T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA SEPSİSLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE SİLDENAFİL UYGULAMASININ KORUYUCU ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Uz.Dr. Serkan CERRAH

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nihat OKÇU

Yan Dal Uzmanlık Tezi
Erzurum-2012

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER I
ONAY II
ÖZET III
SUMMARY V
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 2
2.1. Sepsis 2
2.2. Sildenafil 12
3.MATERYAL METOD 15
3.1. İlaçlar ve Kimyasallar 15
3.2. Çalışma dizaynı 15
3.3. Sepsis modeli 15
3.4. Doku biyokimya değerlerinin ölçümü 16
3.5. Histolojik işlemler 19
3.6. İstatistiksel analiz 20
4.BULGULAR 21
5.TARTIŞMA 29
6.SONUÇ 36
7.KAYNAKLAR 37

ONAY

"Ratlarda Sepsisle Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Sildenafil Uygulamasının Koruyucu Rolünün Belirlenmesi " isimli çalışmamız Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalının 28.04.2010 tarih " 05 " sayılı oturumunun ' 13 ' nolu kararı ile Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 26.10.2011 tarih "10" sayılı oturumunun ' 75 ' sayılı kararı ile Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Kurulu' na yaptığımız 19.12.2011 tarih ve 908 sayılı başvuru sonrasında Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Kurulunun 27.12.2011 tarih " 4 " nolu oturumunun ' 35 ' sayılı kararı ile Prof.Dr. Nihat OKÇU'nun denetiminde Uzm.Dr. Serkan CERRAH tarafından tez olarak çalışılması uygun görülmüştür.

ÖZET

RATLARDA SEPSİSLE OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE SİLDENAFİL UYGULAMASININ KORUYUCU ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Sepsis enfeksiyon sonrasında gelişen, enflamasyon ve koagülasyonun birlikte aktive olmasıyla karekterize, morbiditesi ve mortalitesi yüksek, kompleks bir sendromdur Sildenafil selektif bir fosfodiesteraz Tip5 (PDE–5) inhibitörü olup, tüm dünyada erektil disfonksiyon tedavisinde etkin olarak kullanılan bir ilaçtır. Biz bu çalışmayla, çekum ligasyonu ve perforasyonu(ÇLP) uygulayarak polimikrobiyal sepsis oluşturduğumuz ratlarda, sildenafilin ÇLP' nin indüklediği karaciğer doku hasarında, histopatolojik ve biyokimyasal olarak serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlara olan etkisine bakarak, koruyucu etkisi olup olmadığını araştırdık. Ratlar 4 gruba ayrıldı. 1)10 mg /kg sildenafil (SLD) verilmiş çekal ligasyon perforasyon (ÇLP) grubu; 2) 20 mg /kg SLD verilmiş ÇLP grubu; 3)ÇLP grubu; 4)SHAM operasyon grubu. Çekal ligasyon perforasyon (ÇLP), polimikrobiyal sepsis modeli ratlara uygulandı. Çalışmamızda bütün gruplardaki ratlar 16 saat sonra overdoz genel anestezi ile öldürüldü (thiopental sodyum, 50 mg/kg). Ratların karaciğer spesmenleri alınarak histopatolojik ve biyokimyasal olarak analiz edildi. Çalışmamızda sepsis sürecinde karaciğer dokusunda oluşan antioksidan aktiviteyi göstermek için süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) parametreleri ölçüldü. Oksidan aktivite ise myeloperoksidaz (MPO) ve lipit peroksidasyonu (LPO) parametreleri karaciğer dokularında ölçülerek değerlendirildi. ÇLP polimikrobiyal sepsis grubunda, SHAM grubuna göre SOD ve MPO aktiviteleri, GSH ve LPO seviyeleri yüksek olarak bulundu ($p<0,05$) Sildenafil uygulanmış bütün gruplarda, ÇLP uygulanmış gruplara göre, yüksek GSH seviyeleri bulundu. 20 mg/kg sildenafil dozu uygulanmış ratlarda, SHAM grubuna göre, yüksek GSH seviyeleri gözlendi. Bununla birlikte sildenafilin bütün dozları, ÇLP grubuna göre, LPO seviyelerinde anlamlı düşüş ($p<0,05$), MPO aktivitesinde anlamlı artış gösterdi. 20 mg/kg sildenafil uygulanmış ratlarda, biyokimyasal parametrelerde iyileşmeler gözlendi. Çalışmamızda SHAM grubunda düşük olan SOD ve MPO

aktiviteleri ÇLP ile uygulanan polimikrobiyal sepsis modelinde artmıştır. SLD uygulandığında da MPO aktivitesi hem SHAM grubunda, hem ÇLP grubunda artmıştır. Çalışmamızda septik karaciğer dokularında GSH ve LPO seviyeleri de artmıştır. SLD SHAM grubuna uygulandığında da koruyucu GSH miktarını artırmış ve hasar verici LPO miktarını azaltmıştır. Yapılan histopatolojik incelemede 10 mg/kg sildenafil uygulamasının kısmen karaciğer üzerine iyileştirici etkileri olduğu gözlendi. Sonuç olarak; bu çalışmada akut sildenafil uygulamasının, septik sıçanlarda oluşan karaciğer hasarını doza bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca septik sıçanlarda bozulmuş olan oksidan-antioksidan dengesini de düzelttiği gözlenmiştir. Bu da sildenafilin karaciğerdeki koruyucu etkisine aracılık ediyor olabilir. Ancak sildenafilin karaciğer üzerindeki koruyucu etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için gelecekte yeni deneysel ve klinik çalışmaların yapılması gerektiği inancındayız.

Anahtar Kelimeler: Sildenafil, Rat, Sepsis, Karaciğer Hasarı

SUMMARY

DETERMINATION PROTECTIVE ROLE OF APPLICATION SILDENAFIL IN RATS WITH SEPSIS-INDUCED LIVER INJURY

Sepsis is a complex syndrome which comes out after infection, characterized by activation of inflammation and infection and has a high morbidity and mortality. Sildenafil (SLD) is a selective phosphodiesterase type 5 (PDE-5) enzyme inhibitor and is used in the treatment of erectile dysfunction effectively all over the world. In this study, we investigated whether sildenafil had protective effect or not by studying the effect of sildenafil on reactive oxygen species and antioxidants in cecal ligation and puncture (CLP) polymicrobial sepsis model in rat liver histopathologically and biochemically. Rats were divided into four groups: 1) 10 mg/kg SLD given CLP group; 2) 20 mg/kg SLD given CLP group; 3) CLP group; 4) SHAM operated group. CLP polymicrobial sepsis model was applied to the rats. All rats in our study were sacrificed by overdose general anesthetic after 16 hours (thiopental sodium, 50 mg/kg). Specimens of rat liver were analyzed histopathologically and biochemically. In the study, superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) parameters were measured to indicate the antioxidant activity in liver during sepsis. To evaluate the oxidant activity, myeloperoxidase (MPO) and lipid peroxidation (LPO) parameters were measured in liver tissue. SOD and MPO activities and GSH and LPO levels were high in CLP polymicrobial sepsis model when compared to SHAM group ($p<0.05$). In all sildenafil groups, GSH levels were high when compared to CLP group. In 20 mg/kg sildenafil given sepsis group, high GSH levels were observed according to SHAM group. In addition, while all sildenafil dose groups had a significant decrease versus CLP group in LPO levels ($p<0.05$), they had a significant increase in MPO activities. In 20 mg/kg sildenafil administrated rats, an improvement observed in biochemical parameters. In this study, SOD and MPO activities which were low in SHAM group increased in CLP polymicrobial sepsis model. When SLD administrated, MPO activity increased in both SHAM and CLP groups. In this study, GSH and LPO levels also increase in septic liver tissue. When SLD administrated to SHAM group, it increased

protective GSH level and decreased detrimental LPO level. In histopathological examination, it was observed that 10 mg/kg sildenafil administration had a curative effect in liver tissue partly. In conclusion, it was shown that acute sildenafil administration decreased liver damage in septic rats dose-dependently in this study. In addition, it was observed that it corrected the broken oxidant-antioxidant balance. This might mediate the protective effect of sildenafil in liver. But we believe that new experimental and clinical studies should be in future to understand the protective effect of sildenafil in liver.

Key Words: Sildenafil, Sepsis, Rat, Liver Injury

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sepsis enfeksiyon sonrasında gelişen, enflamasyon ve koagülasyonun birlikte aktive olmasıyla karekterize kompleks bir sendromdur. Bu olaylar, immün hücreler veya hasar görmüş endotel hücrelerinden salınan proinflamatuar stokinler, prokoagülanlar ve adezyon molekülleri yoluyla sistemik enflamatuar yanıt sendromu veya sepsis bulguları ile ortaya çıkar. Sepsiste hastane mortalite oranı %30' dur (1). Ciddi sepsis ve septik şokun mortalite oranları sırasıyla %20-52 ve %82' dir (2). Sepsis mikroorganizmaların ve toksinlerin kan akımının içine girmesi ve genel enflamasyonun konak yanıtı ile birlikte olması durumudur. Sepsis hemostatik denge ile endotel disfonksiyonu kaybına neden olurken, kardiovasküler sistemin fonksiyonlarını ve hücre içi hemostazı bozar. Organ disfonksiyonu nedeni ile hücre disfonksiyonu ve apoptozis olmaktadır (3).

Sepsis gelişiminde sitokinler, koagülasyon sistem aktivasyonu ve bunun sonucunda organ yetmezlikleri gözlenir. Sepsise bağlı gelişen organ hasarında oksidatif stresin de rolü bildirilmiştir. Şöyle ki serbest oksijen radikalleri, sepsiste gerçekleşen immün ve enflamatuar olaylardan sorumludur (4). Sepsis ve endotoksemi sonucunda gelişen serbest oksijen radikalleri, sepsisle ilişkili akut enflamatuar cevapta önemli olan, proinflamatuar sitokinlerin salınmasında çok önemlidir (5-8).

Sepsiste mortalitenin en önemli nedeni multiple organ yetmezliğidir. Karaciğer sepsis patolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Karaciğer burada hem bir aktör, hem bir mağdurdur. Karaciğerin bu ikili rolünü iki temel mekanizma açıklar. Birincisi toplam debinin %25' ini alan karaciğer kanlanmasıdır. Bu akımı sağlayan portal kan akımı splaknomezenterik alandan kaynaklanır ve bu bölge sepsiste oluşan vazokonstruksiyon ve bakteriyel translokasyondan en çok etkilenen bölgedir. İkincisi kupper hücreleri, hepatositler ve endotelyal sinüzoidal hücrelerden oluşan karaciğerin heterojen hücresel yapısıdır. Bu hücrelerin hepsi bağışıklık, antienfeksiyöz ve metabolik rollere sahiptir. Sonuçta sepsiste oluşan karaciğer disfonksiyonu çoklu organ yetmezliğine neden olabilir

veya onu daha da kötüleştirebilir (9). Bu nedenle sepsiste oluşan karaciğer yetmezliğinin önlenmesi tedavi açısından oldukça önemlidir.

Sildenafil pulmoner hipertansiyonda kullanılan selektif bir fosfodiesteraz Tip5 (PDE–5) inhibitörüdür. Pulmoner hipertansiyondaki yararlı etkileri bu ilacın karaciğer kanlanmasında da katkıda bulunabileceğini düşündürmüş ve yapılan bir çalışmada sildenafilin hepatik hemodinamik parametrelere belirgin olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (10). Yine yapılan hayvan çalışmalarında sildenafilin, alveolar büyümeyi ve anjiogenezisi koruduğu ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (11, 12). Sildenafilin oksidatif stresi ve enflamasyonu azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (13, 14). Başka bir hayvan çalışmasında diabetik ratlarda sildenafilin oksidatif stres ve enflamasyona karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (15). Çadırcı ve arkadaşlarının yaptığı, çekum ligasyonu ve perforasyonu (ÇLP) uygulayarak polimikrobiyal sepsis modeli oluşturdukları ratlardaki histopatolojik ve biyokimyasal çalışmada, akciğer ve renal doku örneklerinde, sildenafilin koruyucu etkisi incelenmiştir. Sildenafilin akciğer ve böbrek dokularında hem oksidatif stresi azaltarak hem de antioksidan sistemi destekleyerek koruyucu etki oluşturduğu hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak gösterilmiştir. Sildenafil tedavisinin TNF-α seviyelerini kontrol grubuna göre düşürdüğü aynı çalışmada gösterilmiştir. Çalışma sonucunda sildenafilin, çekum ligasyonu ve perforasyonu (ÇLP) ile polimikrobiyal sepsis oluşturulan ratlarda, akciğer ve böbrek dokularına karşı oluşan doku hasarında koruyucu etkisi olduğu ve sepsis patofizyolojisinde çok önemli bir proinflamatuar sitokin olan TNF-α seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (16). Ancak sildenafilin sepsisle indüklenen karaciğer hasarındaki etkilerini araştıran bir çalışma yoktur.

Biz bu çalışmayla, çekum ligasyonu ve perforasyonu(ÇLP) uygulayarak polimikrobiyal sepsis oluşturduğumuz ratlarda, sildenafilin ÇLP' nin indüklediği karaciğer doku hasarında, histopatolojik ve biyokimyasal olarak serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlara olan etkisine bakarak, koruyucu etkisi olup olmadığını araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Sepsis

2.1.1. Sepsisin tanımı ve önemi

Sepsis enfeksiyon sonrasında gelişen, enflamasyon ve koagülasyonun birlikte aktive olmasıyla karekterize kompleks bir sendromdur. Bu olaylar, immün hücreler veya hasar görmüş endotel hücrelerinden salınan proinflamatuar sitokinler, prokoagülanlar ve adezyon molekülleri yoluyla sistemik enflamatuar yanıt sendromu veya sepsis bulguları ile ortaya çıkar. Sepsis %30'luk hastane mortalite oranı ile ölümcül bir hastalıktır (1). Ciddi sepsis ve septik şokun mortalite oranları ise %20-52 ve %82 ile daha yüksektir (2). Sepsis mikroorganizmaların ve toksinlerin kan akımının içine girmesi ve genel enflamasyonun konak yanıtı ile birlikte olması durumudur. Sepsis hemostatik denge ile endotel disfonksiyonu kaybına neden olurken, kardiovasküler sistemin fonksiyonlarını ve hücre içi hemostazı bozar. Organ disfonksiyonu nedeni ile hücre disfonksiyonu ve apoptozis olmaktadır (3).

Toplumda gelişen sepsis olgularının sayısında rölatif olarak azalma gözlenirken, hastane kökenli sepsis olgularındaki artış dikkate değerdir. Toplumda ileri yaş grubunun artması, kronik hastalığı olanların yaşam sürelerinin uzaması, immünsüpresif ilaçların yaygın kullanılması, teşhis ve tedavi amacı ile invazif girişimlerin yaygın kullanılması, sepsis görülme sıklığını artırmaktadır.

Septiseminin, kanı enfekte eden mikroorganizmaları oluşturduğu bütün klinik tabloları tanımlamakta yetersiz kalması nedeniyle, Amerikan Göğüs Hastalıkları (American College of Chest Physicans – ACCP) ve Yoğun Bakım Dernekleri (Society of Critical Care Medicine–SCCM) birlikte yaptıkları ortak toplantıda, sepsis ile ilgili tanımlar netleştirilmiştir. Buna göre enfeksiyon, mikroorganizmaların normalde steril konak dokularda bulunması veya invazyonu sonucu gelişen bir enflamatuar cevaptır. Bakteriyemi ise canlı bakterinin dolaşımda bulunmasıdır. Bakteriyemi tanısı kan kültür pozitifliği ile

konur. Sistemik enflamatuar yanıt sendromu (SIRS), ağır klinik durumlara enflamatuar cevap olarak tanımlanmıştır. SIRS enfeksiyona bağlı gelişebileceği gibi, akut pankreatit, yanık, multiple travma gibi enfeksiyon dışı nedenlere bağlıda gelişebilir. Enflamatuar cevap, klinik olarak aşağıdaki tanı kriterlerinden iki veya daha fazlasının bulunması ile tanınır. Vücut ısısının 38 C° üstünde veya 36 C° altında olması, kalp atım hızının dakikada 90'ın üzerinde olması, solunum hızının dakikada 20'nin üzerinde olması veya karbondioksit basıncının 33 mm Hg'nın altında olması, lökosit sayısının 12000 mm^3 üzerinde veya 4000 mm^3'' ün altında olması, periferik yaymada %10'un üzerinde band formunun olması ile konur. Sepsis ise enfeksiyona karşı gelişen enflamatuar cevap olarak tanımlanır ve enfeksiyona sekonder gelişen SIRS bulgularının iki veya daha fazlasının bulunmasıdır. Ağır sepsis tanımı ise, sepsis ile birlikte organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyon bulunması durumudur. Septik şok, yeterli sıvı tedavisine rağmen, hipotansiyon ile birlikte perfüzyon bozukluğu belirtilerinin (laktik asidoz, oligüri, akut mental değişiklik) devam etmesi durumudur. Sepsise bağlı hipotansiyon, sistolik kan basıncının 90 mm Hg' nın altına düşmesi veya diğer nedenler olmaksızın, bilinen sistolik kan basıncının 40 mm Hg'dan daha fazla aşağı düşmesidir. Multiple organ disfonksiyonu sendromu (MODS) ise akut hastalık tablosu içinde olan bir hastada organ fonksiyon değişiklerinin bulunması, MODS olarak isimlendirilir.

Sepsis geliştiği yere göre, toplum kökenli ve hastane kaynaklı (nazokomiyal) sepsisler olmak üzere ikiye ayrılır. Bir hastanın hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra alınan kan kültürü örneklerinde klinik olarak anlamlı kan kültür pozitifliği hastane kaynaklı bakteriyemi olarak tanımlanır. Hastaneye yatıştan sonraki 72 saat sonra ortaya çıkan sepsis klinik tablosu ise hastane kaynaklı sepsis olarak tanımlanır (17).

2.1.2. Sepsis Etyolojisi

Sepsis etyolojisinde, bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitler gibi enfeksiyöz nedenler olabildiği gibi, ağır travma, yanık, pankreatit gibi noninfeksiyöz olaylarla da gelişebilmektedir. Hastaların yarısında herhangi bir etken belirlenememekle beraber, bu grubun çoğunluğunun antibiyotik tedavisine yanıt vermesi, etkenin bakteri olduğunu

düşündürür. Sepsise neden olan mikroorganizmaların sıklığının sepsisin hastane içi ya da hastane dışından gelmiş olmasına göre değişiklik gösterir. Sepsis hastalarında en sık karşılaşılan etken organizmalar Escherichia Coli (%22), Streptococcus pneumoniae (%16) ve Staphylacoccus aereus (%12) olarak saptanmıştır. Sepsisli hastaların çoğunda kan kültüründe üreme saptanamamaktadır. Bu oranlar sepsis evresiyle değişmekte olup, sepsiste %17, ciddi sepsiste %25 ve septik şokta ise %69 olarak bulunmuştur (18). Sepsisli hastalarda çoğunlukla malignite, KOAH, kronik böbrek yetmezliği, siroz ve diabet gibi eşlik eden bir hastalık ve immünsüpresyon, steroid kullanımı, asplenizm, kemoterapi, nötropeni, yabancı cisim varlığı, majör cerrahi girişim ve obstruksiyon (renal, bilier, intestinal) gibi komorbid durum eşlik etmektedir. Enfeksiyon odağı ise toplum ve hastane kaynaklı sepsislerde değişebilmektedir. Toplum kaynaklı sepsislerde piyelonefrit, pnomoni, deri yumuşak doku infeksiyonları, kolanjit, kolesistit, menenjit, endokardit en sık karşılaştığımız odaklar olup, hastane kaynaklı sepsislerde ise üriner sonda ilişkili pyelonefrit, ventilatörle ilişkili pnomoni, karın içi infeksiyonu (sekonder peritonit, abse) ve yabancı cisim infeksiyonları (damar içi kateterler vs) en sık odaklardır (19).

2.1.3. Sepsisin patofizyolojisi

2.1.3.1. Sitokinler

Sepsiste fizyopatolojik olaylar oldukça karmaşıktır. Mikroorganizma ve konakçının ilk karşılaşmasından sonra, immün sistemde humoral ve hücresel immüniteyi kapsayan aktivasyon başlar. Bakteri hücre duvarında yer alan birçok antijenik yapı ve toksinler, dolaşımdaki mononükleer fagositler, endotel hücreleri ve diğer hücrelerden birçok güçlü sitokinlerin salınımını başlatır. Salınan sitokinler arasında proinflamatuar sitokinler (IL–1, IL–6 ve Tümör nekroz faktörü-α (TNF –α) gibi), lipopolisakkaride bağlı septik şok tablosunun oluşmasında oldukça önemlidir (20, 21). Sepsiste araşidonik asit metabolitleride önemli rol oynar. Siklooksijenaz yolla prostoglandinler ve tromboksan A2, lipooksijenaz yola ise lökotrienler açığa çıkar. Endotoksin ve TNF-α, IL–1 gibi mediatörler araşidonik asit metabolitlerinin açığa çıkmasını ve sentezini aktive eder. TNF –α ve IL–1 sepsiste ateş, hipotansiyon ve şok patogenezinde rol oynayan en önemli sitokinlerdir (22).

2.1.3.2. Koagülasyon sistemi

Sepsis fizyopatolojisinde koagülasyon kaskatının etkisi büyüktür. Sepsiste sitokinler koagülasyonu tetikler. Bu tür hastalarda yaygın damar içi pıhtılaşma sık görülür. Koagülasyon yolları, mononükleer ve endotel hücrelerindeki doku faktörü, lipopolisakkarit ve diğer mikrobiyolojik ürünler tarafından aktive edilir. Bütün bu olaylar sonucunda yetersiz doku perfüzyonu ve organ yetmezliği gelişir (23).

Sepsiste rol alan mediatörlerin çoğu damarlar üzerine etkilidir. Endotoksin, TNF -α , IL-1, platalet aktive edici faktör (PAF), lökotirienler ve tromboksan-A2 (TX-A2), endotel permeabilitesini artırır ve endotel hasarı yapar. Sepsiste damar permeabilitesinin bozulmasıyla, trombosit ve nötrofil agregasyonu, küçük damarlarda mikrotrombüslerin oluşması başlar. Sepsiste vazoaktif mediatörlerin salınımı ile damar direnci azalır ve bunların sonucunda dokulara giden kan akımı azalır ve doku hipoperfüzyonu ve multiorgan yetmezliği gelişir (24).

2.1.3.3. Sepsiste oksidatif stres

Sepsiste aktive nötrofiller, moleküler oksijen üzerindeki membrana bağlı NADPH oksidaz yoluyla süperoksit oluşturabilir. Nötrofiller ayrıca peroksinitrit üretmek için süperoksitle reaksiyona girebilen serbest radikal nitrik oksit (NO)' de üretir. NO tek başına güçlü bir oksidandır. Sepsiste glutatyon peroksidaz (GSH-PX) metobolizmasıda değişmiştir. Ratlarda yapılan deneysel sepsis modelinde, özellikle karaciğerde olmak üzere birçok dokuda artmış GSH-PX metabolizması ve düşük kan GSH-PX seviyeleri gözlenmiştir. Hücresel oksidatif hasarın, çoklu organ yetmezliğinde önemli bir role sahiptir (25). Serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi ve yeterince dokudan uzaklaştırılamadığı durumlarda biyolojik membranların yapısını bozar.

Sonuç olarak, serbest oksijen radikalleri, sepsiste gerçekleşen immün ve inflamatuar olaylardan sorumlu olduğu bilinmektedir (4). Sepsis ve endotoksemi sonucunda gelişen serbest oksijen radikalleri, sepsisle ilişkili akut inflamatuar cevapta, proinflamatuar sitokinlerin salınmasında çok önemlidir (5-8).

Endotoksemi ve sepsis sonucunda endojen antioksidan kapasite düşer ve oksidan–antioksidan kapasitedeki dengenin bozulmasına yol açar (8). Serbest oksijen radikallerinin proinflamatuar etkileri, endotelyal hasar, kemotaktik faktör oluşumu, sitokin salınımı ve mitokondrial hasarlanmayı içermektedir (26-28). Bunlara bağlı gelişen mikrovasküler disfonksiyon sonucunda, böbrek, karaciğer ve akciğerlerinde içinde olduğu multiorgan yetmezliği sepsiste oluşur (29).

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak moleküle bir elektron ilavesi ya da elektron kaybı onu reaktif hale getirir. Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında belirli oranda oluşur ve hücresel mekanizmalarla organizmaya gelebilecek zararlı etkileri önler. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondrial elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin %5' i son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içerir ve bu özelliğiyle toksik serbest radikallere dönüşmektedir. Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan olan ve oksidan hasar oluşumu ile artan süperoksit-dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir. Hidrojen peroksit hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir. Birinci yol katalaz (KAT) veya GSH-Px tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülür. İkinci yol ise hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığı ile toksik hidroksil (OH) radikallerine dönüşümüdür (30). Nitrik oksitlerin radikal olarak aktivitesi düşüktür, ancak metal içeren birleşikler ve radikallerle büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO' e antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO

derişiminin artması ile oksidasyonuda hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücresel moleküllerin nitrolizasyonuna, nitrasyonuna proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına yol açabilirler.

Organizmanın prooksidan/oksidan dengesi, sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan antioksidan sistemi mevcuttur. Antioksidanlar, endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılır. Enzim olan endojen antioksidanları süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon S-Transferaz, Katalaz, Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz olarak sayabiliriz. Enzim olmayan endojen antioksidanlar ise melatonin, serüloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilurubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albumindir. Vitamin olan eksojen antioksidanlar alfa tokoferol (Vitamin E), Beta karoten, askorbik asit (Vitamin C), Folik asit (folat) olarak sayılabilir. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlardan bazıları, ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol), demir şelatörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin) sayılabilir.

SOD, süperoksit serbest radikalinin, hidrojen peroksit (H2O2) ve serbest oksijene (O2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O_2 üretilmesine rağmen, hücre içi düzeyi, SOD tarafından düşük tutulur. Ancak H_2O_2 geçiş metalleri varlığında son derece aktif OH radikaline dönüşmektedir. Bu durumda katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesi artarak H_2O_2 düzeylerini kontrol altına almaktadır.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-R) ise gerek H2O2 ve LOOH'leri metabolize etmektedir. GSH-Px 'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Glutatyon S-Transferaz (GST), yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan antioksidanlardandır.

Glutatyon (GSH), hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan birleşiğidir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellemesinde rol alır. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar (30).

2.1.3.4. Sepsiste mortalite ve organ yetmezliği

Çoklu organ yetmezliği, sepsis olan hastaların ölümlerinin en önemli nedenidir. Her bir organ yetmezliği için ölüm riski %15–20 oranında artmaktadır. Ciddi sepsisteki iki organ yetmezliğinde bu oran %30–40 civarındadır. Sepsiste organ yetmezliğinin insidansı organ yetmezliklerinin tanımlama kriterlerine göre değişmekle birlikte, burada bahsedilen ciddi organ yetmezliğidir. Solunum yetmezliği sepsiste erken dönemde görülen organ yetmezliklerinden biridir. Diğer organ yetmezliklerinden koagülasyon sistemi, karaciğer, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve böbrek yetmezliği sepsiste sıklıkla görülebilen ve mortaliteyi artıran sorunlardır. Sepsiste olan intravasküler sistemin azalması, periferal vazodilatasyon, miyokardiyal depresyon ve mikrovasküler dolaşımın dağılımının bozulması ile doku oksijen dağılımı ve tüketimi arasında bir dengesizlik oluşur. Bu dengesizlik sonucunda global doku hipoksisi oluşur. Bu doku hipoksisinin giderilmesi mortalitenin azalmasına neden olmaktadır.

Sepsiste akciğer patolojilerinin en ağır olanları kuşkusuz ki akut akciğer hasarı ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS)'dur. Sepsis hastalarının %25-42'sinde ARDS oluştuğu ve hipotansiyon ile sıklığının arttığı gösterilmiştir. ARDS mortalitesi giderek azalmakla birlikte %40 civarında olduğu bilinmektedir. Mortalite solunum yetmezliğinden çok sepsis ve çoklu organ yetmezliğine bağlıdır. Sepsis eğer akciğer kaynaklı ise akciğer dışı kaynaklı sepsise göre ARDS riski çok daha fazladır.

Akut böbrek yetmezliği (ABY) sepsisin sık görülen ve prognozu kötüleştiren bir komplikasyonudur. ABY' si olan septik hastalarda mortalite %74,5 iken, böbrek yetmezliği olmayan septik hastalarda %45,2 olarak bildirilmiştir. Sistemik hipotansiyon sonucu oluşan renal iskemi, ABY için çok önemli faktör olmakla birlikte tek faktör değildir.

Vazodilatatör ve vazokonstrüktör maddelerin dengesizliği sonucunda oluşan intrarenal vazokonstrüksiyon, böbreği infiltre eden inflamatuar hücrelerin lokal hasarı, lokosit endotel ilişkisi sonucunda olan medüller konjesyona bağlı bölgesel kan akımının daha da azalması, intraglomerüler trombozlar gibi faktörlerin hepsi sepsiste ABY oluşmasında rol oynar.

2.1.3.5. Sepsiste karaciğer yetmezliği

Karaciğer sepsis patolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Karaciğer burada hem bir aktör, hem bir mağdurdur. Karaciğerin bu ikili rolünü iki temel mekanizma açıklar. Birincisi toplam debinin %25'ini alan karaciğer kanlanmasıdır. Bu akımı sağlayan portal kan akımı splaknomezenterik alandan kaynaklanır ve bu bölge sepsiste oluşan vazokonstruksiyon ve bakteriyel translokasyondan en çok etkilenen bölgedir. İkincisi kupper hücreleri, hepatositler ve endotelyal sinüzoidal hücrelerden oluşan karaciğerin heterojen hücresel yapısıdır. Bu hücrelerin hepsi bağışıklık, antienfeksiyöz ve metabolik rollere sahiptir.

Primer karaciğer disfonksiyonu, şok ve resusitasyon sonrası gelişen sepsise bağlı disfonksiyonu ifade eder. Bu disfonksiyon dissemine intravaslüler koagülasyon ve kanamalara yol açar, laktat ve aminoasit klirensi azalır, protein sentezinde düşüş görülür. Transaminazların yükselmesi bu durumun özelliği olup, akut hücresel, mitokondrial hasarı gösterir. Bu enzimler resusitasyonu takiben birkaç gün içerisinde normale döner. Sepsisteki primer karaciğer disfonksiyonunun nedeni, yetersiz perfüzyon gibi gözükmektedir. Splanknik alandaki vazokonstrüksiyon sonucunda portal kan akımı perfüzyondaki azalmanın en önemli nedenidir. Primer karaciğer disfonksiyonunun tek nedeninin perfüzyon bozukluğu olmadığını düşündüren kanıtlar vardır. Bunlara örnek olarak TNF-α ve endotoksin infüzyonu perfüzyonda değişikliğe yol açmaksızın hepatik hücresel disfonksiyona yol açmaktadır.

Sekonder karaciğer disfonksiyonu, çoğunlukla karaciğer fonksiyonlarının normal olduğu dönemde bakteriyel endotoksinin yayılması ile oluşur. Aktive olmuş kupper

hücreleri sonucunda karaciğerde enflamasyon gelişir ve koagülasyon, kallikrein ve kompleman sistemleri aktive olur. Kuppfer hücreleri karaciğerde oluşan hasar karşısında doku faktörü üretir. Endotoksin ile uyarılmış karaciğer hasarı olan ratlarda önceden rekombinant doku faktörü inhibitörü enjeksiyonu yapılması karaciğer hasarını belirgin bir şekilde azaltmaktadır. Aktive olmuş kuppfer hücrelerinden salınan lökotrienler ve TNF -α nötrofillerin karaciğer parankimine migrasyonuna neden olur. Bu nötrofillerden salınan proteazlar ile serbest oksijen radikalleri hepatosit hasarına neden olur.

Sepsiste oluşan karaciğer disfonksiyonu çoklu organ yetmezliğine neden olabilir veya onu daha da kötüleştirebilir. Sepsise bağlı karaciğer yetmezliğinin organ perfüzyonunda bozulma, endotoksinin direkt hasarı, oluşan parankimal enflamasyon ve salınan sitokinlere bağlı olduğu bilinmektedir (9).

2.1.3.6. Sepsiste tedavi

Sepsis ve septik şok patogenezi hakkında bilgilerin artmasıyla, etkene yönelik tedavi girişimleri ortaya konmuştur. Tedavi genel olarak, antimikrobiyal tedavi, hemodinamik ve metabolik değişikliklerin farmakolojik tedavisi, sepsis mediatörlerinin baskılanması olarak sınıflandırılabilir.

Antimikrobiyal tedaviye, etken mikroorganizma belirlenene kadar, ampirik olarak başlanır. Antibiyotik verilmeden önce uygun kültürler alınır. Septik şok belirti ve bulguları ortaya çıktıktan sonra ilk altı saat prognoz açısından oldukça önemlidir. Bundan dolayı antimikrobiyal tedaviye kültürler alındıktan hemen sonra, geciktirilmeden başlanmalıdır.

Septik şokta sıvı açığı ve replasmanı tedavinin en önemli unsurlarındandır. Septik şokun erken evreleri, düşük dolum basınçları ve düşük kardiyak debi ile birliktedir. Septik şok tedavisinde, kan ve plazma hacmi artırılarak, kardiak debi yükseltilmelidir.

Sepsis tedavisinde ölüm riskini azalttığı gösterilen, diğer önemli ajan kortikosteroidlerdir. Yayınlanan sepsis kılavuzlarında, vazopresör gerektiren septik şok tablosunda hastalara kortikosteroid tedavi önerilmektedir (20). Ancak bütün bu tedaviler

henüz sepsise bağlı mortaliteyi azaltamamış, hatta gelişen teknolojilere rağmen, yoğun bakım ünitelerinde sepsise bağlı mortalite oranlarının giderek arttığı gözlenmiştir. Buda bilim adamlarını sepsis tedavisi için yeni hedefler aramaya itmektedir.

2.2. SİLDENAFİL

2.2.1. Sildenafil ve etki mekanizması

Sildenafil selektif bir fosfodiesteraz Tip5 (PDE–5) inhibitörü olup, tüm dünyada erektil disfonksiyon tedavisinde etkin olarak kullanılan bir ilaçtır. PDE–5 enzimi kavernozal cisim düz kas hücrelerinde bulunan protein yapıda bir enzim olup, aktif siklik guanozin monofosfatı (c-GMP), inaktif guanizon monofosfata (GMP) dönüşümünü katalize ederek, kavernozal cisim düz kas hücresi içerisindeki iyonize kalsiyum (Ca^{+2}) miktarını artırır. Bu duruma bağlı olarak kavernozal cisim düz kas hücresi relaksasyon sürecinden çıkarak kontraksiyon sürecine girer. Seksüel sitimulusla nonadrenarjik ve nonkolinerjik terminal sinir uçlarından ve endotel hücrelerinden salınan NO kavernozal hücrelere difüzyonla geçerek guanilat siklaz enzimini aktive eder ve c-GMP düzeyini artırır. Artan c-GMP' de protein kinaz-G enzimini aktive ederek kavernozal hücrelerdeki intrastoplazmik Ca düzeyini azaltır ve kavernozal ereksiyon oluşumu için gerekli relaksasyon süreci başlar. Spesifik tip–5 PDE inhibitörleri c-GMP' yi metabolize eden PDE' leri inaktive eder. Buna bağlı olarak, c-GMP'nin birikimi düz kas relaksasyonunun artmasına ve hedef dokuda kan akımı artışına neden olur. Sildenafilin yaygın görülen baş ağrısı, yüzde flushing, nazal konjesyon ve dispepsi gibi yan etkileri vasküler ve visseral düz kaslardaki PDE-5 inhibisyonuna bağlı olarak gelişmektedir.

Oral alımından sonra sildenafil hızla absorbe olur ve maksimum plazma konsantrasyonuna 1 saat içinde ulaşır. Sildenafil %96 oranında plazma proteinlerine bağlanır ve geri kalan %4 bağlı olmayan serbest ilaç plazmada dolaşıma katılarak PDE–5 inhibisyonu ile intraselüler etkisini gösterir. Sildenafil eliminasyonu sitokrom P450 enzim sistemiyle inaktif metabolitlerine dönüşerek gerçekleşir. Sildenafil erektil disfonksiyonu tedavi edici etkisi yanında, konjestif kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon gibi

kardiovasküler hastalıklarda da etkili olduğu, bazı çalışmalarda gösterilmiştir (31).

Yapılan hayvan çalışmalarında sildenafilin, alveolar büyümeyi ve anjiogenezisi koruduğu ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (11, 12). c-GMP' nin metabolizmasının inhibisyonu, nitrik oksit bağımlı mekanizmayla, korpus kavernozumu besleyen arteriollerin etrafındaki düz kas relaksasyonuna yol açar. PDE-5 inhibisyonu c-AMP ve c-GMP konsantrasyonlarını lokal olarak artırarak, pulmoner vasküler düz kasların relaksasyonuna yol açmaktadır (32). Sildenafil NO bağımlı mekanizma ile e-NOS ve i-NOS oluşumuna neden olmaktadır. c-AMP ve c-GMP en önemli hücre içi ikincil habercilerden olup, enflamasyon gibi hücresel olaylarda etkin rol oynamaktadır (29, 33).

Sildenafilin oksidatif stresi ve enflamasyonu azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (13, 14). Başka bir hayvan çalışmasında diabetik ratlarda sildenafilin oksidatif stres ve enflamasyona karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (15).

2.2.2. Sildenafil ve sepsis:

Çadırcı ve arkadaşlarının yaptığı, çekum ligasyonu ve perforasyonu (ÇLP) uygulayarak polimikrobiyal sepsis modeli oluşturdukları ratlardaki histopatolojik ve biyokimyasal çalışmada, akciğer ve renal doku örneklerinde, sildenafilin koruyucu etkisini incelemişler. Sildenafilin GSH seviyelerini yükselttiği ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini, lipit peroksidaz (LPO), süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerini ise düşürdüğünü göstermişlerdir. Aynı çalışmada 20 mg/kg sildenafil ile tedavi edilen grubun, kontrol grubuna göre akciğerler ve böbrek dokularındaki biyokimyasal parametreleri düzelttiği gösterilmiştir. Çalışmanın bir başka sonucuda histopatolojik olarak incelenen akciğer ve böbrek dokularının yapılan enflamasyon skorlarında, sildenafil grubuyla diğer kontrol grubu arasında farklılıklar olduğunu ve sildenafil 20 mg /kg ile tedavi edilen grupta enflamasyon skorunun en az olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Sildenafil tedavisinin TNF-α seviyelerini kontrol grubuna göre düşürdüğü aynı çalışmada gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, sildenafilin, çekum ligasyonu ve perforasyonu (ÇLP) ile polimikrobiyal sepsis oluşturulan ratlarda, akciğer ve böbrek dokularına karşı oluşan doku hasarında koruyucu

etkisi olduğu ve sepsis patofizyolojisinde çok önemli bir proinflamatuar sitokin olan TNF-α seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (16).

3. MATERYAL METOD

Çalışmada 220–250 gr ağırlığında toplam 24 adet erkek Wistar rat kullanıldı. Çalışmada kullanılan ratlar Atatürk Üniversitesi Hayvan Laboratuarı ve araştırma merkezi (ATADEM)' den sağlandı. Çalışmaya kadar ratlar kafeslere konularak, nemi ısısı ve ışığı kontrol altına alında alınan odalarda tutuldu. Laboratuar koşullarında sınırsız rat yemi ve su ile beslendi. Operasyon öncesi ve sonrası 12 saat süresince sadece su almalarına izin verildi.

3.1. İlaçlar ve Kimyasallar

Laboratuarda kullanılan kimyasallar Sigma Chemical Co.'dan temin edildi. Sildenafil (SLD) Phizer (Türkiye)'den temin edildi.

3.2. Çalışma Dizaynı

Ratlar 4 gruba ayrıldı. Her bir grupta 6 adet rat kullanıldı.

1. 10 mg /kg sildenafil (SLD) verilmiş çekal ligasyon perforasyon (ÇLP) grubu
2. 20 mg /kg SLD verilmiş ÇLP grubu
3. ÇLP grubu
4. SHAM operasyon grubu

3.3. Sepsis Modeli

Çekal ligasyon perforasyon (ÇLP), polimikrobiyal sepsis modeli ratlara uygulandı. Bütün ratlara inraperitoneal 25 mg /kg thiopental verildi. Denekler sırtüstü pozisyonda sabitlendikten sonra abdominal bölge traş edilerek, 2 kez povidon iyot ile silindi. Steril örtü örtülerek aseptik koşullar sağlandı. 2 cm' lik orta hat insizyonu ile karın açıldı. Çekum bulunarak eksplore edildi. İleoçekal valvin distalinden 3/0 ipekle bağlanıp, çekum ön yüzü 22 G iğne ile iki defa delindi. Feçes çıkışı gözlendikten sonra batın iki tabaka altında halinde, 3/0 ipekle, devamlı sutürle kapatıldı. SHAM operasyon grubunda, çekum bulunarak eksplore edildi. Sonrasında herhangi bir işlem yapılmaksızın, batın iki tabaka

halinde kapatıldı. Cerrahi işlem sırasında ve 6 saat sonrasına kadar, bütün ratlara 2ml kg'dan subcutan olarak serum fizyolojik verildi. Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra sildenafil verilen gruplara 10 ve 20 mg/kg'dan oral olarak salinle gavaj yapılarak verildi. Yapılan çalışmalarda ratlara verilen sildenafil dozları 0,4 mg/kg ile 90 mg/kg arasında değişmektedir (34-39). Yapılan bir çalışmada 10–20 mg/kg oral sildenafil dozunun, insanlardaki 50 mg plazma konsantrasyonu ile benzer sonuçlar verdiğini göstermiştir. Biz ilk olarak, ÇLP' nin indüklediği organ hasarında, sildenafilin koruyucu olup olmadığı, eğer koruyucu ise hangi dozunun efektif olduğunu belirlemeye çalıştık. Sonuç olarak yapılan önceki çalışmalardaki sildenafil dozu örnek alınarak 10 ve 20 mg/kg dan sildenafil dozu oral olarak verildi (40-42).

ÇLP sepsis modelindeki survey oranları kullanılan iğnenin boyutuna göre değişmektedir. Otero-Anton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ÇLP uygulan ratlarda kullanılan iğnenin boyutuna göre mortalite artmaktadır. Çalışmada 0,5 cm çapında bisturi insizyonu veya 13 gauge, 16 gauge, 18 gauge, 22 gauge iğnelerle perforasyon sonrasında hayvanlar 1 hafta boyunca mortalite açısından değerlendirmişlerdir. Mortalite oranı perforasyon genişliği artıkça, %27'den %95'e kadar çıkmıştır (43). Biz de çalışmada mortalite oluşmadan hayvanlardan karaciğer örneği alabilmek amacıyla 22 gauge iğne kullandık.

Çalışmamızda bütün gruplardaki ratlar 16 saat sonra overdoz genel anestezi ile öldürüldü (thiopental sodyum, 50 mg/kg). Ratların karaciğer spesmenleri alınarak buzlu salin solüsyonuna konuldu. Karaciğerin yarısı, -80^0C'de saklanarak biyokimya laboratuarına, diğer yarısı %10 formalin solüsyonuna konarak histopatolojik inceleme için histoloji laboratuarına götürüldü.

3.4. Doku Biyokimya Değerlerinin Ölçümü

Çalışma sonunda hızlı bir şekilde elde edilen rat karaciğerleri makroskobik olarak incelendikten sonra dokular biyokimyasal incelemeler için -20^oC'de saklandı. Dokuların enzim aktiviteleri en geç üç gün içerisinde analize alındı. Karaciğer dokusu

homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda süperoksit dismutaz (SOD) ve myeloperosidaz (MPO) aktiviteleri ile glutatyon (GSH) ve lipit peroksidaz (LPO) düzeyleri literatürlere dayalı uygun metotlar kullanılmak suretiyle ölçüldü. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Karaciğer dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildikten sonra 0,5 gramı tartılarak üzerine 4,5 ml ilgili tampon ilave edildi ve sonra bir ultra-turraks homojenizatörde 15 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar bir süzgeç kağıdından süzüldükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4^oC'de santrifüj edildikten sonra üstte kalan berrak kısımda (süpernatant) enzim aktiviteleri ve miktar tayinlerinin belirlenmesi için kullanıldı.

3.4.1. SOD Aktivitesi'nin Belirlenmesi

SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları (1988) tarafından tarif edilen yönteme göre ölçüldü. Karaciğer dokuları homojenize edildikten sonra 18000 g'de 1 saat santrifüj edildi (44).

Spektrofotometre küvetine 2450 µl ölçüm karışımı (0,3 mM Xanthine, 0,6 mM EDTA 150 µM NBT, 0,4 M Sodyum Karbonat (Na_2CO_3), 1,2 g / L BSA), 500 µl süpernatant, 50 µl ksantin oksidaz eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkübe edildi ve 1000 µl $CuCl_2$ inhibitör çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

Reaksiyon ortamında oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik kuvartz küvetler kullanılarak okundu. Seyreltme katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EU) elde edildi ve SOD aktivitesi, mmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi. Her bir numunenin ölçümü 3 kez yapılarak belirlendi.

$$EU/mg.doku=100-(1-\Delta A_{Kör}-\Delta A_{numune/}\Delta A_{Kör}) \times 100$$

3.4.2. MPO Aktivitesi'nin Belirlenmesi

Miyeloperoksidaz aktivitesi Bradley (1982) 'in belirttiği metot esas alınarak yapıldı (45). 0,1 gr doku alınarak üzerine 10 ml 50 mM fosfat tamponu (PH 6,0) ilave edilerek

homojenize edildi. Oluşan homojenat 3500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar MPO aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2,8 ml ölçüm tamponu, 0,12 ml homojenat tamponu ve 0,12 ml numune çözeltisinden ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuartz küvet spektrofotometrede 460 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla 5 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedildi

Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı ($\varepsilon_{H_2O_2}$), 0,00394 (μmol^{-1} x mm^{-1}) alınarak A = ε.b.c formülünden 460 nm'de, dakikada 1 mmol H_2O_2'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak mmol/min= A/39,4 x 30 şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. MPO aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak µmol/dakika/mg doku olarak tarif edildi. Deney sonuçları 3 paralel tekrar halinde yapıldı.

3.4.3. GSH Miktarı'nın Belirlenmesi

Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre yapıldı (46). Homojenatlar, 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 1500 µl ölçüm tamponu (0,2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH=8,2), 500 µl süpernatant, 100 µl 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ve 7900 µl metanol pipetlenerek vortekslendi. Karışım 37^{o}C' de 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra spektrofotometre ile ölçümler yapıldı.

Oluşan sarı renk miktarları 412 nm'de 3 ml'lik kuartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanılarak numunelerin GSH miktarı belirlendi. Numunelerin GSH miktarları, nmol/mg doku olarak tarif edildi. Her bir numunenin ölçümü 3 tekrar yapılarak elde edildi.

3.4.4. LPO Miktarı'nın Belirlenmesi

Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre belirlendi (47). Homojenatlar, 5000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl % 8 sodyum dodesil sülfat (SDS), 750 µl % 20 asetik asit, 750 µl % 0.08 TBA ve 150 µl saf su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100 ^{o}C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml n-bütanol ilave edildi ve spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.

Oluşan kırmızı renk miktarları 532 nm'de 3 ml'lik küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak numunelerin MDA miktarı belirlendi. Numunelerin LPO miktarları, nmol/g doku olarak tarif edildi. Her bir numunenin ölçümü 3 kez tekrarlanarak verildi.

3.5. Histolojik işlemler

3.5.1. Işık Mikroskopi

Tüm gruplardaki sıçanlardan alınan karaciğer dokularına kod numaraları verilerek içinde % 4'lük formaldehit içeren şişelere bırakıldı. Ardından aşağıda belirtilen sırası ile doku takip işlemlerine geçildi.

1. Akarsuda yıkama (gün boyu)
2. %70'lik Alkolde (Merck)® 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 (Merck)®10 dakika bekletme
9. Ksilende 10 dakika bekletme

10. Ksilende 10 dakika bekletme

İşlemlerine hazır hale getirildi. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT) ile 5 μm'lik kesitler cam lamlar üzerine alındıktan sonra aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutularak boyama işlemi gerçekleştirildi.

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

İncelemeye hazır hale gelen kesitler, Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

3.6. İstatiksel analiz

Gruplardan elde edilen sayısal verilerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak tablo halinde verildi. İstatistiksel analizler SPSS 12,0 for Windows paket programı yardımıyla yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans incelemesi (ANOVA) ve Duncan'ın multiple range testi (DMRT) ile yapıldı. P değeri 0,05 değerinin altında olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

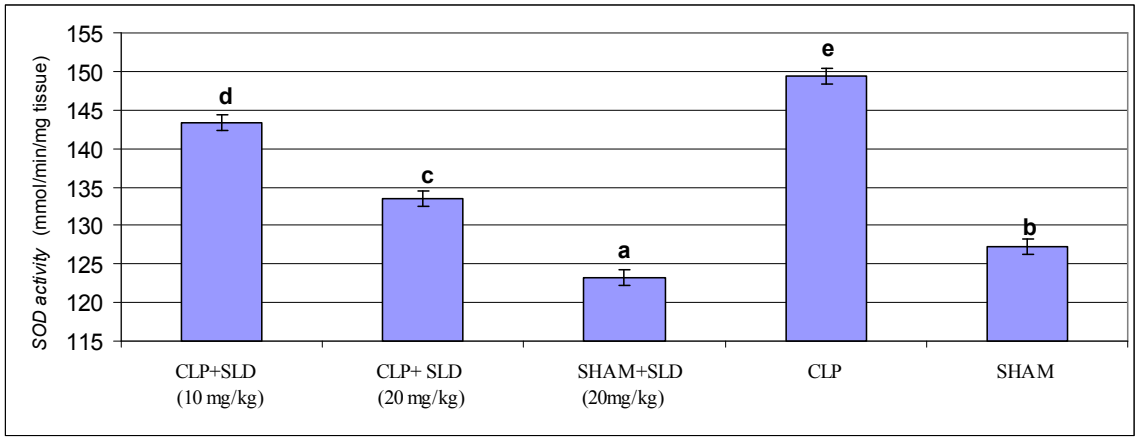
4.1. Ratların Karaciğer Dokularındaki Biyokimyasal Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Seviyeleri

Çalışmamızda sepsis sürecinde karaciğer dokusunda oluşan antioksidan aktiviteyi göstermek için SOD ve GSH seviyeleri ölçüldü. Oksidan aktivite ise MPO ve LPO seviyeleri karaciğer dokularında ölçülerek değerlendirildi. SOD ve MPO aktiviteleri ile GSH ve LPO seviyeleri bütün karaciğer dokularında çalışılarak Tablo-1'de sunulmuştur. ÇLP polimikrobiyal sepsis grubunda, SHAM grubuna göre SOD ve MPO aktiviteleri, GSH ve LPO seviyeleri yüksek olarak bulundu ($p<0,05$) Sildenafil uygulanmış bütün gruplarda, ÇLP uygulanmış gruplara göre, yüksek GSH seviyeleri bulundu. 20 mg/kg sildenafil dozu uygulanmış ratlarda, SHAM grubuna göre, yüksek GSH seviyeleri gözlendi. Bununla birlikte sildenafilin bütün dozları, ÇLP grubuna göre, LPO seviyelerinde anlamlı düşüş (($p<0,05$), MPO seviyelerinde anlamlı artış gösterdi. 20 mg/kg sildenafil uygulanmış ratlarda, biyokimyasal parametrelerde iyileşmeler gözlendi. Çalışmamızda sham grubunda düşük olan SOD ve MPO aktiviteleri ÇLP ile uygulanan polimikrobiyal sepsis modelinde oldukça artmıştır. Sham grubunda düşük olan MPO, ÇLP indüksiyonu ile artmıştır. SLD uygulandığında da MPO seviyesi hem sham grubunda, hem ÇLP grubunda artmıştır. Çalışmamızda septik karaciğer dokularında GSH ve LPO seviyeleri de artmıştır. SLD sham grubuna uygulandığında da koruyucu GSH miktarını artırmış ve hasar verici LPO miktarını azaltmıştır.

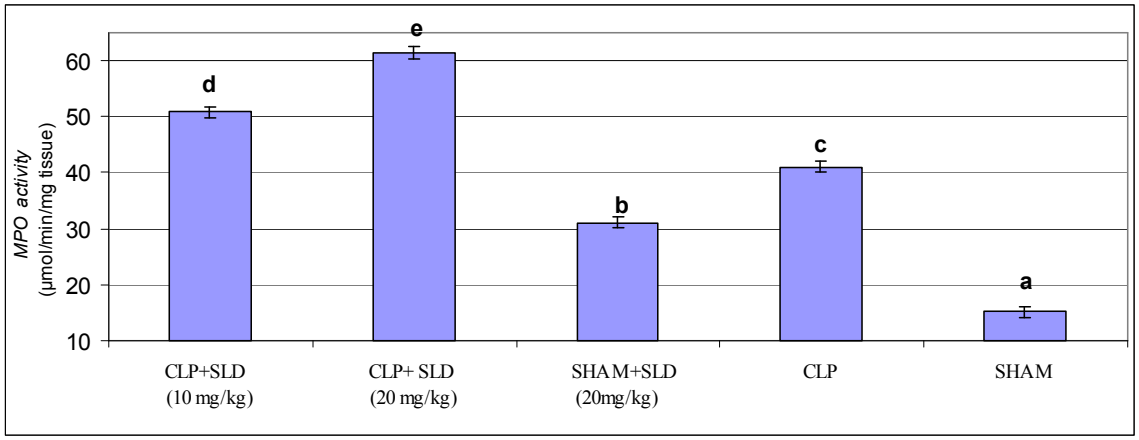
Tablo-1.Sildenafil tedavisinin, karaciğer dokusundaki MPO, SOD enzim aktivitesindeki ve LPO ve GSH seviyelerindeki değişiklikleri

Tedaviler (Karaciğer dokusu)	*N*	*SOD aktivitesi (mmol/min/mg doku)*	*MPO aktivitesi (µmol/min/mg doku)*	*LPO seviyesi (nmol/g doku)*	*GSH seviyesi (nmol/mg doku)*
ÇLP+SLD (10 mg/kg)	6	143.3±0.1d	50.8±0.1d	54.1±0.3d	3.7±0.1c
ÇLP+ SLD (20 mg/kg)	6	133.4±1.2c	61.4±0.1e	34.3±1.0c	4.1±0.1d
SHAM+SLD (20mg/kg)	6	123.3±0.4a	31.1±0.2b	8.7±0.5a	3.7±0.1c
ÇLP	6	149.4±0.5e	41.0±0.5c	68.1±0.4e	3.2±0.04b
SHAM	6	127.2±0.6b	15.2±0.2a	25.0±0.1b	3.0±0.04a

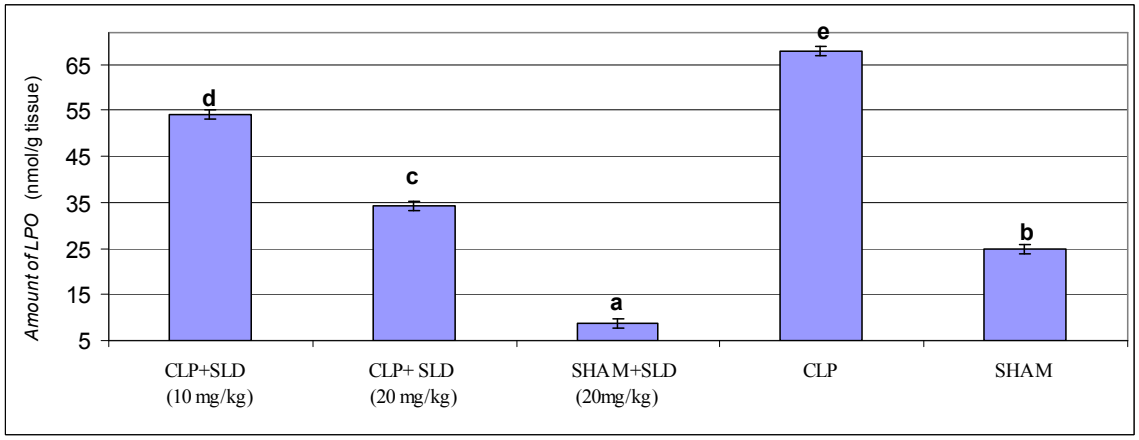
Aynı kolonda aynı harf ile gösterilen veriler arasında Duncan (α=0.05) testine göre anlamlı fark yoktur. N: Rat sayısı



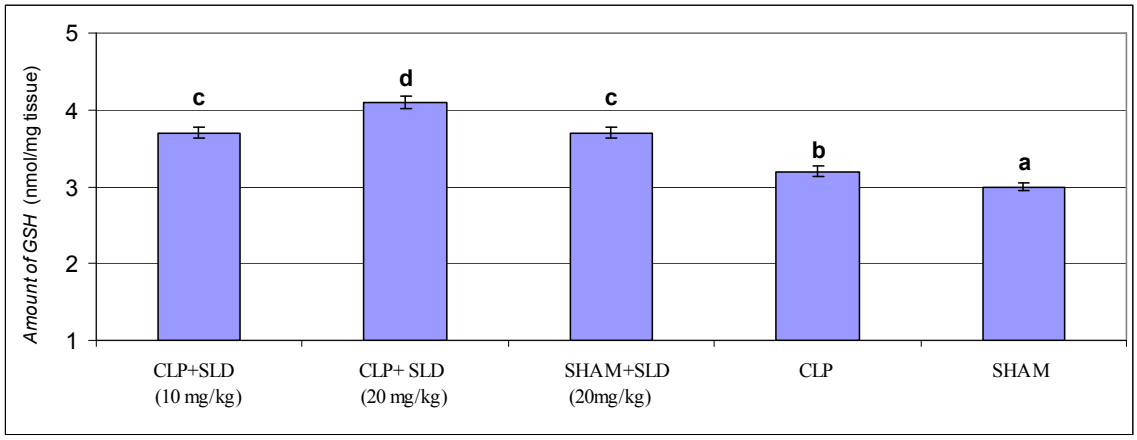
Grafik-1. Sildenafilin (SLD), farklı dozlarının, ratların karaciğer dokusunda, SOD üzerine etkisi. Grafikte aynı harfle gösterilen sütunlar arasında Duncan (α=0.05) testine göre anlamlı fark yoktur. Sonuçlar Ortalama ± Standart Hata olarak gösterildi. Hayvan Sayısı = 6



Grafik- **2.** Sildenafilin farklı dozlarının, ratların karaciğer dokusundaki, MPO aktivitesine etkisi. Grafikte aynı harfle gösterilen sütunlar arasında Duncan (α=0.05) testine göre anlamlı fark yoktur. Sonuçlar Ortalama ± Standart Hata olarak gösterildi. Hayvan Sayısı = 6.



Grafik-3. Sildenafilin farklı dozlarının, ratların karaciğerindeki, LPO seviyesine etkisi. Grafikte aynı harfle gösterilen sütunlar arasında Duncan (α=0.05) testine göre anlamlı fark yoktur. Sonuçlar Ortalama ± Standart Hata olarak gösterildi. Hayvan Sayısı = 6



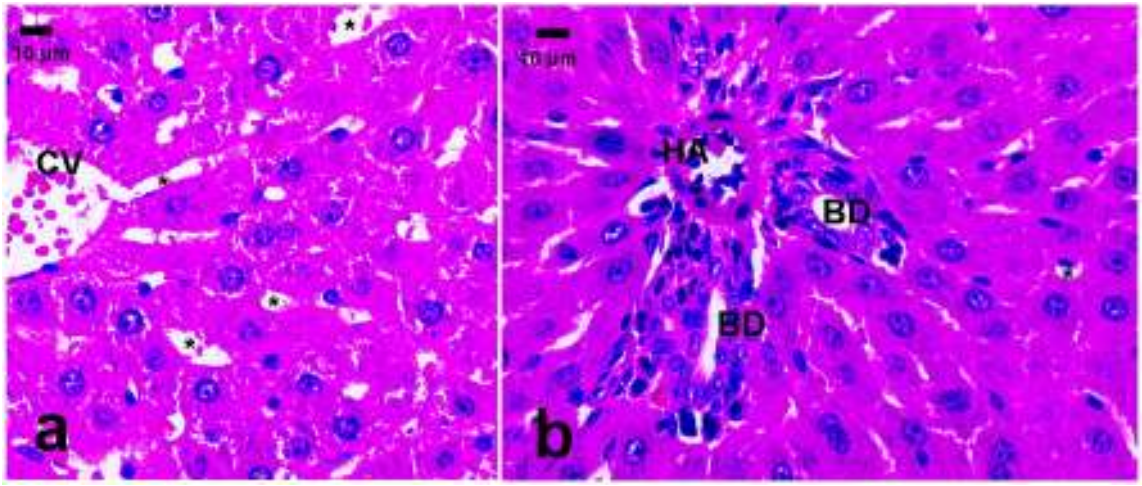
Gafik-4. Sildenafilin, farklı dozlarının, ratlardaki karaciğer dokularındaki, GSH seviyelerine etkisi. Grafikte aynı harfle gösterilen sütunlar arasında Duncan (α=0.05) testine göre anlamlı fark yoktur. Sonuçlar Ortalama ± Standart Hata olarak gösterildi. Hayvan Sayısı = 6.

4.2. Histopatolojik Bulgular:

4.2.1. Sham Grubuna Ait Bulgular:

Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri incelendiğinde; karaciğer lobüllerinin ortasındaki vena sentralisin kontürlerinin düzenli olduğu, buradan çıkan hepatositlerin Remark kordonlarını oluşturmak üzere ışınsal olarak dizildiği, hepatositlerin aralarında ise endotelle döşeli 1 ve ya 2 eritrositin geçebileceği genişlikte sinüzoidlerin varlığı gözlendi (Şekil 1-a).

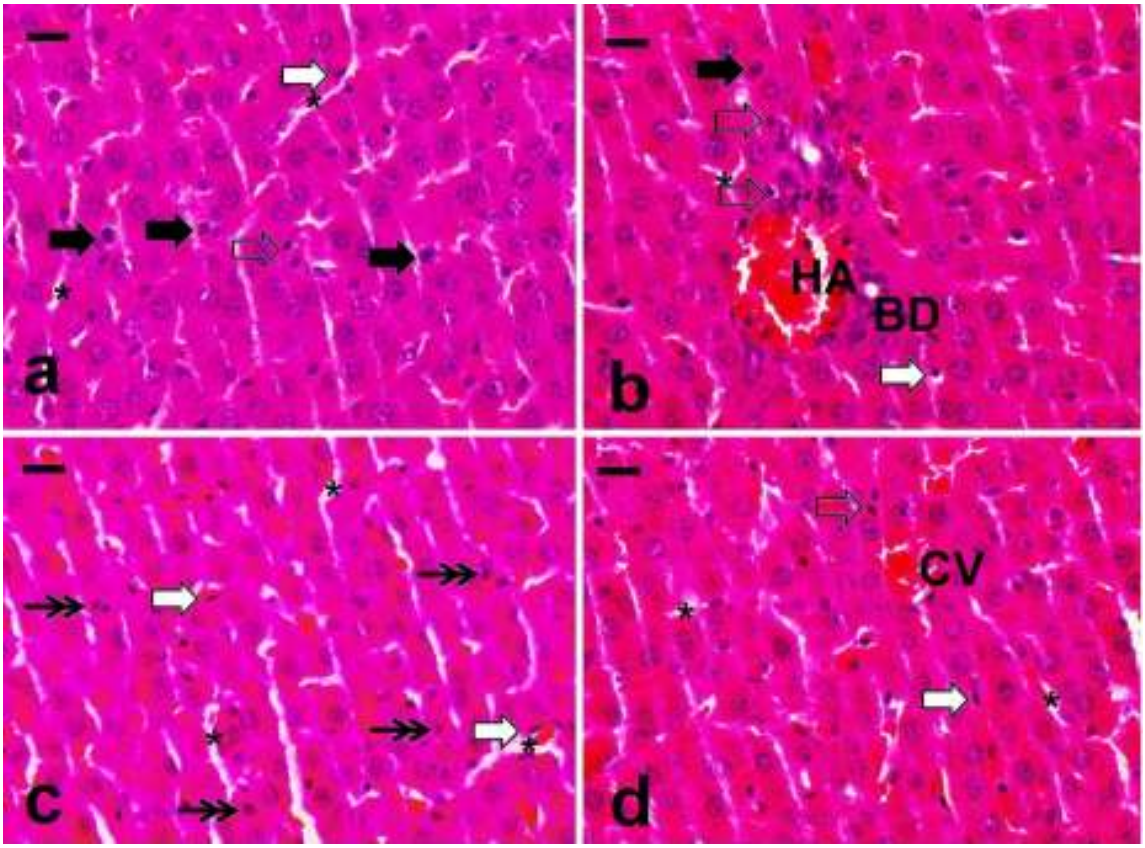
Hepatik lobülün periferinde ise portal alanı oluşturan hepatik arteriyol ile safra kanalının dalı portal alanı oluşturmakta ve aralarında enflamatuar hücreler izlenmekteydi. Portal alandan çıkan periportal hepatositler ise düzgün sınırlı kordlar oluşturmakta ve endotelle çevrili sinüzoidleri çevrelemekteydi. (Şekil 1-b)



Şekil 1: Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri. a) Sentral alan, b) Portal alan. CV: V. Sentralis, *: sinüzoid, HA: hepatik arteriol, BD: safra kanalının dalı. Boya H&E. Kesit kalınlığı 5 µm.

4.2.2. ÇLP Grubuna Ait Bulgular:

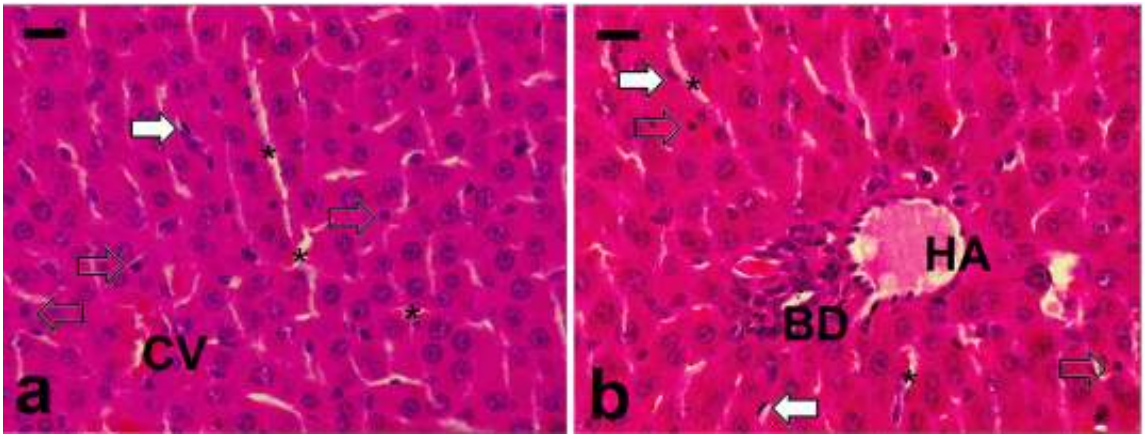
ÇLP grubuna ait karaciğer kesitleri incelendiğinde (Şekil 2a); hepatositlerin sitoplazmalarının kontrole oranla daha eozinofilik boyandığı ve hücre membran sınırlarının düzensizleştiği (Şekil 2b), sinüzoidlerin daraldığı ve içlerinde nötrofil, lenfosit gibi enflamatuar hücrelerin varlığı, hem sinuzoidleri döşeyen hem de hepatik arteriyol ve sentral vene ait endotel hücrelerinin nükleuslarında hiperkromazi ve dejenerasyon tespit edildi. Bununla birlikte hafif derecede konjesyon ve yer yer apoptoza uğramış hepatositler de dikkati çekmekteydi (Şekil 2-c ve 2d) .



Şekil 2: CLP grubuna ait karaciğer kesitleri. CV: V. Sentralis, *: sinüzoid, HA: hepatik arteriol, BD: safra kanalının dalı. Beyaz ok: endotel, Siyah ok: nötrofil infiltrasyonu, Transparan ok: Lenfosit infiltrasyonu, Çift başlı ok: Apopitoza uğrayan hepatositler ve apoptotik cisimcikler. *Barlar 15 µm; boya H&E. kesit kalınlığı 5 µm.*

4.2.3. ÇLP Uygulanıp 10 mg/kg Sildenafil Verilen Gruba Ait Sonuçlar:

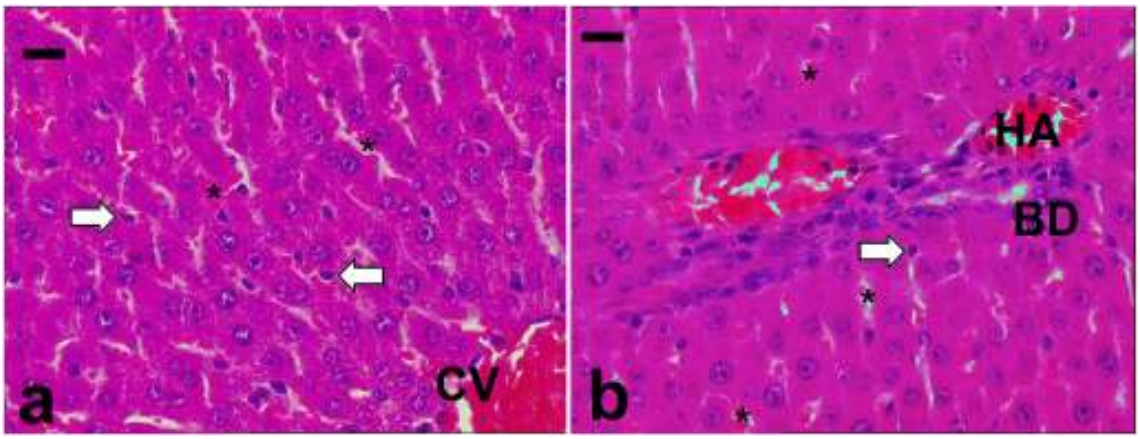
Sentral ven ve sinüzoidler incelendiğinde; her ikisinde de hafif derecede konjesyon, intrasinuzoidal lenfositler dikkati çekmekteydi. Ancak hem konjesyon hem de intrasinuzoidal enflamasyon ÇLP grubuna oranla oldukça azalmıştı. Bu bölgedeki hepatositler ise eozinofilik sitoplazmaya sahipti (Şekil 3a). Portal alan incelendiğinde ise yine hafif konjesyon bulguları ile hafif enflamasyon dikkati çekmekteydi (Şekil 3b). Bu haliyle 10 mg Sildenafil uygulamasının kısmen karaciğer üzerine iyileştirici etkileri olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 3: CLP uygulanıp 10 mg sildenafil verilen gruba ait karaciğer kesitleri. CV: V. Sentralis, *: sinüzoid, HA: hepatik arteriol, BD: safra kanalının dalı. Beyaz ok: endotel, Transparan ok: Lenfosit infiltrasyonu. *Barlar 15 µm; boya H&E. kesit kalınlığı 5 µm.*

4.2.4. ÇLP Uygulanıp 20 mg/kg Sildenafil Verilen Gruba Ait Sonuçlar:

Sentral ven ve çevresi incelendiğinde; hepatositler kontrol grubu gibi daha bazofilik boyanmış, endotelle döşeli sinüzoidler kontrol grubundaki gibi kolaylıkla seçilebilmekle birlikte enflamatuar hücre içermemekteydi. Sentral ven ve sinüzoidler düzenli, Portal alan incelendiğinde ise enflamasyon gözlenmemekteydi. Hepatositler ÇLP uygulanıp 10 mg sildenafil verilen gruptakilere oranla daha bazofilik ve kontrole yakın görünümdeydi (Şekil 4a, b).



Şekil 4: CLP uygulanıp 20 mg Sildenafil verilen gruba ait karaciğer kesitleri. CV: V. Sentralis, *: sinüzoid, HA: hepatik arteriol, BD: safra kanalının dalı. Beyaz ok: endotel. *Barlar 15 µm; boya H&E. kesit kalınlığı 5 µm.*

5. TARTIŞMA

Biz bu çalışmada, çekum ligasyon perforasyonu (ÇLP) ile polimikrobiyal sepsis modeli uygulanmış ratlarda, sildenafilin, hasar oluşturulmuş karaciğer dokusuna koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık. Sildenafilin deneysel olarak hasar oluşturulmuş karaciğer dokusunda, vasküler sahada, oksidatif stresi azaltarak karaciğer hasarına koruyucu etki gösterdiğini, histopatolojik ve biyokimyasal çalışmayla gösterdik. Bu koruyucu mekanizma, polimikrobiyal sepsisteki organ hasarında en önemli mekanizma olan, oksidatif stresin ve enflamasyon derecesinin azaltılması ile olmaktadır. Çalışmamızda sham grubunda düşük olan SOD ve MPO seviyeleri ÇLP ile oldukça artmıştır. SDO süperoksit serbest radikalinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Çalışmamızda karaciğer dokusunda SOD seviyesinin artmış olması hasarlı dokuda yanıt olarak SOD seviyesinin arttığını; SLD uygulanan sıçan karaciğerlerinde SOD seviyesinin azalmış olması da SLD uygulamasının karaciğerdeki hasarı ve buna bağlı olarak artmış olan SOD aktivitesini azalttığını göstermektedir. SOD ürünü olan H_2O_2 ise MPO' nun ana substratlarından biridir. Sham grubunda düşük olan MPO, CLP indüksiyonu ile artmıştır. Bunun nedeni SOD artışına bağlı olarak ortamda biriken H2O2' nin tüketilmesi için MPO' nun da artması olabilir. SLD uygulandığında da MPO seviyesi hem sham grubunda hem CLP grubunda artmıştır. MPO immün sistemin aktivasyonunun belirteci olduğundan SLD uygulaması ile MPO seviyelerinin artması SLD' nin karaciğerdeki immün yanıtı uyardığını ve/veya desteklediğini düşündürmektedir. Çalışmamızda septik karaciğer dokularında GSH ve LPO seviyeleri de artmıştır. LPO artışı membran lipitlerinin okside olduğunun ve böylece hücresel hasarın ortaya çıktığının göstergesidir. Reaktif oksijen radikali ile hücre membran fosfolipitlerinin yapısını oluşturan poliansatüre yağ asitleri reaksiyona girerek lipit peroksidazları oluşturur. Bu olaya lipit peroksidasyonu denir. Çalışmamızda da septik sıçan karaciğerinde LPO miktarı artmıştır. Karaciğer dokusunda koruyucu olduğunu düşündüğümüz SLD uygulaması ise bu artışı azaltmıştır. SLD' nin LPO'daki bu artışı azaltmasında karaciğer GSH depolarını doldurması ve böylece antioksidan savunma

sistemini desteklemesi rol oynayabilir. SLD sham grubuna uygulandığında da koruyucu GSH miktarını artırmış ve hasar verici LPO miktarını azaltmıştır. GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan birleşiğidir. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Çalışmamızda sham grubunda düşük olan SOD ve MPO seviyeleri ÇLP ile oldukça artmıştır. Bu sonuçlar sildenafilin septik ratlarda olan koruyucu etkisini göstermektedir. Çalışmamızın başka bir sonucu da sildenafil verilmiş ÇLP uygulanmış ratlarda histopatolojik olarak karaciğer dokularında anlamlı iyileşmeler tespit edilmesidir. Buda biyokimyasal bulgularımız ile paraleldir.

Yapılan deneysel çalışmalarda sepsis ve endotoksineminin, serbest oksijen radikallerinin üretimine yol açtığı gösterilmiştir (6, 48). Blackwel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, serbest oksijen radikallerinin, sepsis patofizyolojisinde çok önemli yeri olan proinflamatuar sitokinlerin ve mediatörlerin açığa çıkmasına ve sepsisteki akut inflamatuar cevabın oluşmasına yol açtığı gösterilmiştir (7). Endotoksemi ve sepsisin endojen antioksidan kapasitenin azalmasına ve oksidan antioksidan dengenin bozulmasına yol açtığı ileri sürülmüştür (8). Serbest oksijen radikallerinin proinflamatuar etkileri arasında, endotelyal hasar, kemotaktik faktörlerin formasyonu, sitokin salınımı, mitokondrial hasarlanma olup, bu durum serbest oksijen radikallerinin artıp, oksidan antioksidan kapasite arasındaki dengesizlikten meydana gelmektedir (26, 27, 29).

Sepsiste oksidatif sistemin rolünü araştıran daha önceki bir çalışmada, Köksal ve arkadaşları plazma ve doku malonaldehit (MDA) ve GSH seviyelerinin geç sepsis evresinde oksidatif stres ve antioksidatif cevapla korelasyonunu araştırmışlar, çalışma sonucunda karaciğer, akciğer, plazma, kalp ve böbrekten alınan MDA konsantrasyonlarının arttığını ve GSH konsantrasyonlarının düştüğünü göstermişlerdir. Çalışmada, bütün gruplarda plazma MDA seviyelerinin, akciğer, karaciğer, böbrek ve kalp doku MDA konsantrasyonları ile korale olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, intraabdominal sepsis modelinde, plazma MDA ve GSH konsantrasyonlarının, doku MDA ve GSH seviyeleri ile pozitif olarak korale olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak çalışmada

ÇLP sepsis modelinde serbest oksijen radikallerinin, sepsis patofizyolojisinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (49). Sakaguchi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ratlarda salmonella endototoksini verilerek, karaciğerde hücre membran hasarı ve lipit peroksit formasyonu incelenmiş. Çalışmada, karaciğer lipit peroksit seviyesi, endotoksin verildikten sonra, kontrol grubuna göre yükseldiği ve bu artışın 2 gün sonra normal seviyeye düştüğü gösterilmiş. Aynı çalışmada SOD seviyesinin endotoksin verildikten 18–48 saat sonra düştüğü ve daha sonra yükselmeye başladığı gösterilmiş. Glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin ise endotoksin verildikten 18 saat sonra düştüğü gösterilmiştir. Çalışmada endotoksin verilen grubun, kontrol grubuna göre, karaciğerde çok düşük lipit peroksit formasyonu oluşturduğu gösterilmiş. Çalışma sonucunda, endotoksemi sonucunda oluşturulan karaciğer hücre hasarında ortaya çıkan lipit peroksit formasyonunun, serbest oksijen radikalleri sonucunda gerçekleştiği gösterilmiştir (50).

Starkopf ve arkadaşlarının yaptığı klinik çalışmada, lipit peroksidasyon seviyelerinin yükselmesinin ve antioksidan kapasitenin düşmesinin sepsis tarafından indüklendiği gösterilmiştir (51). Septik şokta SOD ve GSH seviyeleri serbest oksijen radikallerinin etkisini azaltmak için artmıştır (52). Kharb ve arkadaşlarının septik şoklu hastalarda yaptığı klinik çalışmada, septik şoklu hastalarda plazma süperoksit dismutaz (SOD) ve malonaldehit (MDA) aktivitelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu gösterilmiş. Aynı çalışmada plazma SOD ve MDA seviyelerinin oksijen serbest radikallerini oluşturduğu ve sepsisteki multiorgan yetmezliğinde rolleri olduğu gösterilmiştir (53). Ogilvie ve arkadaşlarının septik şoklu hastalarda yaptığı başka bir çalışmada, oksidan antioksidan dengenin bozulması sonucu lipit peroksidasyonun artması ve antioksidanların azalması septik şokta mortaliteyi artırdığını göstermişlerdir (54). Glutatyon oksidatif strese karşı önemli bir hücre içi koruyucu antioksidandır (55). Sepsiste hücre içi serbest oksijen radikallerinin fazla üretilmesi, mikrovasküler disfonksiyon ve organ disfonksiyonu ile birliktedir. Lipit peroksidaz miktarının ve miyeloperoksidaz aktivitesinin artması sepsisli ratlarda birlikte bulunmuştur (54). Doku lipit peroksidaz seviyeleri membran permeabilitesini değiştirebilmekte, protein degradasyonuna yol açmakta ve hücre lizisi oluşturabilmektedir (55). Doku MPO aktivitesinin lipit

peroksidasyonunun bir göstergesi olduğu sepsis geliştirilen ratlarda gösterilmiştir (53).

Ritter ve arkadaşlarının ÇLP yöntemiyle, polimikrobiyal sepsis oluşturdukları ratlarda yaptıkları deneysel çalışmada, serbest oksijen radikallerinin, mitokondrial süperoksit üretimine, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesine etkilerine ve bunların sepsis mortalitesi ile ilişkisi incelenmiş. Çalışma sonucunda SOD seviyelerinin, sepsiste mortalitenin erken göstergesi olduğu gösterilmiştir (56). Ritter ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, antioksidanlar olan N asetil sistein (NAC) ve desferoksaminin, deneysel olarak ÇLP ile polimikrobiyal sepsis modeli oluşturulan ratlarda koruyucu etkilerini araştırmışlar. Antioksidan verilmiş ratlarda düşük MPO ve yüksek mitokondrial süperoksit üretimi tespit etmişlerdir. Antioksidan tedavinin katalaz ve SOD aktivitelerini dengelediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada septik ratlarda kombine antioksidan tedavinin surveyi iyileştirdiği gösterilmiştir. Sonuç olarak kombine antioksidan tedavinin, ÇLP uygulanmış septik ratlarda oksidatif stresi, nötrofil infiltrasyonunu ve mitokondrial disfonksiyonu azalttığı ve surveyi iyileştirdiği gösterilmiştir (57).

Coşkun ve arkadaşlarının, ÇLP yöntemiyle polimikrobiyal sepsis modeli uygulanmış ratlarda yaptıkları deneysel çalışmada, antioksidan ve antiinflamatuar bir ajan olan montelukastın, proinflamatuar sitokin salınımı ve reaktif oksijen radikallerine olan inhibitör etkileri ile vital organlara olan potansiyel koruyucu etkilerini incelemişler. Montelukast tedavisi verilen grupta proinflamatuar sitokinlerin düştüğü gösterilmiş. Tedavi verilmeyen grupta LPO seviyelerinin akciğer, kalp, karaciğer ve böbrekte yükseldiği, MPO aktivitesinin ise akciğer, kalp ve karaciğer dokularında yükseldiği gösterilmiştir. Montelukastın bu etkisi böbrek haricinde tüm dokularda doz bağımlı olduğu gösterilmiştir. SOD ve GSH seviyeleri ise akciğer, böbrek ve karaciğer dokularında montelukast tedavisi sonrası artmış olarak bulunmuştur. Montelukast tedavisinin en çok akciğer ve böbreğe karşı koruyucu etkisi bulunmuş, çalışma sonucunda, montelukast tedavisinin, polimikrobiyal sepsiste, sistemik inflamatuar reaksiyonu azaltarak, multiple organ yetmezliğini azaltabileceği ileri sürülmüştür (58). Sepsiste oksidatif stresin rolünü araştıran bu bulgular, bizim çalışmamızda da artmış olan oksidatif stresle paralellik göstermektedir.

Sildenafilin karaciğerdeki oksidan antioksidan sisteme etkisini araştıran; Yıldırım ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ratlarda bleomisin verilerek indüklenen akciğer fibrozisinde, sildenafilin oksidan antioksidan dengesine ve inflame organda olan nötrofil infiltrasyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmış. Sildenafilin, doku MDA seviyelerini, MPO aktivitelerini ve serum proinflamatuar sitokinleri düşürdüğü ve GSH seviyelerini koruduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada sildenafilin bleomisinin indüklediği akciğer fibrozisli ratlarda lipit peroksidasyonunu, sitokin salınımı ve nötrofil akümülasyonunu önleyici etkisinden dolayı faydalı etkileri olabileceği belirtilmiştir. Sildenafilin mevcut etkisi, endojen antioksidan olan GSH'ın lipit oksidasyon seviyesini azaltması ile ilişkili olabilir. Doku lipit peroksidasyon seviyesinin azalması, sildenafilin yararlı etkisi olarak, oksidan antioksidan dengesine etkisi olarak yorumlanabilir (33). Karakoyun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ratlarda deneysel olarak kolit yapılarak, sildenafilin doku bütünlüğü, oksidan antioksidan dengesi ve hücre apoptozisine etkisinin gösterilmesi amaçlanmış. Sildenafilin nitrik oksit bağımlı bir mekanizmayla, oksidan antioksidan dengeye, hücre apoptozisine süperoksit üretimine ve sitokin salınımına yararlı etkileri gösterilmiştir (59). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalarda olduğu gibi sildenafil koruyucu etkisi ortaya konulmuş ve bu etki oksidan-antioksidan sistem ile ilişkilendirilmiştir.

Çadırcı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sildenafilin, ÇLP yöntemiyle polimikrobiyal sepsis oluşturulmuş ratlarda koruyucu etkisi incelenmiştir. Birincisi, 10 mg/kg sildenafil verilen ÇLP grubu, ikincisi 20 mg/kg sildenafil verilen ÇLS grubu, üçüncüsü ÇLP grubu, dördüncüsü SHAM grubu olmak üzere her biri toplam 10 adet rat içeren toplam 4 grup çalışmaya dahil edilmiştir. Bütün gruplar 16 saat sonra öldürülmüş ve akciğer, böbrek kan örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal olarak analiz edilmiş. Çalışma sonucunda, sildenafil, GSH seviyelerini yükseltirken, MPO, LPO aktivasyonunu ve SOD seviyelerini azalttığı gösterilmiş. Çalışmada sildenafil verilmiş grubun, SHAM grubuna göre karşılaştırılmasında, LPO ve MPO ve SOD aktivitelerinde azalma tespit edilmiş. 20 mg/kg sildenafil verilen grupta, SHAM grubuna göre akciğer ve böbreklerde biyokimyasal parametrelerde iyileşmeler gözlenmiştir. Histopatolojik analizlerde,

inflamasyon skorlarında sepsis grubuyla diğer gruplar arasında, 10 mg/kg sildenafil verilen grup dışında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. En düşük inflamasyon skoru, 20 mg/kg sildenafil verilen grupta tespit edilmiştir. Sildenafil verilen grupta serum TNF-α seviyelerinin, ÇLP grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışma sonucunda, ÇLP ile polimikrobiyal sepsis oluşturulan ratlarda, sildenafilin, oksidan-antioksidan dengesini etkileyerek ve TNF -α seviyesini düşürerek, akciğer ve böbrekte doku hasarını önleyici etkisi ile koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (16). Bu çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi sildenafilin bozulmuş oksidan antioksidan dengeyi düzelterek septik karaciğer üzerinde koruyucu etki gösterdiği anlaşılmıştır.

Sepsiste mikrovasküler disfonksiyon ve organ disfonksiyonu meydana gelmekte olup, akciğer, böbrek ve karaciğer en çok etkilenen organlardır (26). Karaciğer sepsis patolojisinde anahtar rol oynamaktadır. Şöyle ki toplam kan akımının %25'ini sağlayan portal kan akımı splaknomezenterik alandan kaynaklanır ve bu bölge sepsiste oluşan vazokonstruksiyon ve bakteriyel translokasyondan en çok etkilenen bölgedir. Ayrıca kupper hücreleri, hepatositler ve endotelyal sinüzoidal hücreler bağışıklık, antienfeksiyöz ve metabolik rollere sahiptir. Bizde çalışmamızda sildenafilin septik rat karaciğer dokusundaki etkisini histopatolojik olarak da araştırdık. Sildenafilin karaciğer üzerine olan etkilerini araştıran, Leonie ve arkadaşlarının, ratlarda yaptığı deneysel çalışmada, PDE–5 inhibitörlerinin, c-GMP' yi artırarak hepatik ve sistemik hemodinamiye olan etkilerini incelenmişler. Çalışmada, anestezi uygulanmış ratlara sildenafil ve vardanafil' in intravenöz enjeksiyonundan 60 dakika sonra, hemodinamik parametreler monitorize edilmiş. Portal ve hepatik arteryal rezistansın düştüğü ve aynı anda portal ven, hepatik arteryal kanlanmanın arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada, PDE-5 inhibitörlerinin düşük dozlarının, hepatik hemodinamik parametreler üzerinde belirgin olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (10). Li ve arkadaşlarının ratlara intragastrik etanol vererek oluşturdukları karaciğer hasarına, sildenafilin etkisini inceledikleri çalışmalarında, sildenafilin karaciğerde postiskemi doku hasarında olumlu etkilerinin olduğunu, öte yandan etanole bağlı karaciğer hasarını artırıcı etkileri olduğunu göstermişlerdir (60). Reichenberger ve arkadaşlarının portopulmoner hipertansiyonlu hastalarda sildenafilin

monoterapide ve inhale prostonoidlerle (iloprost, treprostinil) kombinasyon tedavisinde etkilerinin incelendiği klinik çalışmada, sildenafilin klinik, fonksiyonel ve hemodinamik parametrelerde, monoterapide ve inhale prostonoidlerle kombinasyon tedavisinde iyileşmeler gösterdiği, güvenli ve iyi tolere edilebilen bir ilaç olduğu gösterilmiştir (61). Mevcut çalışmaların aksine, sildenafilin teropatik etkisini olmadığını gösteren, Clemmesen ve arkadaşlarının yaptıkları klinik çalışmada, PDE–5 inhibitörlerinin, splanknik kan akımına ve portal hipertansiyona olan etkileri incelenmiş. Çalışmaya karaciğer biyopsisi yapılarak siroz tanısı konmuş ve hepatik venöz basınç gradienti 12 mm Hg üzerinde olan 10 hasta dahil edilmiş. Splanknik kan akımı ve hepatik venöz basınç gradienti karaciğer ven kateterizasyon yöntemiyle başlangıçta ve 50 mg sildenafil oral olarak verildikten 80 dakika sonra ölçülmüş. Çalışma sonucunda, sildenafilin hepatik venöz basınç gradientine etkisi olmadığı gösterilmiştir. Çalışmanın başka bir sonucuda, son dönem karaciğer hastalığı olan portal hipertansiyonlu hastalarda, hepatik venöz basınç gradientini düşürmek için sildenafilin teropatik ajan olarak kullanım endikasyonu olmadığı, ancak son dönem karaciğer hastalarında erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılabileceği, sildenafille beraber fiziksel aktivite ve beta bloker kullanımı ile ilgili klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu gösterilmiştir (62). Histopatolojik bulgularımızda, ÇLP karaciğer dokusunda inflamatuar hücre birikimine ve damarlarda konjesyona neden olarak oldukça hasar verici olmuştur. Hâlbuki septik sıçanlara sildenafil uygulanması karaciğerde oluşan bu histopatolojik hasarı doza bağımlı olarak azaltmış ve karaciğer dokusunu sepsisin zararlı etkilerine karşı korumuştur. Sildenafilin karaciğer üzerindeki daha önceden bildirilmiş yararlı etkileri bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir. Önceki çalışmalardan görüldüğü kadarıyla sildenafilin karaciğer üzerindeki koruyucu etkisinde karaciğer dokusunda oluşan oksidatif stresi azaltmasının yanı sıra, karaciğerin kanlanmasını düzeltmesinin de katkısı olabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada akut sildenafil uygulamasının, septik sıçanlarda oluşan karaciğer hasarını doza bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca septik sıçanlarda bozulmuş olan oksidan-antioksidan dengesini de düzelttiği gözlenmiştir. Bu da sildenafilin karaciğerdeki koruyucu etkisine aracılık ediyor olabilir. Ancak sildenafilin karaciğer üzerindeki koruyucu etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için gelecekte yeni deneysel ve klinik çalışmaların yapılması gerektiği inancındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Critical care medicine. 2001;29:1303-10.
2. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. Intensive care medicine. 2001;27 Suppl 1:S3-9.
3. Bahar M. Sepsis Patofizyolojisi. In: Dikmen Y, Demirkıran O, editor. Güncel bilgiler ışığında sepsis 2006. p. 48-52.
4. Jourd'heuil D, Morise Z, Conner EM, Grisham MB. Oxidants, transcription factors, and intestinal inflammation. Journal of clinical gastroenterology. 1997;25 Suppl 1:S61-72.
5. Van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? American journal of respiratory and critical care medicine. 1999;160:1-9.
6. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 1998;11:745-57.
7. Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. Journal of immunology. 1996;157:1630-7.
8. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock? Chest. 1998;113:1616-24.
9. Sungur M. Sepsisde Organ Destek Tedavileri. Yoğun Bakım Dergisi. 2005;5:112-21.
10. Halverscheid L, Deibert P, Schmidt R, Blum HE, Dunkern T, Pannen BH, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors have distinct effects on the hemodynamics of the liver. BMC gastroenterology. 2009;9:69.

11. Hemnes AR, Zaiman A, Champion HC. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2008;294:L24-33.
12. Ladha F, Bonnet S, Eaton F, Hashimoto K, Korbutt G, Thebaud B. Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury. American journal of respiratory and critical care medicine. 2005;172:750-6.
13. Muzaffar S, Shukla N, Srivastava A, Angelini GD, Jeremy JY. Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. British journal of pharmacology. 2005;146:109-17.
14. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, et al. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. Kidney international. 2005;68:2131-42.
15. Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lee SH, Moon JY, Lim SJ. Effects of sildenafil on oxidative and inflammatory injuries of the kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. American journal of nephrology. 2009;29:274-82.
16. Cadirci E, Halici Z, Odabasoglu F, Albayrak A, Karakus E, Unal D, et al. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. Clinical and experimental immunology. 2011;166:374-84.
17. Doğanay M. Nozokomiyal sepsis: önemi ve tanımlar. Hastane Infeksiyonları Dergisi. 1998;2:179-81.
18. Başak M, Coşansel, S., Çankır, Z., Keskin, O., Yazgan, Y., Koçak, N. Sepsis, septik şok ve tedavide son yaklaşımlar. Sendrom. 1998;10:54-61.
19. Kurt C. Sepsisle ilişkili tanımlar, epidemiyoloji, insidans ve klinik. In: Dikmen Y, Demirkıran O. , editor. Güncel bilgiler ışığında sepsis2006. p. 17-26.
20. Yorgancı K. Sepsis patofizyolojisi. Yoğun Bakım Dergisi. 2005:80-1.

21. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, et al. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. The Journal of infectious diseases. 1995;171:639-44.
22. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. The New England journal of medicine. 1999;340:207-14.
23. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. The New England journal of medicine. 1999;341:586-92.
24. Doğanay M, Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M. İnfeksiyon Hastalıkları İstanbul: Nobel Kitabevi; 1996.
25. Basile M, Romeo C, Gitto E, Spitz L, Pierro A, Eaton S. Melatonin protects from, but does not reverse, the effects of mediators of sepsis on liver bioenergetics. Pediatr Surg Int. 2004;20:263-6.
26. Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. The role of free radicals in sepsis development. Front Biosci (Elite Ed). 2009;1:277-87.
27. Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. Critical care medicine. 2006;34:886-9.
28. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. The New England journal of medicine. 2003;348:138-50.
29. Salloum F, Yin C, Xi L, Kukreja RC. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. Circ Res. 2003;92:595-7.
30. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci. 2001;939:200-15.
31. Corbin JD, Francis SH, Webb DJ. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. Urology. 2002;60:4-11.
32. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. The New England journal of medicine. 2004;351:1425-36.

33. Yildirim A, Ersoy Y, Ercan F, Atukeren P, Gumustas K, Uslu U, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. Pulm Pharmacol Ther. 2010;23:215-21.
34. Ali BH, Abdelrahman AM, Al-Salam S, Sudhadevi M, AlMahruqi AS, Al-Husseni IS, et al. The effect of sildenafil on cisplatin nephrotoxicity in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011;109:300-8.
35. Brink CB, Clapton JD, Eagar BE, Harvey BH. Appearance of antidepressant-like effect by sildenafil in rats after central muscarinic receptor blockade: evidence from behavioural and neuro-receptor studies. J Neural Transm. 2008;115:117-25.
36. Lin G, Huang YC, Wang G, Lue TF, Lin CS. Prominent expression of phosphodiesterase 5 in striated muscle of the rat urethra and levator ani. J Urol. 2010;184:769-74.
37. Medeiros PJ, Villarim Neto A, Lima FP, Azevedo IM, Leao LR, Medeiros AC. Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats. Acta Cir Bras. 2010;25:490-5.
38. Sasser JM, Baylis C. Effects of sildenafil on maternal hemodynamics and fetal growth in normal rat pregnancy. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010;298:R433-8.
39. Thorsen LB, Eskildsen-Helmond Y, Zibrandtsen H, Stasch JP, Simonsen U, Laursen BE. BAY 41-2272 inhibits the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. Eur J Pharmacol. 2010;647:147-54.
40. Bae SH, Bae SK, Lee MG. Effect of hepatic CYP inhibitors on the metabolism of sildenafil and formation of its metabolite, N-desmethylsildenafil, in rats in vitro and in vivo. J Pharm Pharmacol. 2009;61:1637-42.
41. Guzman DC, Olguin HJ, Brizuela NO, Garcia EH, Mejia GB, Jacobo AJ, et al. Effect of prostaglandin E1 (PGE1) and sildenafil on serotonin metabolism and some oxidative damage markers in rat prostate gland and brain. Andrologia. 2011;43:266-72.

42. Liebenberg N, Harvey BH, Brand L, Brink CB. Antidepressant-like properties of phosphodiesterase type 5 inhibitors and cholinergic dependency in a genetic rat model of depression. Behav Pharmacol. 2010;21:540-7.
43. Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo 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.
44. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988;34:497-500.
45. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol. 1982;78:206-9.
46. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem. 1968;25:192-205.
47. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95:351-8.
48. van der Poll T, de Jonge E, Levi M. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2001;27:639-51.
49. Koksal GM, Sayilgan C, Aydin S, Oz H, Uzun H. Correlation of plasma and tissue oxidative stresses in intra-abdominal sepsis. J Surg Res. 2004;122:180-3.
50. Sakaguchi S, Kanda N, Hsu CC, Sakaguchi O. Lipid peroxide formation and membrane damage in endotoxin-poisoned mice. Microbiol Immunol. 1981;25:229-44.
51. Starkopf J, Zilmer K, Vihalemm T, Kullisaar T, Zilmer M, Samarutel J. Time course of oxidative stress during open-heart surgery. Scand J Thorac Cardiovasc Surg. 1995;29:181-6.
52. Goode HF, Webster NR. Free radicals and antioxidants in sepsis. Critical care medicine. 1993;21:1770-6.
53. Kharb S, Singh V, Ghalaut PS, Sharma A, Singh GP. Role of oxygen free radicals in shock. J Assoc Physicians India. 2000;48:956-7.

54. Ogilvie AC, Groeneveld AB, Straub JP, Thijs LG. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. Intensive care medicine. 1991;17:40-4.
55. Kannan R, Kuhlenkamp JF, Jeandidier E, Trinh H, Ookhtens M, Kaplowitz N. Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. J Clin Invest. 1990;85:2009-13.
56. Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. Intensive care medicine. 2003;29:1782-9.
57. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. Critical care medicine. 2004;32:342-9.
58. Carbonell LF, Nadal JA, Llanos MC, Hernandez I, Nava E, Diaz J. Depletion of liver glutathione potentiates the oxidative stress and decreases nitric oxide synthesis in a rat endotoxin shock model. Critical care medicine. 2000;28:2002-6.
59. Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, Aydin MS, Yuksel M, Ogunc AV, et al. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. Life Sci. 2011;89:402-7.
60. Li J, Fu P, Deleon M, French BA, French SW. The effect of Viagra (sildenafil citrate) on liver injury caused by chronic ethanol intragastric feeding in rats. Experimental and molecular pathology. 2005;78:101-8.
61. Reichenberger F, Voswinckel R, Steveling E, Enke B, Kreckel A, Olschewski H, et al. Sildenafil treatment for portopulmonary hypertension. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 2006;28:563-7.
62. Clemmesen JO, Giraldi A, Ott P, Dalhoff K, Hansen BA, Larsen FS. Sildenafil does not influence hepatic venous pressure gradient in patients with cirrhosis. World J Gastroenterol. 2008;14:6208-12.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Ratlarda Sepsisle Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Sildenafil Uygulamasının Koruyucu Rolünün Belirlenmesi

Uz.Dr.Serkan CERRAH

Yandal Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi : 15.05.2009

Yandal Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi : 19.05.2012

Yandal Uzmanlık Sınavı Tarihi : 04.06.2012

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Nihat OKÇU

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mehmet GÜNDOĞDU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nesrin GÜRSAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdulmecit KANTARCI

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ömer YILMAZ

Prof. Dr. Mehmet GÜNDOĞDU
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

HAZİRAN 2012
ERZURUM