in NO düzeylerini arttırdığını ve hipotansiyon geliştiğini, L-NAME ile iNOS'un selektif inhibisyonunun ise NO düzeylerini azalttığını ve hipotansiyonu önlediğini gösterdiler. Biz de sepsiste ve L-Arginin verilen grupta NO düzeylerinin arttığını, Aminoguanidin'in ise her iki modelde de NO düzeylerini düşürdüğünü belirledik.

Çalışmamızda sepsis oluşturulan grupların tamamında MDA düzeylerinin Sham grubuna göre anlamlı olarak arttığı (P<0,05), ancak verilen maddelerden (L-Arginin, Aminoguanidin) etkilenmediği belirlendi. Buna karşın antioksidan etkisi bilinen pentoksifilin MDA düzeylerini kontrol grubu ve diğer gruplara göre anlamlı olarak düşürmüştür. Pentoksifilin sepsiste SOR yapımını azalttığı ve endotel hasarını önlediği bildirilmektedir(19). Çalışmamızda MDA düzeylerindeki düşüşün yanısıra barsak doku hasarının sepsis grubuna göre belirgin olarak azaldığı gözlenmektedir. Bu bulgular pentoksifilin SOR yapımını önlemesi ve endotel hasarını azaltması ile açıklanabilir. Sepsiste SOR'nın etkileri ayrıntılı olarak incelenmiş ve ortaya konmuştur (6). SOR ve NO'nun birbirleri ile olan ilişkisi tam olarak bilinmemekle birlik-

te, bu iki metabolitin karşılıklı etkileşimi sonucu peroksinitrit oluşturduğu ve bu maddenin dokular için oldukça toksik olduğu bildirilmektedir (6). Ancak verilerimize göre NO ve SOR düzeyleri arasında herhangi bir ilişki olmadığı kanaatine varıldı.

Çalışmamızda lökosit değerleri sepsis oluşturulan tüm gruplarda Sham grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($P=0,001$). Sepsis oluşturulan grupların değerleri arasında ise anlamlı farklılık yoktu ($P>0,05$). Deneklere verilen ajanların lökosit düzeylerini etkilemediği görüldü. Bu sonuçta NO'un lökositlerin agregasyon, adhezyon, ve aktivasyonlarını engelleyici özelliğine bağlandı (20).

Çalışmamızda barsaklarda patolojik parametreler açısından sadece aminoguanidin ve pentoksifilin

verilen gruplarda villus atrofi, nötrofil infiltrasyonu ve lenfosit infiltrasyonun diğer gruplara göre anlamlı olarak daha az geliştiği görüldü. Bu bulgular sepsiste NO ve serbest oksijen radikallerinin barsak mukozası üzerine olan tahrip edici etkilerinin, aminoguanidin ve pentoksifilin ile geri çevrilebildiğini göstermekteydi.

Sonuç olarak, bu verilere dayanarak sepsis tedavisinde selektif iNOS inhibisyonunun doku hasarı ve organ fonksiyon bozukluklarını önleyerek, sepsisin daha da ağırlaşmasına neden olan organ yetmezliklerinin önüne geçebileceği kanaatindeyiz. iNOS inhibitörü Aminoguanidin'in sepsisteki olumlu etkileri pentoksifilinden daha fazladır.

KAYNAKLAR

1. Abraham E. Rapidly expanding horizons. *New Horizons* 1993;1:1-2.
2. Bone RC. Sepsis and septic shock. *Consultant series in infectious disease. Ann Inter Med* 1993;3:5-25.
3. Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Microcirculatory dysfunction in sepsis: A pathogenetic basis for therapy. *J Pathol* 2000;190:373-86.
4. İskit AB, Sungur A, Gedikoğlu G. The effects of basentan, aminoguanidine and L-cavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. *European J Pharmacol* 1999;379:73-80.
5. Knowles R: Nitric Oxide Synthases. *The Biochemist* 3-6, 1993.
6. Chen LW, Hsu C.M, Wang J.S. Specific inhibition of iNOS decreases the intestinal mucosal peroxynitrite level and improves the barrier function after thermal injury. *Burns* 1988;24(8): 699-705.
7. Shorhorting MM, Schode UF. The effects of pentoxifylline in septic shock-new pharmacologic aspects of an established drug. *J Med* 1989;20:97-105.
8. Anton EO, Quinella AG, Sato AL, Liova J, Perez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001;33:77-9.
9. Malinski T, Bailey F, Chopp M: Nitric Oxide Measured by Porphyrinic Microsensor in Rat Brain After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13: 355-8.
10. Hammauda AE, Soliman SF, Tolba KA, el-Kabbany ZA, Makhlof MS. Plasma concentrations of lipid peroxidation products in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Chem* 1992;38:594-5.
11. Syngg J, Fandriks L, Bengtsson J, Holm M, Petterson A. Jejunal luminal nitric oxide during severe hypovolemia and sepsis in anesthetized pigs. *Int Care Med* 2001;27:1807-13.
12. Thomas S, Ramachandran A, Patra S, Vidyasagar S, Balasubramanian KA. Nitric oxide protects intestine from the damage induced by laparotomy and gut manipulation. *J Surg Res* 2001;99(1): 25-32.
13. Gua W.H, Chan K.L, Fung P.P.C.W, Chan K.W. Nitric oxide protects segmental intestinal grafts from ischemia and reperfusion injury. *Transplantation Proceedings* 2000;161:1297-8.
14. Elliot D, Mark W, David M, Ruairi J. Endotoxin-induced ileal mucosal injury and Nitric Oxide Dysregulation Are Temporally Dissociated. *Am J Res Crit Care Med* 2000;161:1705-12.
15. Prins HA, Houdijk AP, Wiezer MJ, Teerlink T, van Lambalgen AA, Thijs LG. The effect of mild endotoxemia during low arginine plasma levels on organ blood flow in rats. *New Horizons* 2000;5: 66-8.
16. Pedoto A, Nandi J, Oler A, Camporesi EM, Hakim TS, Levine RA. Role of nitric oxide in acidosis-induced intestinal injury in anesthetized rats. *J Lab Clin Med* 2001;138(4):270-6.
17. Baykal A, Kavuklu B, İskit AB, Güç MO, Sayek İ. Experimental Study of the Effect of Nitric Oxide Inhibition on Mesenteric Blood Flow and Interleukin-10 Levels with a Lipopolysaccharide Challenge. *World J Surg* 2000;24:116-20.
18. Mehta S, Javeshghani D, Datta P, Levy RD, Magder S. Porcine endotoxemic shock is associated with increased expired nitric oxide. *Crit Care Med* 1999;27:385-93.
19. Grisham MB: Reactive metabolites of oxygen and nitrogen biology and medicine 1992;76-84.
20. Vincent JL. Update on sepsis; Pathophysiology and treatment. *Acta Clinica Belgica* 2000;55:79-87.