

49353

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Necla ÇEVİK

**SİSTEMİK ENFLAMATUVAR YANIT
SENDROMLU YENİDOĞAN BEBEKLERDE
İDRAR NİTRİT DÜZEYLERİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Nevin UZUNER

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Hasan ÖZKAN

İZMİR - 1996

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince tecrübe ve bilgilerini aktararak yetişmemde büyük emeği olan, hiçbir konuda yardım ve desteğini esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Necla ÇEVİK ve tüm öğretim üyelerine, tez konumun seçimi ve çalışmalarımın yürütülmesinde değerli katkı ve yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Doç. Dr. Hasan ÖZKAN'a, laboratuvar aşamasında katkı ve özverili yardımlarından dolayı Doç. Dr. Sedef YENİCE ve Dr. Hüray İŐLEKEL'e, idrar örneklerinin toplanmasında yardımcı olan, Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi hemőirelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Nevin UZUNER

KISALTMALAR

ATP	:	Adenozin trifosfat
DIC	:	Dissemine intravasküler koagülasyon
ED	:	Endotelyal disfonksiyon
EDRF	:	Endotel kaynaklı gevşetici faktör (Endothelium derived relaxing factor)
GABA	:	Gamma-amino butirikasit
GNB	:	Gram negatif bakteri
HPV	:	Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon
IL - 1	:	İnterlökin - 1
IL - 8	:	İnterlökin - 8
MODS	:	Multipl organ yetmezliği sendromu
PMNL	:	Polimorfonükleer lökosit
PAF	:	Trombosit aktive edici faktör (Platelet activating factor)
SIRS	:	Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (Systemic inflammatory response syndrome)
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
NO	:	Nitrik oksid
NOS	:	Nitrik oksid sentaz
cNOS	:	Yapısal nitrik oksid sentaz
INOS	:	İndüklenebilir nitrik oksid sentaz
nNOS	:	Nöronal nitrik oksid sentaz
NSAI	:	Non steroid anti - enflamatuvar
NO₂⁻	:	Nitrit
NO₃⁻	:	Nitrat
LPS	:	Lipopolisakkarid
LTD	:	Uzun süreli depresyon (Long term depression)
LTP	:	Uzun süreli potansiyalizasyon (Long term potentiation)
L-NAME	:	N ^G -nitro-L-arginin metilester
L-NMMA	:	N ^G -monometil-L-arginin
NANC	:	Adrenerjik ve kolinerjik olmayan (Non-adrenergic, non cholinergic)
VIP	:	Vazoaktif intestinal peptid.

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	2
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	34
4.	BULGULAR	40
5.	TARTIŞMA	42
6.	SONUÇLAR	46
7.	ÖZET	47
8.	KAYNAKLAR	49

GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromunun enfeksiyöz, immünolojik, endokrinolojik, travmatik veya kemoterapötik birçok nedene bağlı olarak, yaygın endotel hasarı sonucunda ortaya çıktığına inanılmaktadır (1).

1980 yılında Furchgott ve Zawadzki, asetilkolinin damar gevşetici etkisini gösterebilmesi için, endotel hücrelerinden salınan bir otokoidin var olması gerektiğini bildirmişlerdir (2). Endotel hücre kaynaklı gevşetici faktör adı verilen bu maddenin daha sonraki çalışmalar nitrik oksid molekülü olduğunu göstermiştir (2).

Nitrik oksid molekülünün kan basıncı regülasyonu, antimikrobiaI savunma ve hücre içi sinyal iletim sistemi gibi binlerce fizyolojik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (3).

Son yıllarda potent bir endojen vazodilatatör olan nitrik oksidin SIRS'daki hemodinamik bozukluklarda önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Endotoksinler veya sitokinler ile endotel hücreleri, makrofajlar, kupffer hücreleri ve hepatositlerde bulunan indüklenebilir nitrik oksid sentaz aktif hale gelmekte ve nitrik oksid sentezlenmektedir. Artmış nitrik oksid yapımı da patolojik vazodilatasyona ve hücre hasarına yol açmaktadır (4).

Bu çalışmada, septik süreçte bağlı sistemik enflamatuvar yanıt sendromlu yenidoğanlarda idrarda nitrik oksidin stabil son ürünü olan nitrit düzeyleri saptanarak, yenidoğan döneminde sistemik enflamatuvar yanıt sendromu ile nitrik oksid ilişkisini saptamak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

SİSTEMİK ENFLAMATUVAR YANIT SENDROMU

Son yıllarda gram negatif sepsis ve septik şok patogeneziyle ilgili çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. Patogenezinin tam anlaşılmasını engelleyen sürekli enflamasyonun neden olduğu yaygın endotel hasarı sonucunda ortaya çıktığına inanılmaktadır (1). Gram-pozitif bakteriler, virüsler, funguslar ve başka enfeksiyöz etkenlerle oluşan sepsisin de benzer bir enflamatuvar süreç sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu tip bir endotel hasarı, enfeksiyöz olmayan bazı uyarılarla da ortaya çıkabilir (Tablo 1) (5). "Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu" (SIRS) terimi, bu endotel enflamasyonunu tanımlamaktadır (6).

SIRS'nun klinik tanısı için erişkinlerde çeşitli ölçütler önerilmiştir. Özet olarak, endotel enflamasyonuna yol açtığı bilinen bir bozukluğun varlığında ve böyle bir anormalliğe yol açabilecek başka nedenlerin bulunmadığı koşullarda, sistemik enflamasyona ilişkin iki yada daha fazla belirtinin (Tablo1) bulunduğu hastalarda SIRS tanısı konulabilir. Enfeksiyon bulunduğu bilinen hastalarda bu klinik belirtiler, sepsis için de tanı koydurucu olmaktadır (6,7).

SIRS tanımları

Endotel enflamasyonuna karşı, sistemik yanıtla ilgili aşağıdaki belirtiler ve klinik semptomların iki yada daha fazlasının varlığı :

Ateş : $>38,5$ °C'nin üzerinde yada <36 °C

Kalp hızı > 90 vuru/dak.

Lökosit sayısı $> 12.0 \times 10^9/L$ yada $< 4.0 \times 10^9/L$ olması yada $\%10'$ dan fazla olgunlaşmamış nötrofil (çomak) varlığı.

Solunum hızı >20 soluk/dak

Taşipne ; yada $PCO_2 <32$ mm/Hg ile belirlenen hiperventilasyon

Bilinen bir endotel enflamasyonu nedeninin varlığı (yada bundan kuvvetle kuşkulanması),

Örneğin:

Enfeksiyon (gram negatif yada gram pozitif bakterilere, virüslere, funguslara, parazitlere, mayalara yada başka organizmalara bağlı)

Pankreatit,

İskemi

Çok sayıda travma ve doku hasarı

Hemorajik şok

İmmunolojik organ hasarı

Eksojen bir mediyatörün uygulanması (tümör nekrozis faktörü, interlökin 1 yada interlökin - 2 gibi)

Bu tür klinik anormalliklere yol açtığı bilinen başka bir nedenin bulunmaması.

Sepsis Tanımlar.

Enfeksiyonla birlikte sepsis belirtileri daha önce SIRS için tanımlananlarla aynıdır; Aşağıda sayılan özelliklerin birden çoğunu içerebilir ancak bunlarla sınırlı değildir:

Ateş : $>38,5$ °C'nin üzerinde yada <36 °C

Kalp hızı > 90 vuru/dak.

Lökosit sayısı $> 12.0 \times 10^9/L$ yada $< 4.0 \times 10^9/L$ olması yada %10'dan fazla olgunlaşmamış nötrofil (çomak) varlığı.

Solunum hızı >20 soluk/dak

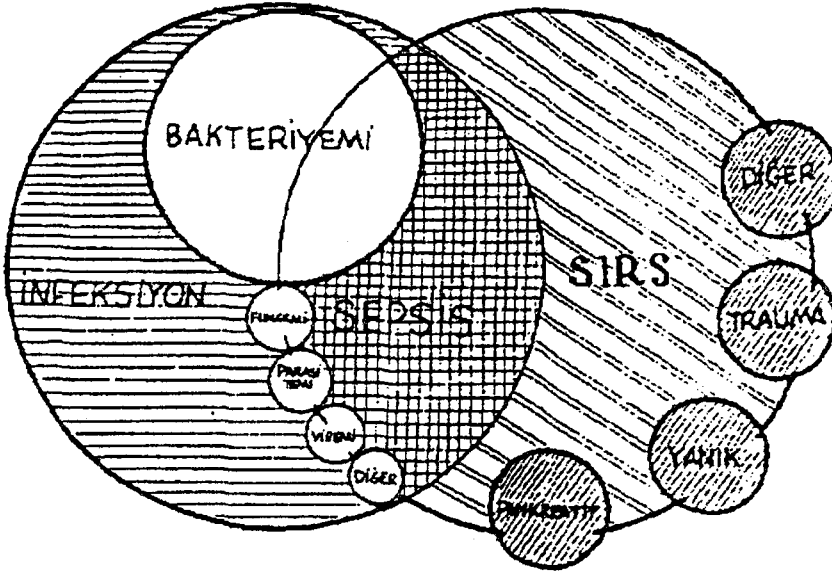
Taşıpne ; yada $PCO_2 < 32$ mm/Hg ile belirlenen hiperventilasyon

Bu fizyolojik değişiklikler akut bir şekilde ortaya çıkmalı ve böyle anormalliklere yol açabilecek başka nedenler bulunmamalıdır.

Ağır SIRS ve ağır sepsis: Organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon anormalliği yada enflamasyona bağlı hipotansiyon bulunan SIRS yada sepsis olarak tanımlanmıştır. Hipoperfüzyonla ilişkili anormallikler arasında laktik asidoz, oligüri yada mental durumdaki akut bir değişme sayılabilir.

Tablo 1 : Erişkinlerde sistemik Enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve sepsis tanımları.

Bu tanıma göre, sepsis olan bütün hastalarda SIRS bulunur, ancak SIRS bulunan bütün hastalarda sepsis olması gerekli değildir (6). Şekil 1'de enfeksiyon, sepsis ve SIRS arasındaki ilişkiler gösterilmiştir. Dolayısıyla sepsis SIRS'nun enfeksiyöz etyolojiye dayanan bir alt grubunu temsil etmektedir.

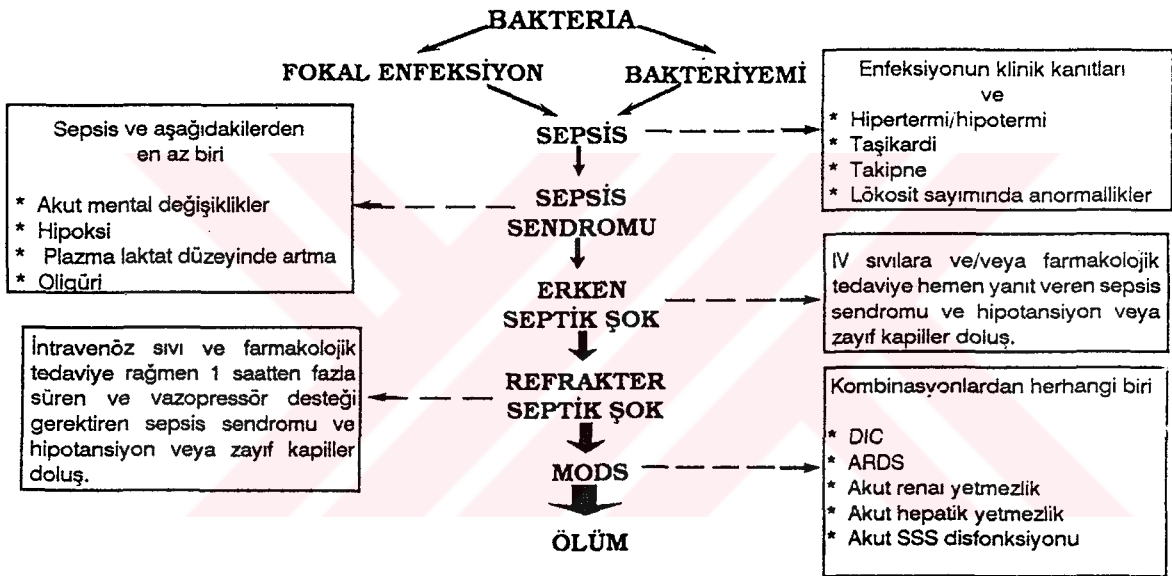


Şekil 1 : Enfeksiyon, sepsis ve SIRS; kendi aralarındaki ilgili diğer durumlarla olan ilişkisi.

SIRS'nun en ağır şekli, gram-negatif bakteriyemi ile birlikte görülen şok sendromudur. Fakat daha az şiddetli (enfeksiyon bulunmadığı) şekillerinde de aynı tedaviden yarar sağlanabilmektedir.

Bir çok nedenden dolayı sepsis sendromu ve septik şok erişkinlerde çocuklardan farklıdır. Bu farklılıklar etyolojik ajanları, ilaç toksisitelerini, invaziv tanısal girişimleri, hemodinamik monitorizasyona olan ihtiyacı ve altta yatan hastalıkları kapsamaktadır (8).

SIRS, sepsis, septik şok, erken septik şok ve multipl organ disfonksiyonu olan refrakter septik şok gibi, enfeksiyonun çeşitli aşamalarında oluşabilir (Şekil 2).



Şekil 2 : Çocuklardaki (sistemik enflamatuvar yanıt sendromu) septik sürecin tanımlanan terminolojisi.

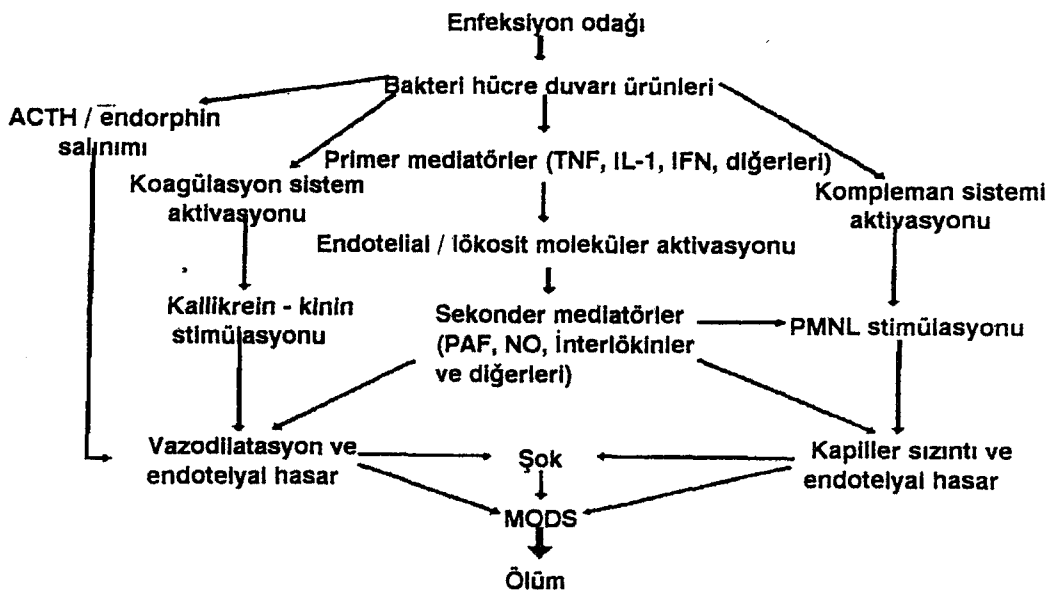
Kısaca sepsis, olası bir enfeksiyona sistemik bir cevap olarak tanımlanabilir. Bakteriyemi veya enfeksiyon odağının saptanması şart değildir. Septisemi, organizmaların veya onların toksik ürünlerinin kanda gösterilmesidir. Sepsis; hipoksemi, plazma laktat seviyesinin yükselmesi, oligüri ve mental durumda akut değişiklikler gibi bozulmuş organ perfüzyonu ile birlikte olduğunda, sepsis sendromundan bahsedilir (8,9).

Septik şok, kan basıncının yaşa göre 5 persantilin altında olması veya periferik hipoperfüzyon saptanmasıyla tanınır. Eğer şok parenteral sıvı ve ilaç tedavisiyle tamamen düzeliyorsa, erken septik şok (hiperdinamik veya septik şokun sıcak fazı) denilir. Son bir saat içinde yoğun tedavi verilmesine rağmen düzelmeyen ve vazopressör destek gerektiren şok refrakter septik şok (hipodinamik veya septik şokun soğuk fazı) adını alır. Sonuç olarak, yetersiz organ perfüzyonu; DIC, ARDS, akut renal yetmezlik, hepatik yetmezlik veya nörolojik disfonksiyonlardan biriyle birlikte olursa multipl organ yetmezliği adını alır.

Çoğu zaman sepsis, ateş ve taşikardi gibi kolay tanınabilen bulgulardan, şok ve ölüme kadar giden tipik bir seyir izler. Fakat bazen progresyon tifoid ateşte olduğu gibi gizli veya meningokoksemide olduğu gibi fulminan olabilir.

PATOGENEZ

Sistemik enflamatuvar yanıt, konağın kan ve dokularındaki yabancı maddeleri tanıyabilme yeteneğine bağlıdır. Bu reaksiyon, mikroorganizma ve ürünlerini nötralize etmek ve mikrobiyal klirensi kolaylaştırmak için yapılmış olmasına rağmen, konak bu amacına ulaştığında bazı dokularda hasar ortaya çıkabilir. Şekil 3'de septik süreçlerle ilgili patofizyolojik olaylar anlatılmaktadır.



Şekil 3 : Sepsis sürecinin patofizyolojisi.

Yıllarca, bakterilerin veya onların hücre duvarı komponentlerinin (gram negatif mikroorganizmaların endotoksini, gram pozitif mikroorganizmaların lipoteikoik asit peptidoglikan kompleksleri) dokular üzerinde direkt toksik etkilerden sorumlu olduğuna inanılırdı. Son verilere göre bakteriyel, viral ve fungal ürünlerin kendi başlarına belirgin bir toksisite oluşturmadıkları, fakat konakta oldukça toksik endojen mediatör üretimine yol açtıkları bilinmektedir (8,9). Örneğin; lipopolisakkaridler, lökositleri, makrofajları, endotel hücrelerini ve muhtemelen diğer hücreleri aktive eder. Aktive lökositler sitokin olarak bilinen peptidler salgırlar. Bu sitokinlerden TNF ve interlökin 1, septik şokta görülen fizyolojik değişikliklerden sorumludurlar. TNF ve IL-1 makrofajlar, nötrofiller, santral sinir sistemi hücreleri ve endotelial hücreler tarafından sentezlenen nitrik oksid üretimini uyarırlar. Nitrik oksid bir sinyal ileticisidir, sitotoksik aktivitesi vardır ve septik şokta görülen hipotansiyondan sorumlu güçlü bir endojen vazodilatatördür (8,9,10,11,12).

Mikrobal ürünler ile proenflamatuvar mediatörlerin etkileşimi sonucu bakteriyel yayılımı kontrol etmek ve fizyolojik bozukluğu düzenlemek amacıyla, pek çok biyokimyasal ve immunolojik mekanizmalar aktive olmaktadır. Kompleman ve koagülasyon sisteminin aktivasyonu, kallikrein-kinin sisteminin stimülasyonu, β endorfinlerin üretimi ve polimorfonükleer hücrelerin fonksiyonlarının ve kinetiklerinin değişimi görülmektedir. Eğer bu fizyolojik cevaplar konağın toleransını aşarsa hastalık ilerler ve multipl organ disfonksiyonu sendromu ve ölüme yol açar.

Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi, patojenik mikroorganizmaların fagositozunda ve lizisinde önemli olmakla beraber aşırı stimülasyonu ile istenmeyen etkilere yol açabilir (9). Kompleman sisteminin stimülasyonu ile PMNL aktivasyonu erişkin respiratuvar distres sendromuna yol açan pulmoner lökositozu neden olur. Ayrıca aktive olan komplemanların her biri, güçlü bir vazodilatatör etkiye sahip olan PAF, prostoglandinler ve nitrik oksidin serbestleşmesini sağlar (13,14).

Koagülasyon Sistemi

Koagülasyon bozuklukları ile bakteriyel sepsis arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Endotoksin ile koagülasyon faktörü XII'nin (Hegaman faktör) direkt etkileşmesi ile intrinsik koagülasyon yolu aktive olmaktadır. Faktör XII aktive olduğunda, fibrinojeni fibrine dönüştüren pıhtılaşma mekanizmasını harekete geçirmektedir. İlave olarak endotoksinler, direkt olarak yada sitokinlerin katılımı ile monositlerden ve endotel hücrelerinden doku faktörlerinin salınımını sağlayarak, ekstremsk koagülasyon yolunu ve faktör VII'yi de aktive edebilmekte ve böylece her iki koagülasyon sistemindeki değişiklik DIC gelişimine yol açabilmektedir (6). Hegaman faktörü, prekallikreinin kallikreine ve kininojenin kinine dönüşümünü stimüle eder. Bradikinin vasküler sistemde, geçirgenliği artırıp rezistansı azaltarak hipotansiyona yol açan potent bir vazodilatatördür (9).

β - Endorfin Üretimi

β endorfin strese cevap olarak pituiter bezden salınan endojen bir opiattır (15). Deneysel hayvan modellerinde, β endorfin enjeksiyonu kardiyovasküler depresyon, vazodilatasyon, kapiller kaçak ve hipotansiyona yol açmaktadır. Opiatların sepsisteki kesin rolü bilinmese de, bu peptidler nörotransmitter olarak periferik cevabı düzenlemede yada endojen analjezik olarak ağrıyı ve acıyı kontrol etmede rol oynamaktadırlar.

Polimorfonükleer Lökositlerin Aktivasyonu

Bakteriyel sepsisli hastalarda sıklıkla polimorfonükleer lökositoz görülmektedir. PMNL'nin kemik iliğinden salınımı endotoksin, sitokin yada komplemanlarca sağlanmaktadır (16). Granülosit koloni stimüle edici faktörlerde bu olayda rol oynamaktadır (17). Sepsisli bazı hastalarda, başlangıçta geçici bir nötropeni gelişmekte, bunu birkaç saat içinde periferik kanda PMNL'lerde artış izlemektedir. Bu geçici nötropeni yetersiz kemik iliği fonksiyonu, artmış yıkım yada dolaşımdaki PMNL'lerin tüketimi şeklinde açıklansa da, daha akla yatkın bir açıklama, bakteriyel ürünlerin ve sitokinlerin, lökosit endotel adhezyon

reseptörlerini aktive ederek PMNL'lerin endotel hücrelerine marjinasyon ve bağlanmasını sağlamasıdır (18).

Bunlara ilave olarak , kemotaksis, fagositoz ve postfagositik intrasellüler olaylarda sindirilen mikroorganizmaların ölümüne yol açan diğer PMNL aktiviteleridir. Sitokinler (TNF, IL-1, IL-8, PAF), endotelden salınan faktörler, araşidonik asit metabolitleri (lökotrienler, prostoglandinler) ve kompleman komponentleri (C_{5a}) bu aktiviteleri stimüle eden mediatörlerden bazılarıdır (19).

SİSTEMİK ENFLAMATUVAR YANIT SENDROMUNDA YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

SIRS'nun patogenezindeki moleküler olaylar hakkındaki bilgilerimizin giderek artması nedeniyle, yeni moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanması gelecekte bu hastalık için bir çok yeni tedavi metodlarının kullanıma girmesini sağlayacaktır.

Anti-Endotoksin Antikorları

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda gram-negatif bakterilerin yüzeyindeki lipopolisakkarid (LPS) molekülüne karşı immünizasyonun, endotoksin ve gram negatif bakterilerin etkilerinden koruduğu görülmüştür. Fakat tam bir LPS molekülüne karşı oluşan antikorlar esas olarak türe spesifik oligosakkarid yan zincirlerine karşıdır ve immünize edilen bakteri suşuna karşı koruyuculuk sağlar. Binlerce farklı gram negatif bakteri enfeksiyon nedeni olabildiğinden, geniş spektrumlu bir anti-yan zincir antikor karışımı elde etmek mümkün değildir. Oligosakkarid yan zincirlerinin tersine, LPS molekülünün santral koru (toksisiteden sorumlu kor glikolipid) tipler arasında daha az farklılık gösterir. Bu nedenle bu bölgeye karşı oluşan antikorlar gram negatif bakterilerin geniş bir spektrumuna karşı etkili olacaktır (20).

Hayvan deneylerinde E.coli 0111'nin bir Re mutanlığı olan E.coli J₅ ile pasif immünizasyonun ölümü önlediği gösterilmiştir (20).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda, bakteriyemik vakalarda J₅ antiserum alanlarda mortalite %22 almayanlarda %39 olarak bulunmuştur. Diğer bir monoklonal antiendotoksin antikorlu olan E₅ ile yapılan çalışmalarda da gram

negatif sepsiste mortalite E₅ alanlarda %8, almayanlarda %22 olarak bulunmuş (21). Ancak ticari olarak J₅ ve E₅ gibi antiserumları hazırlamak güçtür. "Booster" cevabı yoktur ve hazırlanması sırasında verilen insanlarda transfüzyona bağlı riskler oluşturur. Bu nedenle monoklonal antikor yöntemi ile yeni antiserumlar hazırlanmıştır. Bunların en iyi bilineni HA-1A'dır. Bu antikor kor bölgesinin sadece lipid A bölümüne karşıdır. Yapılan çalışmalarda HA-1A'nın en az J₅ kadar etkili olduğu gösterilmiştir.

Anti Enflamatuvar İlaçlar

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromunun patofizyolojisinde enflamasyonun rolü anlaşıldıktan sonra, non-steroid antiinflamatuvar (NSAI) ilaçlar ve kortikosteroidlerin tedavide kullanımları ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. NSAI ajanların siklooksijenazı inhibe eden bir grubunun (aspirin, indometazin, ibuprofen) hayvan deneylerinde, endotoksemideki tromboksan sentezi ve lizozomal proteaz aktivitesini ve sekelleri azalttığı ve yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir. NSAI ilaçların etkileri steroid veya naloxone ile birlikte verildiklerinde artmaktadır. Siklooksijenaz inhibitörleri ancak sepsisin başladığı sırada yani erken dönemlerde verilirse etkili olurlar. İnsanlardaki etkinlikleri konusunda çalışmalar devam etmektedir (22).

Kortikosteroidlerin septik şoktaki etkisi adrenal yetmezliğin düzeltilmesi kardiyovasküler sistemdeki depresyonun ortadan kaldırılması, oksihemoglobin dissosiasyon eğrisinde sağa kayma, lizozomal membran stabilizasyonu, komplemana bağlı lökosit agregasyonunun önlenmesi, IL-1, TNF, PAF gibi sitokinlerin yapımını baskılamaları şeklinde olabilir (23,24). Kortikosteroidlerin yararlı etkilerinin yanında süperenfeksiyon, elektrolit imbalansı, hiperglisemi, gastrointestinal kanama, hipertansiyon, psikoz ve aritmi gibi yan etkilerinin de bulunduğu unutulmamalıdır. Kortikosteroidlerin SIRS'da kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen yararı konusunda kesin bir yargıya varılamamıştır (24). Kortikosteroidler sadece adrenal yetmezliği olan septik hastalarda kullanılırlar (9,25).

Opioid Antagonistleri

Endojen opioidlerin septik şok patogenezindeki rolünün anlaşılması, endotokseminin birçok bulgusunun opioid zehirlenmesine benzediğinin anlaşılmasından sonra olmuş ve bu zehirlenmede spesifik olarak kullanılan naloxone bu vakalarda da denenmeye başlanmıştır. Naloxone katekolamin cevabını artırarak sempatik fonksiyonu, hemodinamik durumu düzeltir ve yaşam süresini uzatmaktadır. Ancak düşük doz (0.01 mg/kg) naloxone ile yapılan çalışmalarda sonuçlar beklenildiği gibi iyi değildir. Yüksek doz (> 1.0 mg/kg) ile yapılan çalışmalar daha iyidir (26).

İnterlökin - 1 ve Tümör Nekrozis Faktör İnhibitörleri

Enflamatuvar hastalıkların ortaya çıkmasında akut enflamasyon mediatörleri (tip A sitokinler), kronik enflamasyon mediatörleri (tip B sitokinler) son derece önemlidir. Son yıllarda bazı biyolojik sıvılarda bu mediatörleri inhibe eden bazı maddeler bulunmuştur (tip C sitokinler). Bunlardan interlökin-1 inhibitörleri ve interlökin reseptör antagonistleri ile yapılan çalışmalarda hayvanlarda endotoksik şok mortalitesinin azaldığı görülmüştür (27,28).

Diğer bir antikor (anti - TNF) da hayvan deneylerinde değerlendirilmiştir. Maymunlara anti-TNF nötralizan antikorlar verilir, 1 saat sonra bakteri infüze edince şok önlenmekte, fakat kritik organlardaki yetmezlik durumu önlenememektedir. Antikor bakteri infüzyonundan 2 saat önce verildiğinde organ yetmezliği önlenebilmektedir. İnterlökin - 1 ve TNF antikorlarının insanlardaki kullanımı için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Antioksidan Tedavi

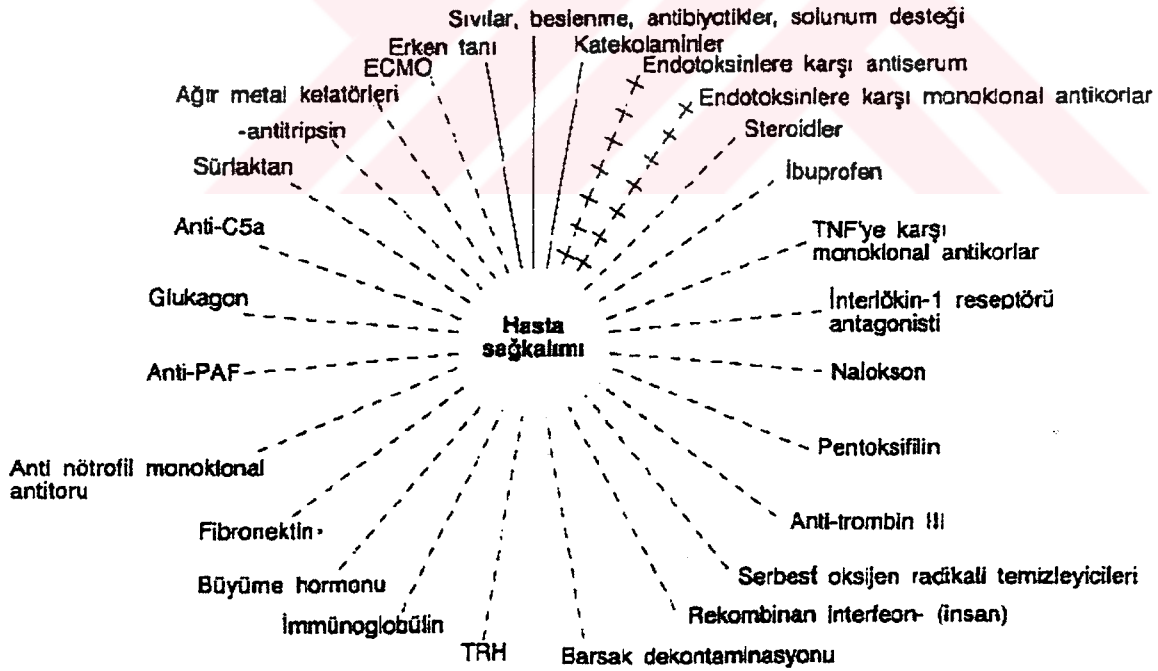
Nonpulmoner doku zedelenmesinin gelişmesinde toksik oksijen radikalleri önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle süperoksit dismutaz ile tedavinin etkili olabileceği şeklinde düşünceler vardır. Ancak bu düşünceler henüz spekülasyondan öteye gidememektedir (29).

Nitrik Oksid Sentaz İnhibisyonu

Bu tedavi şekli halen deneme aşamasındadır. Literatüre bakıldığında nitrik oksid sentaz inhibisyonunun septik şok sırasında terapötik değeri gösterilememiştir yada gösterilmiştir şeklinde pek çok yayın vardır (8,9,30,31). Yüksek dozda nitrik oksid sentaz inhibitörlerinin kullanılması myokardial ve doku iskemisine, trombosit agregasyonuna, deri ve gastrointestinal traktusta defans bariyerlerinin yıkılmasına, antimikrobial defansların yetmezliğine neden olabilir (30,31). Fakat daha küçük dozlarda kullanıldığında katekolaminlere yanıtı zıtlığı düzeltebilir (31).

Şu andaki mevcut inhibitörler aşırı toksik ve nonspesifiktir. Bu nedenle dokuya spesifik yada izoforma spesifik yeni nitrik oksid inhibitörleri geliştirilebilir. Bu nedenle bu tedavi klinikte yaygın olarak kullanılmadan önce daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Yeni ve henüz deneysel aşamada olan ancak, gelecekte yararlılıkları kanıtlanabilecek bazı tedavi yaklaşımları şekil 4’de gösterilmektedir.



Şekil 4 : Sepsis tedavisinde kullanılan veya etkili olduğu öne sürülen tedavi şekilleri.

Sistemik enflamatuvar yanıtın anlaşılmasında yol almış olmamıza rağmen henüz öğrenilecek çok şey olduğu açıktır. Bazı mediatörlerin şimdiye kadar karanlıkta kalmış olan çok sayıda etkileri tanımlanmış olmakla birlikte, henüz ortaya konulmamış başka etkileri de bulunabilir. Bu mediatörlerin salgılanmasına yol açan ve etkilerinde değişikliklere neden olan etkileşimler de tam olarak aydınlatılmış değildir. Bu mediatörlerin serum ve dokulardaki mutlak düzeyleri SIRS'nun prognozunu belirlemede kritik bir öneme sahip olabilir. Klinik araştırmaların şimdiye kadar çok etkili bir tedavi ortaya koyamaması, bu hastalığın kontrol altına alınabilmesi için çok yönlü bir yaklaşımın gerekli olmasından kaynaklanabilir.

SIRS'nun tedavisinde destekleyici tedavi ve antibiyotiklerin kullanılması, SIRS'nun ideal tedavisi bulunana kadar önemli olmaya devam edecektir. Bu ideal tedavinin, halen devam etmekte olan temel ve klinik araştırmaların sonucu olarak yakın gelecekte ortaya konulması ümit edilmektedir.

L - ARGİNİN - NİTRİK OKSİD YOLU

On yıl önce, sigara dumanında ve siste bulunan bir çevresel kirlenici olan nitrik oksidin karsinojen olduğu, ozona zarar verdiği ve asit yağmuru oluşturduğundan şüphe edilmiştir. Son 5-10 yılda immünoloji, toksikoloji ve vasküler fizyoloji gibi alanlarda yapılan araştırmalar, bu oldukça toksik molekülün kan basıncı regülasyonundan antimikrobiyal savunmaya, hücre içi sinyal iletimine kadar değişen binlerce fizyolojik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (32).

Science dergisinde 1992 yılında "yılın molekülü" şeklinde tanımlanan nitrik oksid (NO), son dönemlerde en ilgi toplayan araştırma alanlarından biri olarak dikkat çekmektedir (33).

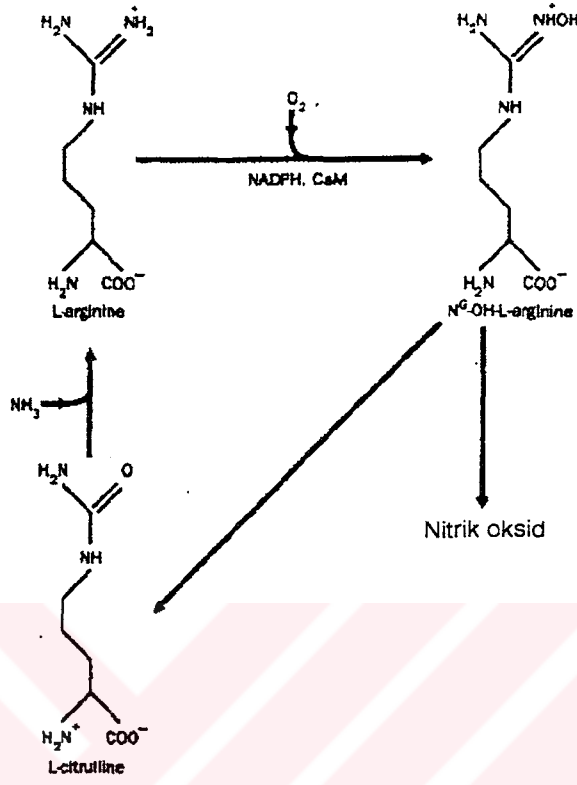
Furchgott ve Zawadzki (2) tarafından 1980 yılında yayınlanan bir çalışma, bu konuda daha sonra yoğunlaşan araştırmaların başlangıcını oluşturmuştur. Söz konusu çalışmada izole edilmiş tavşan aort şeritlerinde noradrenalin, fenilefrin veya başka bir kasıcı agonistlerle kasılma sağlandıktan sonra ortama asetilkolin ilavesiyle bir gevşeme olduğu gösterilmiştir. Bu gevşeme aort

şeridinde endotel mevcutsa, olmakta ama endotel alındıktan sonra gevşemenin kaybolduğu veya kasılmaya dönüştüğü görülmüştür. Furchgott asetilkolinin bu gevşetici etkisinin endotel kaynaklı bir madde aracılığı ile olduğunu göstermiş ve bu maddeye Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) adını vermiştir. Önceleri EDRF'nin araşidonik asid, lipooksijenaz veya sitokrom P 450 enzim sistemi ürünü olduğu düşünülmüş, ancak 1986 yılındaki bir konferansta farmakolojisinin benzerliğine dikkat çekilerek gerçekte nitrik oksid yada ona yakın bir madde olabileceği belirtilmiştir (34).

Daha sonra Moncado ve arkadaşları özel bir kimyasal tayin yöntemi olan kemilüminesansı kullanarak EDRF ve NO'in aynı bileşik olduğunu ileri sürmüşlerdir (35). EDRF'nin tavşan aort şeritlerinde oluşturduğu gevşeme NO tarafından oluşturulan gevşeme ile aynı bulunmuş ve her iki maddeninde aynı derecede dayanıksız olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hem EDRF hemde NO etkileri birbirine benzer şekilde hemoglobin ile azalmış ve süperoksid dismutaz (SOD) ile güçlenmiştir. Biyolojik etkilerinin daha ayrıntılı araştırıldığı ve karşılaştırıldığı çok çeşitli çalışmalarda da, EDRF ve NO'in aynı bileşik olduğunu destekleyen bilgiler elde edilmekle birlikte, öne sürülen bir olasılıkta EDRF'nin çok kısa sürede NO'e dönüşebilen dayanıksız bir ön madde (precursor) olabileceğidir. Henüz bu tartışmalar kesin biçimde sonlanmamakla birlikte genel olarak kabul edilen görüş EDRF ve NO'in aynı bileşik olduklarıdır.

NO molekül ağırlığı 30 olan, suda çok az çözünebilir, lipofilik reaktif bir gazdır. Lipofilik ve küçük olduğundan biyolojik membranlardan çok kolay diffüze olabilir. Son derece dayanıksız (labil) bir bileşiktir. Serbest radikal nitrik oksid, 6 ile 30 sn'lik kısa bir yarı ömre sahiptir. Bu durum, ilk araştırmacıların bunun bulunmasındaki karşılaştıkları zorlukları kısmen açıklar.

NO biyosentezinde ilk aşama, agonistin reseptöre bağlanması ile hücre içinde Ca^{++} miktarının artmasıdır. Fizyolojik sınırlardaki bu artış, nitrik oksid sentaz (NOS) enziminin uyanmasına ve sonuçta L-argininin guanido grubundaki N'un oksijen ile reaksiyonu sonucu bu serbest radikal (NO) gaz oluşmaktadır. L-sitruilin NO oluşumundan önceki ara metabolittir (Şekil 5).



Şekil 5 : L-Argininden NO biyosentezi ve L-citruline dönüşümü

Değişik çalışmalarda gösterildiği gibi asetilkolin, bradikinin, trombin, P maddesi, kalsiyum iyonoforu olan A₂₃₁₈₇ gibi vazodilatör maddelerin endotel hücrelerinde reseptörlerine bağlanmaları veya makrofajların endotoksin veya sitotoksin gibi, immünolojik uyarılarına maruz kalmaları sonucunda NO sentezlenir (36).

Ayrıca NO bazal koşullarda da sentezlenmekte ve saliverilmektedir. Damarlarda NO'in sürekli olarak saliverildiği ve bu şekilde dilatör bir tonus sağlandığı kabul edilmektedir. NO'in bu sürekli oluşumunu sağlayan fizyolojik uyarının ne olduğu, henüz tam anlamıyla bilinmemekle birlikte pulsatil akım ve yırtılma basıncı (shear stress)'nin etkili olduğu düşünülmektedir (37).

Endotelial NO oluşumu aşağıdaki şekilde kısaca özetlenebilir;

1- Sürekli salınan NO

a) Bazal

b) Uyarıyla

- Reseptöre bağımlı olan : Asetilkolin, bradikinin, ATP vb.

- Reseptöre bağımlı olmayan :

Fiziksel uyarı ; Pulsatil akım, hipoksi, mekanik deformasyon, yırtılma basıncı

Agonistler ; Ca^{++} - ATPase inhibitörleri, Ca^{++} - iyonoforlar

2- İndüksiyon sonucu salınan nitrik oksit endotel hücrelerinde L-argininden sentezlendiği ilk kez 1988'de belirlenmiştir (38).

NO sentezinde kullanılan L-arginin;

1- NO sentezi ile oluşan sitrulinin geri dönüşümü

2- L-argininin hücre içine geri alınması

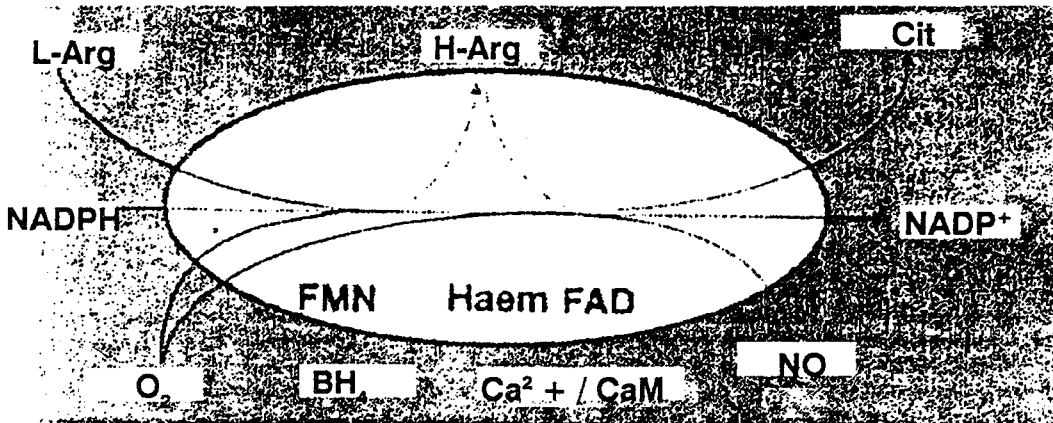
3- L-arginin, L-sitrulin içeren peptidler

4- Metil argininin metabolize olması ile sağlanır.



Şekil 6'da görülen reaksiyonu katalizleyen nitrik oksid sentaz (NOS);

NADPH, tetrahydrobiopiterin ve flavinleri kofaktör olarak kullanmaktadır (39).



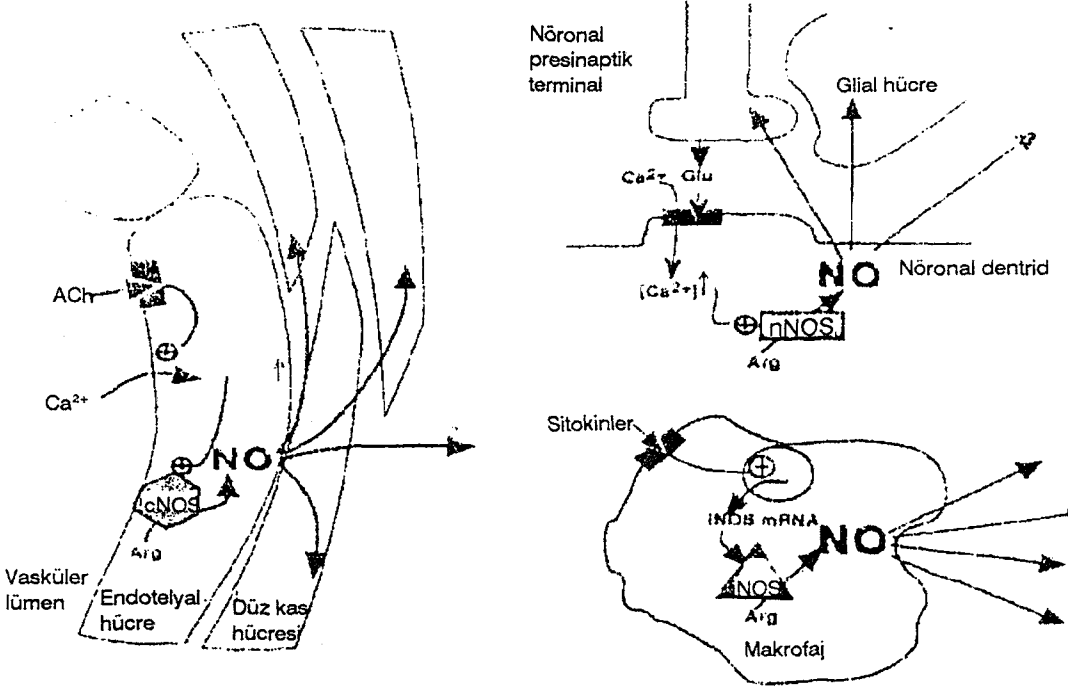
Şekil 6 : NO sentaz reaksiyonları

Bazı kaynaklarda NO oluşumunun 2 basamaklı bir reaksiyonla gerçekleştiği ve N-hidroksiargininin bu reaksiyonda ara ürün olduğu belirtilmektedir (40). Biyosentezi sağlayan NOS yada diğer adıyla NADPH diaforaz enziminin organizmada 3 değişik tipi tanımlanmıştır (40).

Tip 1 : Nöronal NOS (nNOS)'da denmektedir. Beyinde ve adrenerjik kolinerjik olmayan (nonadrenerjik, nonkolinerjik - NANC-) sinir hücrelerinin sitozollerinde bulunur. Kalsiyum ve kalmoduline bağımlıdır. Glukokortikoidlerden etkilenmez. Molekül ağırlığı 160 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 7).

Tip 2 : İndüklenebilir NOS (iNOS) adıyla anılmaktadır. Makrofajların sitozollerinde protein sentezlenmesiyle oluşur. Retikuloendotelial sistem dışında bazı hücre ve dokularda (endotel hücreleri, düz kas hücreleri gibi) tanımlanmıştır. Sitokin ve endotoksinlerle uyarılarak makrofajlardan salıverilen NO sitotoksik ve sitostatik etki gösterir. Aynı şekilde, sitokin ve endotoksinler tarafından endotel hücre ve damar düz kas hücrelerinden enzimin uyarılması ile salıverilen NO patolojik vazodilatasyona neden olmaktadır. iNOS kalsiyum ve kalmoduline bağımlı değildir. İndüksiyonu glukokortikoidler tarafından inhibe edilir. Molekül ağırlığı 130-135 kDa olarak bildirilmektedir (Tablo 2 ve Şekil 7).

Tip 3 : Endotel hücrelerde bulunan asıl enzim (constitutive endothelial cell NO synthase - cNOS-) diğer bir deyişle hücresel NOS endotel hücreleri ve trombositlerde bulunur. Damarlarda dilatatör tonusu sağlayan ve sürekli olarak salıverilen NO'nun biyosentezinden sorumludur. Kalsiyum ve kalmoduline bağımlıdır. Hücre içinde Ca^{++} iyonlarının 100-500 nM yoğunluğa ulaşması ile aktive olur. Glukokortikoidlerden etkilenmez, yapısal olarak Tip I yada diğer adıyla nNOS'a çok yakın benzerlik gösteren bir izoenzimdir. Molekül ağırlığı daha düşüktür (135-155 kDa) (Tablo 2 ve Şekil 7).



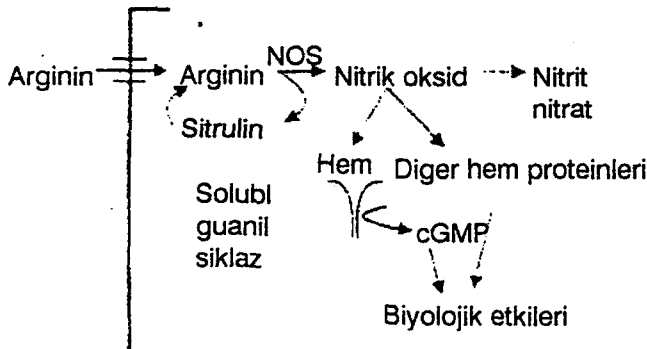
Şekil 7 : Bilinen nitrik oksid sentaz izoenzimleri ile NO sentezi.

Özellikleri	cNOS	iNOS
Hüresel kaynaklar	Endotel hücreleri Bazı beyin hücreleri NANC nöronları	Makrofajlar Kupffer hücresi Vasküler düz kas hücresi
Aktivatörler	Trombin, ADP Asetil kolin Glutamat Kalsiyum iyonoforları	
İndükleyenler	Basınç Yırtılma basıncı (shear stress) Fizik eksersiz	Lipopolisakkarid (LPS) İnterferon- α LPS + interlökin 1 LPS + TNF α Düşük dansiteli proteinler
Salınan miktar	Az, pulsatil	Çok, sürekli
Kalsiyuma bağımlılık	Evet	Hayır
Moleküler hedefler	Hem proteinleri Solubl guanil siklaz Tioller	Fe-S protein Tioller
Fonksiyonları	Regülasyon	Konakçı savunması

Tablo 2 : Yapısal NOS ile indüklenebilir NOS'un karşılaştırılması

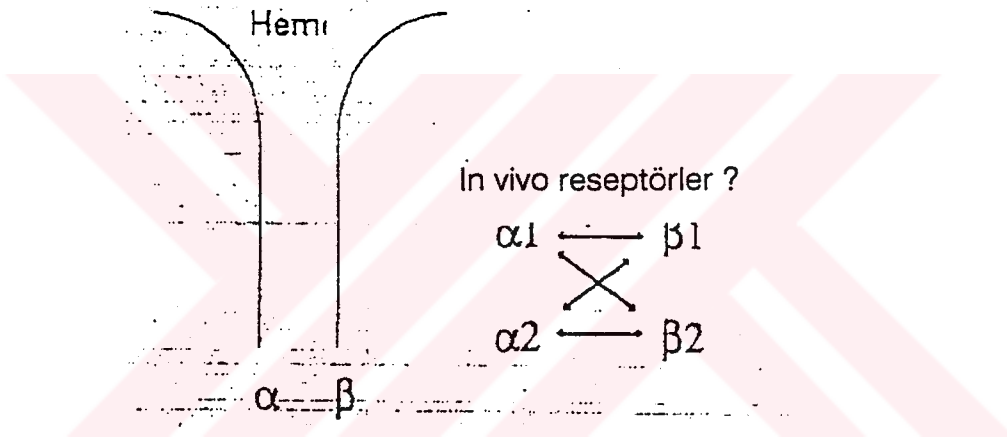
NOS enzimi dioksijenazdır ve L-arginin analogları ile kompetitif biçimde inhibe olur. Söz konusu L-arginin analoglarının (N-monometil- L-Arginin "L-NMMA", N-nitro-L-arginin "L-NA", N-nitro-L-arginin metil ester "L-NAME", N-iminoetil-L-ornitin "L-NIO" gibi) in vivo ve in vitro etkileri kalitatif olarak aynı olmakla birlikte kantitatif olarak farklıdır (41). Örneğin; L-NIO diğerlerinden yaklaşık 5 kat daha güçlüdür. L-NMMA ve L-NAME oral yolla da aktivasyon göstermektedir. Bu maddelerin NO'nun biyolojik rolünü açıklamaya yönelik çalışmalarda kullanılmalarının yanısıra gelecekte pek çok klinik problemin çözümünde anahtar rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. İngiltere'de 1991 yılında yapılmış bir çalışmada, septik şoktaki iki hastaya L-NMMA ve L-NAME' uygulanarak hipotansiyonun giderilmesinde anlamlı biçimde başarı sağlanmıştır (42). Metillenmiş argininler aslında doğal maddelerdir ve organizmada varlıkları saptanmıştır (39). Bu durum, NO sentezinin düzenlenmesinde endojen mekanizmaların varlığını göstermektedir. Plazmada belirlenen L-NMMA'nın yaklaşık 10 katı yoğunlukta dimetilarginin türevlerinin (asimetrik dimetilarginin "ADMA" ve simetrik dimetilarginin "SDMA") bulunduğu ve bunların idrarla değişmeden atıldıkları saptanmıştır. İnsanda 24 saatlik idrar ile 10 mg kadar atıldığı saptanan ADMA'nın kronik böbrek yetersizliğinde organizmada birikerek, hipertansiyon, immunfonksiyon bozukluğu gibi patolojilere neden olduğu ileri sürülmektedir (43).

Endotel hücresinde sentezlenen NO, hücre içine yada komşu hücreye diffüze olur; burada solubl guanil siklazı veya diğer hem içeren proteinlerin hem grubuna bağlanarak enzimi aktive eder ve hücre içinde siklik guanozin monofosfatı (cGMP) artırır (Şekil 8) (44). Böylece kas hücresinde, cGMP artışının neden olduğu protein fosforilasyonu sonucunda gevşeme ortaya çıkar.



Şekil 8 : Nitrik oksid sinyal sisteminin şematik yolu

Yalnızca endotel hücresinde değil, diğer hücrelerde de sentezlenen NO'de, hedef hücrelerde çözünür guanil siklaz için bir haberci mekanizma olarak çalışmakta ve dolayısıyla çeşitli biyolojik olaylarda düzenleyici rol oynamaktadır. **Nitrik oksid reseptörleri** : NO'in ana hedefi solubl guanil siklazdır. Solubl guanil siklaz hem içerir (Şekil 9). NO'in hem grubuna bağlanması, demirin porfirin halkasının düzleminden çıkmasına yol açan bir konformasyonel değişikliğe yol açar. Böylece solubl guanil siklazı aktive eder (45). Diğer hem içeren proteinler (örneğin mitokondrial elektron transport zincirinin sitokromları) nitrik oksidle reaksiyona girebilir ve belkide sitotoksikite ve insülin salınımının inhibisyonu bu şekilde açıklanabilir (46).



Şekil 9 : Nitrik oksid reseptörlerinin yapısal görünümü

Solubl guanil siklazlar, 2 farklı alt üniteden (α ve β) oluşan heterodimerlerdir. İki α ve 2 β subünitleri klonlanmıştır (47). α_1 ve β_1 vücutta yaygındır. Oysa β_2 temelde karaciğer ve böbrekte salınır. α_2 'nin dağılımı bilinmemektedir. Renal kan damarlarında endotelial ve vasküler düz kas hücrelerinin, α_1 , β_1 ve α_2 reseptör subünitleri için haberci RNA taşıdığı, oysa nitrik oksidin sodyum transportunu inhibe ettiği kortikal kollektör duktusta, α_1 ve β_2 için haberci RNA bulunduğu gösterilmiştir (48,49). Bu farklı izoformların fizyolojik önemi bilinmemektedir. β_2 , potansiyel bir izoprenilasyon bölgesine sahiptir. Bu onun membranlarla ilişkili olmasını sağlayabilir. İlk kanıtlar, β_2 'nin dominant olarak negatif rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Nitrik oksidin inaktivasyonu : NO kan damarı lümenindeki hemoglobin, (hem oksijene hem de deoksijene formlarında) kan damarı duvarındaki süperoksid radikali veya serbest solüsyondaki oksijen ile reaksiyona girdiğinde irreversibl olarak inaktive edilebilir. Oksijenle reaksiyon nitrik asit ve nitroz asid meydana getirir ve son ürün olarak kolayca izlenebilen nitrit ve nitrat oluşur (50,51).

Suda, plazmada ve ultrafiltratta NO, nitrite okside olur ve saatlerce stabildir. Kanda ise nitrit hızla nitrate dönüşür. Bu nedenle kanda bazal nitrit konsantrasyonu düşüktür. Nitrat konsantrasyonu 100 kat fazladır (30 µmol/L) (51,52).

Sonuç olarak organizmada sentezlenen NO çeşitli hücre ve dokularda çözünür guanilat siklaz için bir haberci mekanizma olarak çalışmakta, dolayısıyla da çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda biyolojik mediatör rolü oynamaktadır.

NİTRİK OKSİDİN FIZYOLOJİK VE PATOLOJİK OLAYLARDAKİ ROLÜ

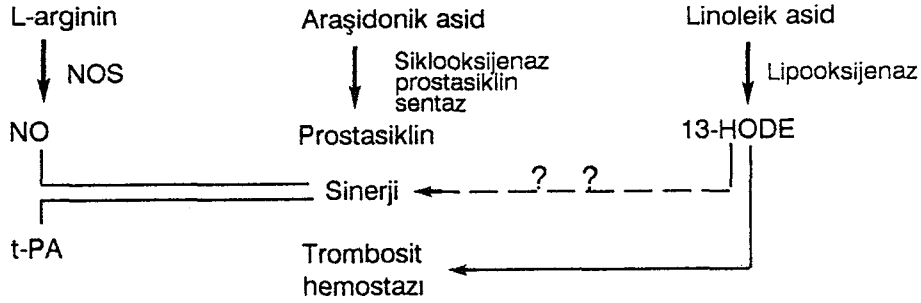
TROMBOSİT REGÜLASYONU

Endotelde saptanmış olan yapısal NOS (cNOS) damar tonusunu sağlamak ve trombosit işlevlerinin modülasyonu amacıyla sürekli olarak NO oluşturur. Ayrıca trombositlerde, cNOS benzeri NO sentaz içerirler. cNOS ve trombositlerdeki NOS tarafından oluşturulan NO, hem in vivo hem de in vitro olarak adhezyon ve agregasyonu inhibe eder, trombosit kümelerinin ayrışmasını sağlar (49,53,54).

Nitrik oksid prostasiklin ve doku plazminojen aktivatörü ile etkileşim gösteren hemostatik bir moleküldür. Sinerjik etkileşimler trombosit işlevlerinin in vivo regülasyonundan sorumlu olabilirler (Şekil 10).

NO'in trombositler üzerindeki düzenleyici etkisi, genellikle agrege olan trombositlerin adenosin difosfat üretmesi ve böylece endotelial NO üretimini stimüle etmesiyle olur. NO trombosit agregasyonunu önlemek için vasküler duvarın kenarında lokal olarak rol oynar. Damarın ortasındaki trombositler üzerinde bu etki yoktur. Çünkü NO hemoglobin tarafından parçalanır. Net sonuç vazodilatasyon ve trombosit agregasyonunun önlenmesidir. Aterosklerozda

azalmış NO salınımlarıyla oluşan endotelial disfonksiyon, bu koruyucu mekanizmayı hasara uğratar, vazokonstrüksiyonu, trombosit agregasyon ve adezyonunu destekler. Bu durum vazokonstrüksiyon, trombüs formasyonu ve iskemiye destekleyebilir. Bu iskemi deneysel olarak gösterilmiştir. Agregasyon olan trombositler arteri dilate eder, fakat aterosklerotik hayvanların arterlerini konstrükte eder (55).



Şekil 10 : Trombosit hemostazını denetleyen endojen mekanizmalar

KARDİYOVASKÜLER SİSTEM

Nitrik oksidin, 1987 yılında endotel hücrelerinde sentezlendiğinin gösterilmesi yeni çalışmalar için başlangıç oluşturmuştur (50,51,52,56). Kardiyovasküler sistemdeki rolü, öncelikle kan akımının ve kan basıncının düzenlenmesinde etkili olması şeklindedir. Damarlarda var olan dilatör tonustan, pulsatil kan akımı ve yırtılma basıncı (shear stress) gibi fizyolojik uyarılar sonucunda devamlı salınan NO sorumlu tutulmaktadır (40).

Asetilkolin, adenin nükleotidleri, trombin, P maddesi, bradikinin, bir kalsiyum iyonoforu olan A_{23187} , hipoksi kan akımının artması gibi uyarılar endotel hücreyi yüzeyindeki reseptörü etkiler. Hücre içi kalsiyum girişinin artması ile NOS enzimi aktifleşir ve L-argininden NO sentezlenir. NO düz kas hücrelerinde çözünür guanilat siklazı uyarır, GTP'den cGMP oluşur ve protein fosforilasyonu sonucu vazodilatasyon meydana gelir. Nitrik oksidin vasküler sistemdeki bir diğer önemli etkisi, trombosit adezyon ve agregasyonunu engellemesidir (53,54,57).

Nitrik oksidin çok çabuk inaktive olması, bir hormon gibi etki oluşturmalarını engeller. NO gaz yapısında olduğundan kolaylıkla damar lümenine geçer ve eritrositlerde yüksek yoğunlukta bulunan hemoglobin ile birleşerek nitratlara dönüşür ve inaktive olur. Arteriyel damarlarda oksihemoglobin ile hızla birleşirken, venöz damarlarda deoksihemoglobin ile birleşir.

Arteriyel ve venöz damar duvarında NO'nin inaktive olmasının bir diğer yolu süperoksid iyonu (O_2^-) ile birleşmesidir. Ayrıca NO, tiol bileşikleriyle reaksiyona girerek nitrazo bileşiklerine dönüşerek de inaktive olur (40).

Hipertansiyon, ateroskleroz, reperfüzyon hasarı ve hiperkolesterolemi gibi patolojik durumlarda, organizmada NO'nin azalmış olduğu saptanmıştır (58). Bunun nedeni sentezin azalması veya yıkımın artmış olmasıdır. NO'nin yetersizliği damarlarda var olan dilatör tonusun azalmasına ve yerini konstrüktör tonusun almasına neden olur.

Söz konusu patolojilerin uygun tedavisi ile damarlardaki azalmış olan NO yanıtının düzeldiği gözlenmiştir. Örneğin; bir çalışmada uzun süre aterojenik diyetle beslenen primatlarda, asetilkolin ile oluşan NO aracılı vazodilatör yanıtın azaldığı, ancak düşük yağ içerikli diyetle beslenme sonucunda bu durumun düzeldiği belirtilmiştir. Aynı durum hipertansif sıçanlarda da gösterilmiş, antihipertansif tedavi ile NO aracılı yanıt artmıştır (59).

Yukarıda belirtilen patolojilerde azalmış NO düzeyinin saptanması, bu durumların tedavisinde kullanılan drogların NO ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Bu grup drogların başında organik nitratlar gelmektedir. Organik nitratlar yaklaşık 100 yıldır tedavide kullanılmalarına karşın düz kas gevşetici etkilerinin mekanizması ancak son dönemlerde anlaşılabilmiştir. Günümüzde bu drogların NO'e metabolize olarak etki gösterdikleri ve NO'nin endojen nitro vazodilatör olduğu kabul edilmektedir (60). Ekzojen, nitro vazodilatörler ortama NO vererek düz kaslarda çözünür guanilat siklazı aktive etmekte ve cGMP düzeyini yükselterek gevşemeyi sağlamaktadırlar.

Nitro vazodilatörlere karşı gelişen duyarlılık artması da çeşitli patolojilerde rastlanan NO yetersizliği ile açıklanabilmektedir. Yetersiz miktardaki NO, etkilediği enzim olan çözünür guanilat siklaz miktarında artışa sebebiyet verir. Bu da nitro vazodilatörlere karşı duyarlılığın artması ile sonuçlanır (58). Nitro vazodilatörlere

karşı gelişen tolerans ise NO etkisine karşı çözünür guanil siklazda gözlenen duyarlılık azalması (desensitizasyon) sonucudur.

Araştırmacılar indüklenebilen NOS enziminin (tip II) patolojik vazodilatasyon ve doku hasarından sorumlu olduğunu ileri sürmektedirler (58). Söz konusu enzim (iNOS) septik şok patogeneğinde de etkili olmaktadır. Endotoksin ve sitokinler ile sentezi indüklenebilen enzim, fazla miktarda NO oluşumuna ve uzun süreli vazodilatasyona neden olmaktadır. Bu patolojik vazodilatasyon, adrenalın gibi konstrüktör maddelere yanıt vermemektedir (58). Yapılan çalışmalara göre sepsiste ortaya çıkan hipotansiyonun tedavisinde veya terapötik amaçla sitokinler kullanıldığında oluşabilecek yan etkilerin önlenmesinde NOS enzim inhibitörlerinin yardımcı olabileceği söylenmektedir (61).

AKCİĞER VE İNHALE NİTRİK OKSİD

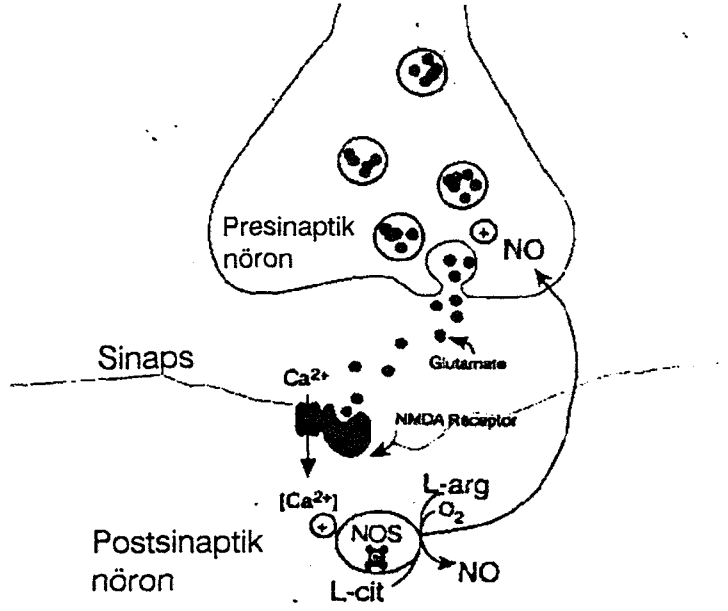
NO akciğerlerde fizyolojik bir mediatör olabilir (51). NOS akciğer epiteli ve diğer pulmoner hücrelerde bulunmaktadır ve nörojenik bronkodilatasyonun bir mediatörü olduğu öne sürülmüştür. Hipoksik pulmoner vazokonstrüksiyonda (HPV) altta yatan mekanizma, azalmış NO salınımı olabilir. HPV'da kan pulmoner dolaşımdan geçişi sırasında oksijenizasyonu maksimuma çıkarmak üzere, en iyi havalandırılan bölgelere yönlendirilir. NOS inhibitörlerinin kullanımı, NO'nin akciğerde önemli bir rol oynadığını doğrulamaktadır. Bu ajanlar spontan solunum sırasında pulmoner vasküler direnci artırır, HPV'yi güçlendirir ve hipoksiye yol açarlar. NO inhalasyonu insanlarda HPV'yi ortadan kaldırır. Dolayısıyla, NO'nin pulmoner dolaşımda bir düzenleyici olduğu yönünde güçlü kanıtlar vardır.

En önemli gelişmelerden biri de inhale nitrik oksidin tedavide kullanılmasıdır (62,63). Düşük konsantrasyonlarda (<80 ppm) inhale edilen NO hızla akciğerlerde kapiller kan tarafından alınarak methemoglobin düzeylerinde ve nitratların atılımında artışa yol açar. Hava yolları, pulmoner arterleri akciğerde prekapiller düzeye kadar izledikleri için, inhale NO'nin bir kısmı rezistans pulmoner arteriollerden diffüzyona uğrar. NO akciğerin iyi havalandırılan segmentlerinde spesifik vazodilatasyona yol açar. Kana diffüzyondan sonra hemoglobine bağlanarak hızla inaktif olur ve herhangi bir jeneralize vasküler etki göstermez. NO'nin pulmoner vazokonstrüksiyon ve pulmoner hipertansiyonda gözlenen selektif

vazodilatasyon etkisinin temeli budur. Pulmoner hipertansiyon şıklıkla neonatal ve adult respiratuvar distres sendromu ve kardiopulmoner bypass cerrahisi sonrasında görölmektedir (62,63,64). Pulmoner hipertansiyon için gündemdeki tedavi ajanları (prostasiklin, Na-nitroprussid vb) pulmoner sirkülasyona selektif değildir ve dolayısıyla sistemik arteriyel basıncı da düşürerek kalp gibi vital organlardaki perfüzyon basıncını azaltırlar. Dolayısıyla düşük konsantrasyonlarda, NO gazının inhalasyonu (50 -80 ppm) selektif pulmoner vazodilatasyona yol açmakta ve arteriyel oksijenizasyonu düzeltmektedir. Sistemik vazodilatasyona yol açmadan, hipoksik pulmoner vazokonstrüksiyonu selektif olarak tersine döndürmektedir. İn hale NO akut pulmoner hipertansiyonun tedavisinde halen deneysel bir tedavidir. Kronik hipertansiyonlu vakalarda NO tedavisinin avantajları tam olarak bilinmemektedir.

SANTRAL SİNİR SİSTEMİ

İlk olarak 1977 yılında Deguchi, sıçan ön beyinde çözüdür guanil siklazı uyaran ve hemoglobin ile inhibe olan düşük moleköl ağırlıklı bir maddenin varlığını tanımlamıştır (65). Aynı yıl maymun serebral korteksinde, NO'in çözüdür guanil siklazı uyaran endojen madde olduğu söylenmiştir (65). Garthwait ise serebellar granül hücre kültüründe, glutamatın N-metil-D aspartat (NMDA) reseptörlerini uyarması ile salınan, vazodilatasyona ve cGMP düzeyinde yükselmeye neden olan, NO'i anımsatan bir faktörün varlığını tanımlamıştır (66). Sıçan sinaptozomal hücre kültürüne NADPH varlığında L-arginin eklenmesi ile, çözüdür guanilat siklazı uyaran NO ve sitrulin oluşmuştur (60). NO santral sinir sisteminde yaygın olarak saptanmıştır. Serebellumda en yüksek, medullada en düşük düzeyde bulunmakla birlikte hipotalamus, orta beyin, striatum, hipokampus ve kortekste varlığı gösterilmiştir. NO beyinde başlıca dört kaynaktan sağlanır (60).



Şekil 11 : Uzun süreli potansiyalizasyonda nöronal nitrik oksidin rolü

- 1) Serebral damar endotel hücreleri
- 2) İmmunolojik olarak uyarılabilen mikroglia ve astrositler.
- 3) Adrenerjik kolinerjik olmayan sinirler (NANC)
- 4) Glutamaterjik nöronlar

NO santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunmakta ve öğrenme, hafıza, serebrovasküler sistemin düzenlenmesi, iştah, susama, koku alma, noradrenalin, dopamin gibi nörotransmitter salınımının düzenlenmesi, ağrı duyumsaması ile serebral iskemi, felç, alkolün neden olduğu beyin hasarı, AIDS-demans nöropatolojisi, Alzheimer ve Huntington hastalıkları gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol almaktadır. Serebellumda uzun süreli depresyonun (Long Term Depression - LTD-) ve hipokampusta uzun süreli potansiyalizasyonun (Long Term Potentiation-LTP-) oluşmasında rol alır (67). Serebellumda, purkinje hücreleri ile bu hücelere paralel liflerle olan bağlantının uyarılması, LTD olarak isimlendirilir ve motor öğrenmenin oluşmasından sorumludur (51). Hipokampusta eksitator yolağın uyarılması ile intrasellüler kalsiyum düzeyi artar. Sinaptik etkinliğin devamlı artması ile LTP oluşur (Şekil 11) (68). NO'in bu döngüde aracı görevi yaptığı düşünülmektedir. Serebrovasküler tonusun düzenlenmesinde endotel kaynaklı kasıcı ve gevşetici maddeler etkilidir. Bu maddelerden biri de NO'dur. Asetilkolinin indüksiyonu, hipoksi sonrası ve normal koşullarda salınan

NO, serebrovasküler kan akımı ve serebrovasküler direncin düzenlenmesinde etkili olur. Bazal ön beyinde bulunan kolinerjik nöronlar, kortikal kan akımının düzenlenmesinde dominant etkili nöronlardır. Bu nöronların eksitotoksik harabiyeti durumunda komşu hücrelerden salınan NO serebral kan akımının düzenlenmesinde etkili olur (50,51). NO'in iştah düzenlenmesi ve susamada etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, aç bırakılmış maymunlarda NOS inhibitörü N^G- nitro-L-Arginin verilmesi ile doza bağımlı olarak besin alımının azaldığı gözlenmiştir. L-Arginin verilmesi ile ise N^G- nitro-L-Argininin bu etkisi kısmen de olsa geri çevrilebilmiştir. Bunların sonucunda N^G- nitro-L-Argininin obesite tedavisinde kullanılabileceği düşünülmeye başlanmıştır (68)..

Preoptik bölge anjiotensin 2'nin dipsojenik etkisine en duyarlı olan bölgedir (60). L-arginin'in preoptik bölgeye injeksiyonu ile susuz bırakılmış hayvanlarda su içme azalırken, normal hayvanlarda anjiotensin 2'nin dipsojenik etkisi azalmıştır (60). Nitrik oksidin santral sinir sistemindeki bir diğer önemli etkisi ise, özellikle noradrenalin ve dopamin olmak üzere nörotransmitter salınımını düzenlemesidir. Bu etkinin mekanizması tam bilinmemekle birlikte cGMP'yi ikinci haberci olarak kullandığı düşünülmektedir. Serebellum ve hipokampusta presinaptik olarak NMDA reseptörlerinin uyarılması noradrenalin salınımına etkili olur. Bu yolakta NO'in aracı görevi yapabileceği bildirilmiştir. Nitrik oksidin sıçan striatumunda dopamin salınımını kontrol ettiği öne sürülmüştür. Bir NO donörü olan sodyum nitroprussid, striatal kesitlerde dopamin salınımını artırmıştır. Bu artış N-NMMA ile geri çevrilebilmiştir. Ağrı duyumsamasının oluşmasında NO, beyinde ve medulla spinaliste görev alır.

Meller, medulla spinaliste NO oluşumu ve çözünür guanilat siklazın uyarılmasının akut ağrı oluşumunda etkili olduğunu bildirmiştir (69). NO oluşumunun engellenmesi veya çözünür guanilat siklazın inaktivasyonu ile analjezik etki sağlanabilmiştir (69).

Serebral hipoksi ve iskemi durumundaki hücre hasarından glutamat ve kalsiyumun sorumlu olduğu son on yıldır çıkan yayınlarda bildirilmektedir (70). Uzamış iskemi durumunda NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, intrasellüler kalsiyum düzeyinde artışa, bu da NOS aktivasyonu ile NO salınımına neden

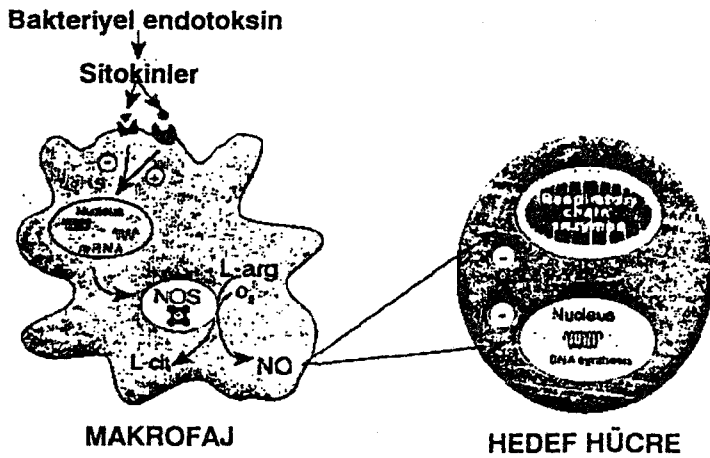
olmaktadır. Bir NO donörü olan sodyum nitroprussidin intrahipokampal injeksiyonu ile nörodejenerasyon olduğu gösterilmiştir (70). NOS enzim inhibitörlerinin glutamat ve NMDA toksisitesini önlediği kortikal hücre kültürü çalışmalarında bildirilmiştir.

İMMUN SİSTEM

İmmünolojik uyarı ile, kalsiyumdan bağımsız çalışan ve indüklenebilen tip 2 NOS enzimi aktive olur. Söz konusu enzim ilk kez makrofajlarda tanımlanmıştır.

Son zamanlara dek endotel hücrelerinde kalsiyum/ kalmodulin bağımlı çalışan NOS'ın varlığı biliniyordu. Ancak 1990 yılında domuz endotel hücre kültüründe lipopolisakkarid ve gama-interferon ile uyarılan, kalsiyumdan bağımsız çalışan indüklenebilir NOS varlığı gösterilmiştir (49,50). İnterlökin - 1 ile indüklenen NOS vasküler düz kas hücrelerinde de gösterilmiştir (49,50).

Makrofajlarda immünolojik uyarı sonucunda sentezlenen NO, tümör hücreleri ve invaziv mikroorganizmalar için sitostatik ve sitotoksik etkilidir (Şekil 12) (49,50,51). Bu etki hücreden hücreye değişmektedir. Değişikliğin sebebi tam bilinmemekle birlikte bazı hücrelerin demir ve sülfür içeren enzimlere olan duyarlılıklarının farklı olmasına bağlanabilir (50,51). NO aracılı makrofaj sitotoksitesisi cGMP aracılığı ile olur (51). Makrofajlardan salınan NO sitotoksik etkisini vücut hücrelerinde de içinde gösterebilir. Sonuçta hücre ölümü ve fonksiyon bozukluğu oluşabilir. Dolayısıyla immünolojik uyarı sonucu oluşan lokal veya sistemik doku hasarından NO sorumlu tutulmaktadır (58).



Şekil 12 : Nitrik oksidin sitostatik ve sitotoksik etki mekanizması

İmmün sistemin bakteriyel ürünlerle uyarılması, yani non spesifik immünitinin aktivasyonunun, kanser ve enfeksiyona karşı olan direnci artırdığı, Fehleisen (1882) ve Cooley (1893) tarafından söylenmiştir. Günümüzde bunun makrofajlardan salınan NO aracılığı ile olduğu ileri sürülmektedir. İndüklenebilen NOS enziminin, T lenfositlerinde de saptanması NO'in spesifik immünitede etkili olduğunu düşündürmekle birlikte bu konuda kesin bilgi elde edilememiştir (58). NO'in hücre yaşamı ve proliferasyonunda etkili olduğu, mitojenlere karşı normal hücre yanıtında görev aldığı bildirilmektedir. Hücre proliferasyonunun başlatılması ve kontrolünün hücre cGMP düzeyindeki değişikliklerle birlikte olması, bu varsayımı güçlendirmektedir.

Nötrofillerde sentezlenen NO'in fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, bu hücrelerin sitotoksik etki oluşturmalarında rol aldığı düşünülmektedir (58). Bunun yanında NO'in nötrofil agregasyonunu inhibe ettiği ve NO donörü olan maddelerin nötrofillerden lizozomal enzim salınımını engellediği söylenirken; buna paralel şekilde NOS enzim inhibitörü N^G - monometil - L arginin'in (L-NMMA) nötrofil kemotaksisini bloke ettiği bildirilmektedir.

Vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde varlığı saptanan tip 2 NOS, immünolojik uyarı ile indüklenir (71). İndüksiyon sonucu cGMP düzeyinin artması, fonksiyonel ve biyokimyasal değişiklikler, polimiksin B, sikloheksimid gibi lipopolisakkarid antagonistleri ile geri çevrilebileceği gibi bu durumlarda oluşan vazokonstrüktör maddelere karşı olan hiporeaktiviteyi de açıklamaktadır (71).

İmmünolojik uyarı ile indüklenen NOS, glukokortikoidler ile inhibe edilebilir (50,51). Glukokortikoidlerin eritem ve ödeme karşı olan etkileri ile endotoksik şok, astma ve romatoid artritteki tedavi edici ve toksik etkileri bu mekanizma ile açıklanabilir.

ADRENERJİK-KOLİNERJİK OLMAYAN İLETİ

Histokimyasal olarak kolinerjik ve adrenerjik sistemin özelliklerini taşımayan otonomik sinirler, adrenerjik ve kolinerjik olmayan (nonadrenerjik - nonkolinerjik - NANC-) sinirler olarak adlandırılmıştır. NANC sinirler motor sinirlerdir, ATP, VIP, GABA, kolesistokinin, P maddesi, nörokinin A, nöropeptid Y, enkefalinler ve somatostatin bu sistemde etkili haberci maddelerdir.

NANC sinirlerde çözünür guanil siklazın uyarılması, bazı dokularda L-arginin analogları ile NANC iletinin bloke olması ve en önemlisi NOS enziminin bu otonomik sinirlerde gösterilmesi, NO'nun NANC sinirlerde nörotransmitter olarak görev yaptığını düşündürmüştür (72).

NANC sinirlerin uyarılması ile eksitator ve inhibitör yanıtlar oluşur. L-arginin /NO yolağının inhibitör yanıtın oluşmasında rol aldığı düşünülmektedir ve nitreerjik düz kas innervasyonu gastrointestinal sistemde, genitoüriner sistemde, solunum sisteminde ve bazı kan damarlarında (penil ve serebral arterler gibi) bulunmaktadır. Gastrointestinal sistemde oldukça geniş, karmaşık motor ve inhibitör fonksiyon içeren nöronlar mevcuttur (73). İnhibitör ileti NANC innervasyonu ile sağlanır. Bu inhibitör iletide ATP, VIP, GABA ve NO rol alır (73). Ancak son çalışmaların ışığında NO'nun tüm gastrointestinal sistemde inhibitör yanıt oluşturan primer nörotransmitter olduğu kabul edilmektedir. NOS enzimi içeren sinir lifleri, sıçan ve kobayda gastrointestinal sistemin antrum, duodenum , ileum, çekum, proksimal ve distal kolon ile anal sfinkter bölgelerinde saptanmıştır (74). NANC ileti peristaltik aktivitenin bir parçası olan gevşemeden sorumlu olduğu gibi, yutkunmadan sonra alt özefagial sfinkterin gevşemesi, yeme sırasında mide fundusunun gevşemesi ve distansiyon durumunda gevşemenin sağlanması gibi bir çok fizyolojik refleksin oluşmasında da etkili olur (74). Gastrointestinal sistemde L-arginin/NO yolağının saptanması ve işlevinin belirlenmesi pek çok hastalığın patofizyolojisinin ve tedavisinin araştırılması için yeni ufuklar açmıştır.

Üriner sistemde mesane ve üretrada NANC innervasyonu saptanmıştır. Mesanede kolinerjik, NANC motor ve NANC inhibitör sistemleri içeren karmaşık bir innervasyon söz konusudur. Detrüssör kası sfinkter uyumsuzluğu, mesane işlev bozukluğu gibi patolojilerde L-arginin/NO yolağının etkili olduğu

düşünülmektedir. Üretrada ise kolinerjik, adrenerjik ve NANC innervasyon mevcuttur (75). Kadınlarda daha sık rastlanan üretral gevşemenin artmış olmasından kaynaklanan inkontinans tipleri, NOS enzim inhibitörleri kullanılarak tedavi edilebilmiştir.

NO'in son zamanlarda tubüler glomerüler feed-back'i modüle ettiği gösterilmiştir. Makula densa'da üretilen NO afferent arteriole diffüze olur. Orada tubüler glomerüler feed back'e aracılık eden vazokonstrüktör sinyale karşı etki gösterir.

Kronik böbrek yetersizliğinde görülen hipertansiyon ve immün yetersizlik, laboratuvar hayvanlarında NO sentezinin engellenmesi ile de görülmüştür (76). L-arginin/NO yolağının endojen inhibitörleri olan asimetrik ve simetrik dimetil argininler değişmeden idrarla atılırlar. Kronik böbrek yetersizliğinde bu inhibitör maddenin atılımı azaldığından plazma değerleri yükselir ve L-arginin/NO yolağının inhibisyonu artar. Hipertansiyon ve immün yetersizlikten bu mekanizma sorumlu tutulmaktadır (58).

L-argininin glukoz varlığında, insülin salınımını artırdığı bilinir. Bu etki L-NMMA ile inhibe edilir. Pankreatik β hücrelerinde cNOS bulunduğundan NO fizyolojik durumlarda insülin salınımında görev alır (77). Diğer yandan yeni bulgular nitrik oksid oluşumunun indüklenmesinin, tip 1 diabet gelişiminde ve pankreatik β hücrelerinin destrüksiyonunda rol oynadığını göstermektedir.

NOS inhibitörleri ile tedavi pankreasın makrofaj infiltrasyonunu azaltır ve hiperglisemiye önler. Pankreas adacıklarının, immunojenik destrüksiyonunda etkili olabilecek spesifik bir NOS inhibitörü, tip 1 diabet gelişiminin önlenmesinde potansiyel bir değere sahip olabilecektir.

Genital sistemde ise, penil ereksiyon sırasında oluşan düz kas ve damar gevşemesi NANC inhibitör sistem aracılığı ile olmaktadır (58). Araştırmacılar, bir NO donörü olan s-nitroso-asetil-penisilamin (SNAP)'in, korpus kavernozumda hızlı ve tam gevşemeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Korpus kavernozumdaki bu gevşeme guanilat siklaz inhibitörü olan metilen mavisi ile geri çevrilmiştir. Bu bulgular ışığında Rajfer ve arkadaşları impotansın bir nedeninin de L-arginin/NO yolağındaki bozukluk olabileceğini bildirmişlerdir (78).

NANC ileti bazı kan damarlarında da mevcuttur. Sığan serebral arterinde endotelde ve sinir liflerinde NANC ileti mevcutturken aorta ve koroner arterde sadece endotelde bulunur (58).

Adrenal bezde de NANC ileti saptanmıştır. L-arginin/NO yolağı hem kortekste hem de medullada bulunur. Sentezde etkili olan NOS enzimi kalsiyum ve kalmoduline bağımlıdır (79). Bu sistemin hormon sentezi ve salınımını kontrol ettiği ileri sürülmektedir.

Yukarıda da değinildiği gibi, NO vücutta çok yaygın olarak bulunmakta, birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol almaktadır. Bu da nitrik okside verilen önemi haklı olarak artırmakta ve yapılabilecek çalışma alanını genişletmektedir. NO'in burada değinilen etkilerine çok kısa zamanda yenilerinin eklenmesi süpriz olmayacaktır.

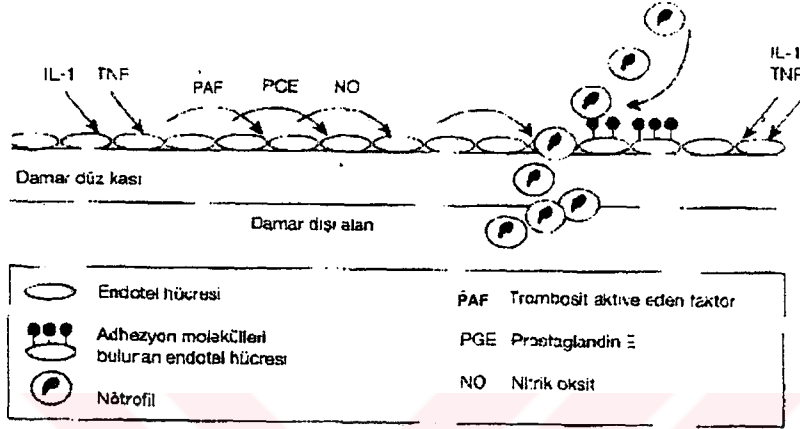
SİSTEMİK ENFLAMATUVAR YANIT SENDROMU VE NİTRİK OKSİD

Gram negatif sepsisli ve septik şoklu hastaların mortaliteleri, antibiyotiklere ve destekleyici tedavi uygulamasına karşın oldukça yüksektir. Septik şoktaki hipotansiyon, pıhtılaşma bozuklukları ve organ yetmezliği gibi özellikler, bazı hastalarda enfeksiyon olmadan da bulunabilir. Bu hastalardaki sistemik enflamatuvar yanıtı açıklayan ortak bir fizyopatolojik düzenek, yaygın endotel hücreleri aktivasyonudur. Bu yüzden gerek enfeksiyöz gerekse enfeksiyöz olmayan bazı uyaranlarla ortaya çıkan yaygın endotel enflamasyonuna sistemik enflamatuvar yanıt sendromu adı verilmektedir (1,8,9).

Son yıllarda, bir çok memeli hücreleri tarafından üretilen potent bir endojen vazodilatatör olan nitrik oksidin, SIRS'daki hemodinamik bozukluklarda rol oynadığı ileri sürülmüştür. (5,10,49,80,81).

SIRS gelişimi çok basamaklı bir süreçtir. SIRS'da jeneralize endotel hücreleri aktivasyonuna oldukça sık rastlanır. Makrofajlardan salınan TNF ve IL-1 gibi sitokinler bu sendromun patogeneğinde önemli bir role sahiptir. T hücrelerinden salınan γ interferonda TNF ve IL-1'in üretimini ve bunlara duyarlılığı artırarak önemli bir etkide bulunur (82). Bu sitokinlerin üçü de endotel hücrelerini aktive eder. SIRS ile ilişkili doku enflamasyonunda, IL-8 adlı başka bir

sitokinde etkili olabilir. "IL-8" olarak anılan bu sitokin, nötrofil, monosit ve lenfositlerin dolaşımından dokulara geçmesini sağlayan kemotaktik peptidler ailesinin bir üyesi olup, fagositlerden ve mast hücrelerinden histamin ile enzimlerin serbestleşmesini stimüle eder, trombosit aktive edici faktörü (PAF) indükler (83) ve bölgesel doku hasarına katkıda bulunur. Şekil 13'de, IL-1 ve TNF'nin damar endotelindeki etkileri gösterilmektedir.



Şekil 13 : IL- 1 ve TNF'nin damar endotelindeki etkileri.

Endotoksinler ve bazı proenflamatuvar sitokinler (TNF, IL-1) endotel hücrelerinde, makrofajlarda, kupffer hücrelerinde ve hepatositlerde bulunan, L-arginini nitrik oksid ve L-sitrulline çeviren, iNOS sentazın aktivasyonunu sağlayarak, nitrik oksid üretimini stimüle ederler (8,9,58,80,81).

Ayrıca TNF, IL-1 ve aktive olan kompleman sistemi güçlü bir vazodilatatör etkiye sahip olan trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin -E (PGE) salınımını ve endotel adezyon moleküllerinin sentezini de indükleyerek artmış bölgesel doku hasarına katkıda bulunur (84).

Nitrik oksid sentazın indüksiyonu ve beraberinde aşırı nitrik oksid yapımı patolojik vazodilatasyona ve hücre hasarına yol açmaktadır (58). Hipotansiyon organ perfüzyonunun azalmasına, asidoza ve organ yetmezliğine neden olur. Burada oluşan hipotansiyonda, vazopressör ajanlara cevap azalmıştır. Vasküler yanıtta bu kaybın biyokimyasının, NO tarafından oluşturulan sinyal ileti sistemindeki değişikliklerden kaynaklandığı gösterilmiştir (81).

SIRS ile NO arasındaki ilişki, erişkin ve pediatrik yaş gruplarında bazı çalışmalarda araştırılmıştır (30,80,81). Ancak yenidoğan bebeklerde sadece bir çalışmada sepsiste plazma nitrit/nitrat düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışmada ise ilk defa SIRS'lu septik yenidoğanlarda idrarda nitrik oksidin stabil son ürünü olan nitrit düzeyleri saptanarak yenidoğan sepsisinde, sistemin enflamatuvar yanıt ve nitrik oksid ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.



GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatırılarak izlenen yenidoğanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu olan 15 septik yenidoğan çalışma grubunu (Tablo 3), SIRS olmayan başka nedenlerle Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan 18 yenidoğanda kontrol grubunu (Tablo 4) oluşturmuştur.

SIRS enfeksiyöz, immünolojik, endokrinolojik, travmatik veya kemoterapötik birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkabilir. Ancak bu çalışmada sadece septik sürecin neden olduğu SIRS ele alınmış ve tanı kriterleri yenidoğan özellikleri gözönüne alınarak modifiye edilmiştir (Tablo 5).

SIRS

Endotel enflamasyonuna karşı sistemik yanıtla ilgili aşağıdaki klinik semptomların iki yada daha fazlasının varlığı;

- Ateş $>38^{\circ}\text{C}$ yada $<37^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı $>180/\text{dak}$ yada $<90/\text{dak}$
- Solunum hızı $>60/\text{dak}$ yada apne
- Lökosit sayısı $>20 \times 10^9/\text{L}$ (yaşamın ilk 3 günü $>30 \times 10^9/\text{L}$) yada $<5 \times 10^9/\text{L}$ yada band/nötrofil ≥ 0.2

Endotel enflamasyonunun nedeninin septik bir süreçle ilgili olması ve bu tür klinik anormalliklere yol açtığı bilinen başka bir nedenin bulunmaması.

Sepsis : SIRS artı pozitif kültür sonucu ile dökümente edilen enfeksiyon

Kültür negatif sepsis : SIRS artı tüm kültür sonuçları negatif olan ve ampirik antibiyotik tedavisi verilen klinik bulguları mevcut enfeksiyon.

Ağır Sepsis ve Kültür Negatif Ağır Sepsis : Sepsisin veya kültür negatif sepsisin organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonla birlikte olması. Hipoperfüzyona bağlı bozukluklar oligüri, laktik asidoz, hipoksemi ve akut mental değişiklikleri kapsar ve en az birinin olması yeterlidir. Organ disfonksiyonu DIC, ARDS, akut renal yetmezlik, akut hepatik yetmezlik veya akut santral sinir sistemi disfonksiyonunun herhangi bir kombinasyonu şeklinde olabilir.

Septik Şok ve Kültür Negatif Septik Şok : Sepsis veya kültür negatif sepsiste sıvı resusitasyonu ve vazopressör tedaviye rağmen hipotansiyonun mevcudiyeti ve hipoperfüzyon bozuklukları.

Tablo 5 : Yenidoğan bebekler için kullanılan SIRS ve sepsis tanımları.

Vaka No	Gestasyonel yaş (hafta)	Vücut ağırlığı (gram)	Tanı	Saptanan mikroorganizma	İdrar nitrit düzeyleri* (μmol nitrit/mmol kreatinin)
1	31	1280	Kültür (-) sepsis	-	8.00
2	32	1800	Kültür (-) sepsis	-	10.30
3	28	1200	Kültür (+) ağır sepsis	Streptokokus pneumoniae	48.00
4	28	1020	Kültür (-) sepsis	-	8.00
5	28	1320	Kültür (+) sepsis	Candida albicans	10.00
6	29	1380	Kültür (+) sepsis	Stafilakokus aureus	13.00
7	34	2000	Kültür (-) sepsis	-	15.00
8	28	700	Kültür (+) sepsis	Candida albicans	17.70
9	37	3500	Kültür (+) sepsis	Stafilakokus aureus	24.00
10	37	1710	Kültür (+) sepsis	Klebsiella pneumoniae	21.00
11	40	3000	Kültür (+) sepsis	Stafilakokus aureus	11.00
12	38	2500	Kültür (-) sepsis	-	34.00
13	28	1200	Kültür (+) ağır sepsis	Streptokokus pneumoniae	8.00
14	37	1750	Kültür (+) sepsis	Klebsiella pneumoniae	25.00
15	33	1700	Kültür (-) sepsis	-	21.00

* Sepsis ortaya çıktıktan sonra ilk 24 saat içinde toplanan idrar örneklerinde saptanan nitrit düzeyleri.

Tablo 3 : Çalışma grubundaki bebeklerin özellikleri

Vaka No	Gestasyonel yaş (hafta)	Vücut ağırlığı (gram)	Tanı	İdrar nitrit düzeyleri* (μ mol nitrit/mmol kreatinin)			
				1. gün	2. gün	3. gün	7. gün
1	31	1150	Prematüre RDS	5.00	2.80	3.40	-
2	28	950	Prematüre RDS	5.000	-	-	4.00
3	39	2750	Transient takipne	-	-	5.20	-
4	28	1240	Prematüre RDS	4.80	2.98	6.20	-
5	34	1970	Prematüre	7.70	3.40	5.20	-
6	34	2570	Prematüre Diabetik anne bebeği	4.50	8.70	6.00	4.40
7	39	1900	Intrauterin gelişme G.	6.40	7.80	-	4.50
8	30	1760	Prematüre	-	2.80	1.50	-
9	35	1955	Prematüre	5.70	-	4.20	2.70
10	35	1910	Prematüre	1.70	-	2.20	3.70
11	35	1830	Prematüre	2.20	-	2.00	3.10
12	31	1915	Prematüre	1.70	1.80	2.40	2.60
13	31	1560	Prematüre	1.70	1.60	1.30	-
14	30	1510	Prematüre	3.30	6.10	-	-
15	28	1145	Prematüre	-	5.60	5.20	6.00
16	35	2240	Transient takipne	-	4.20	2.70	5.50
17	32	1090	Prematüre	4.50	2.00	4.10	3.68
18	36	2550	Transient takipne	5.00	3.50	4.00	-

* Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'ne yatışının 1,2,3 ve 7. gününü toplanan idrar nitrit düzeyleri

Tablo 4 : Kontrol grubundaki bebeklerin özellikleri

Çalışma grubundaki 15 yenidoğan bebekten 6 tanesi kültür negatif sepsis, 7 tanesi kültür pozitif sepsis ve 2 tanesi de kültür pozitif ağır sepsis grubunda değerlendirilmiştir (Tablo 4).

Üç ve onüç numaralı bebekler de hipotansiyon ve dissemine intravasküler koagülasyon mevcut olduğundan, ağır sepsis olarak kabul edilmiş ve kan kültürlerinde streptokokus pneumoniae saptanmıştır. Beş ve sekiz numaralı bebeklerin kan kültüründe Candida albicans, altı, dokuz ve onbir numaralı bebeklerin kan kültüründe Stafilakokus aureus, on ve ondört numaralı bebeklerin kültüründe de Klebsiella pneumoniae saptanmış ve kültür pozitif sepsis grubunda değerlendirilmiştir. Bir, iki, dört, yedi, oniki ve onbeş numaralı bebekler ise kültürlerde üreme olmadığından klinik bulgularıyla kültür negatif sepsis olarak kabul edilmiştir.

Çalışmaya katılan tüm yenidoğan bebeklerin beslenmesi, Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'ndeki beslenme protokolüne göre yapılmıştır.

Bu protokolda; klinik durumu stabil olan bebeklerde enteral beslenmeye anne sütü yada formül süt (ilk günlerde yarı yarıya sulandırılarak) ile başlanmakta ve bebeğin klinik durumuna göre 1-3 ml/kg/gün şeklinde artırılarak devam edilmektedir.

İlk üç gün klinik durumu nedeni ile beslenmeye başlanamayan, bebeklere üçüncü gün total parantral beslenme başlanmaktadır. Üçüncü günde aminoasid solüsyonu (1 gr/kg/gün), 4-6 günler arasında da lipid solüsyonu verilmektedir.

Ayrıca, bebeklerin yattıkları süre boyunca klinik ve laboratuvar izlemleri Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nin rutin protokollerine göre yapılmıştır.

Örneklerin Toplanması

Çalışmaya katılan tüm bebeklerden idrar örnekleri, gece 24-06 arası toplam 6 saatlik porsiyonlar şeklinde toplanmıştır.

İdrar örnekleri, kontrol grubundaki bebeklerden bir, iki, üç ve yedinci günlerde, çalışma grubundaki bebeklerden ise SIRS bulguları ortaya çıktıktan sonra ilk 24 saat içinde alınmıştır.

Kontaminasyonu önlemek amacı ile toplanan idrar örneklerine daha önceden Na azid (1.3 mg/10ml) ilave edilmiştir. Toplanan idrarların 6 saatlik volümleri cc olarak kaydedilmiş ve toplanan idrar örnekleri iki kısma ayrılarak bir kısmı 3000 pM'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı -20 °C'de saklanmıştır. Diğer kısım idrar ise idrardaki kreatinin konsantrasyonuna bakılmak üzere biyokimya laboratuvarına gönderilmiştir. Olası renal fonksiyon bozukluğunun herhangi bir etkisini engellemek için idrar nitrit konsantrasyonları idrar kreatinin konsantrasyonlarına indekslenmiştir.

İdrarda Nitrit Saptanmasının Yöntemi

-20 °C'de saklanan idrar örnekleri çalışmaya başlamadan önce çözündürülmüş ve 3000 pM'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dan 500 µl alınmış ve üzerine 500 µl Griess reaktifi ilave edilerek 5 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra oluşan rengin absorbansı distile su ve Griess reaktifi ile hazırlanan köre karşı spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

NaNO₂ (sodyum nitrit) standartları 0-30 µmol/L konsantrasyonları arasında hazırlanmış ve aynı koşullarda çalışılmıştır.

Elde edilen standart eğrisinden örneklerin absorbanslarına karşı gelen konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Rengi koyu olan idrarlar için, idrar renginden kaynaklanabilecek absorbans yüksekliğini engellemek için, bu örneklerle birlikte örnek körü de çalışılmış ve örnek körünün absorbansı, örnek absorbansından çıkarıldıktan sonra elde edilen değerden konsantrasyon hesabı yapılmıştır.

Griess Reaktifi

- 1) 0.1 % Naftilen diamine dihidroklorür (NEDD) distile su içinde hazırlanmıştır.
- 2) 25 % sulfanilamid, 5% H₃PO₄ (fosforik asid) içinde hazırlanmıştır.

Koyu renkli şişeler içinde, +4 °C'de saklanmış ve stok solüsyon olarak hazırlanmış olan, 1 ve 2 numaralı örneklerden çalışma anında eşit hacimde taze olarak karıştırılıp, Griess reaktifi elde edilmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma ve kontrol gruplarının, idrar nitrit düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi student t testi (unpaired t testi) ile yapılmıştır. 0.05'ten küçük "p" değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



BULGULAR

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromlu yenidoğan bebeklerde idrarda nitrit düzeylerini saptadığımız bu çalışmada, SIRS'lu 15 septik yenidoğan bebek çalışma grubunu, 18 bebekte kontrol grubunu oluşturmuştur.

Çalışma grubundaki bebeklerin ortalama gestasyonel yaşları 32.5 ± 4.4 (28-40) hafta ve ortalama doğum ağırlıkları 1737 ± 753 (700-3500) gram olarak saptanırken, kontrol grubundaki bebeklerin ortalama gestasyonel yaşı $32,8 \pm 3.5$ (28-39) hafta, ortalama doğum ağırlıkları da 1778 ± 535 (950-2750) gram olarak saptanmıştır (Tablo 6). İki grubun ortalama doğum ağırlıkları ve gestasyonel yaşları arasında farklılık saptanmamıştır.

Çalışma grubundaki bebeklerin postnatal yaşı 5.7 ± 5.2 (1-23) gün olduğundan kontrol grubunu oluşturan bebeklerin postnatal yaşı 7 ± 0 günlük iken bakılan idrar nitrit değerleri dikkate alınmıştır (Tablo 6).

	Kontrol Grubu n= 18	Çalışma Grubu n=15	p değeri
Gestasyonel yaş (hafta)	$32,8 \pm 3.5$	32.5 ± 4.4	$p > 0.05$
Doğum ağırlıkları (gram)	1778 ± 535	1737 ± 753	$p > 0.05$
Postnatal yaş (gün)	7 ± 0	$5,7 \pm 5.2$	$p > 0.05$

Değerler ortalama değer \pm standart deviasyon olarak verilmiştir.

Tablo 6 : Kontrol grubu ve çalışma grubundaki bebeklerin, gestasyonel yaş, doğum ağırlığı ve postnatal yaş açısından istatistiksel değerlendirilmesi.

Çalışma grubundaki 15 bebekten 6 tanesinde kültür negatif sepsis, geri kalan bebeklerden 7 tanesinde kültür pozitif sepsis, iki tanesinde de kültür pozitif ağır sepsis saptanmıştır.

Kültür pozitif ağır sepsisli bebeklerin kan kültürlerinde streptokokus pneumoniae, kültür pozitif sepsisi olan 7 bebekten iki tanesinde Candida

albicans, üç tanesinde stafilokokus aureus, iki tanesinde de Klebsiella pneumoniae saptanmıştır.

Kontrol grubundaki bebeklerin postnatal bir, iki, üç ve yedinci günlerde idrar örneklerinde nitrit seviyeleri çalışılmıştır (Tablo 7).

	Kontrol Grubu İdrar Nitrit Düzeyleri			
	1. gün	2. gün	3. gün	7. gün
İdrarda Nitrit (μmol nitrit/mmol kreatinin)	4.22 \pm 1.86	4.09 \pm 2.28	3.62 \pm 1.62	4.01 \pm 1.12

Değerler ortalama değer \pm standart deviasyon olarak verilmiştir.

Tablo 7 : Kontrol grubundaki bebeklerin idrar nitrit düzeyleri.

Kontrol grubundaki bebeklerden saptanan bir, iki, üç ve yedinci günlerdeki idrar nitrit düzeyleri birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tesbit edilememiştir ($p > 0.05$).

Çalışma grubundaki bebeklerden ise SIRS bulguları ortaya çıktıktan sonra ilk 24 saat içinde idrar örnekleri alınmıştır (Tablo 8).

	Kontrol grubu n= 18	Çalışma Grubu n= 15	P değerleri
İdrar nitrit/idrar kreatinin (μmol nitrit/mmol kreatinin)	4.01 \pm 1.12 (2.6-6)	18.35 \pm 11.16 (8-48)	$p \leq 0.0005$

Değerler ortalama değer \pm standart deviasyon olarak verilmiştir.

Tablo 8 : Çalışma grubu ve kontrol grubunun postnatal 7. gün idrar nitrit düzeylerinin karşılaştırılması.

Her iki grubun idrar nitrit seviyeleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p \leq 0.0005$) (Tablo 8).

TARTIŞMA

Önceleri, sadece atmosferi kirletici bir gaz olarak bilinen nitrik oksidin, memeli hücreleri tarafından üretilmesinin keşfi ile birçok biyolojik süreç hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (51).

1992 yılında yılın molekülü seçilen nitrik oksid, son dönemlerin en ilgi toplayan araştırma alanlarından biri olmuştur (33).

Bir çok memeli hücresi tarafından üretilen ve potent bir endojen vazodilatatör olan nitrik oksidin, yaygın endotel hasarı sonucunda ortaya çıktığı ve sistemik enflamatuvar yanıt sendromundaki hemodinamik bozukluklarda rol oynadığı bildirilmiştir (30,49,80,81).

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu enfeksiyöz, immunolojik, travmatik veya kemoterapötik birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkabilir. Fakat çalışmamızda sadece septik sürecin neden olduğu SIRS ele alınmıştır.

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu sırasında, patojenik öneme sahip olan lipopolisakkaridler ve değişik pro-enflamatuvar sitokinler (TNF ve IL-1), endotel hücrelerinde, makrofajlarda, kupffer hücrelerinde ve hepatositlerde bulunan indüklenebilir NO sentaz (iNOS) enzim aktivasyonunu sağlayarak artmış nitrik oksid yapımına neden olur (85).

Dolayısıyla SIRS sırasında lipopolisakkaridlerin ve pro-enflamatuvar sitokinlerin indüklenebilir NO sentaz (iNOS) aracılığı ile fazla miktarda nitrik oksid yapımına yol açarak, patolojik periferal vazodilatasyona, hipotansiyona, yetersiz doku perfüzyonuna ve vazopressör ajanlara karşı rezistansa yol açtığı ileri sürülmektedir (86).

Gaz formunda olması ve yarı ömrünün kısalığı nedeniyle nitrik oksidin in vivo ölçümü zordur (58). Ancak nitrik oksid üretiminin stabil son ürünü olan nitrit ve nitrat biyolojik sıvılarda kolayca ölçülebilir. İdrardaki nitrit düzeyleri, invivo olarak L-argininin NO'e dönüşümünün doğru bir göstergesi olarak kabul edilir.

Bu nedenle, in vivo ve in vitro olarak nitrik oksid üretiminin indikatörleri olarak kullanılabilirler (85,87).

Memeliler, diyetle alınan miktar ile açıklanabilecek değerlerin üstünde nitrit üretirler (88). Şu an için bu fazla nitrit ve nitratın kaynağının, endojen nitrik oksid üretimi olduğu düşünülmektedir.

Nitrik oksid yapımından sorumlu NOS'lardan yapısal NO sentaz (cNOS), vasküler tonusun ve hemostazisin korunmasında önemli rol oynadığı düşünülen bazal nitrik oksid yapımından sorumludur (51,81).

Lipopolisakkarid enjekte edilen farelerin idrarla, bazal seviyenin dokuz katı fazla nitrit ve nitrat atıkları saptanmıştır. Bu muhtemelen lipopolisakkarid tarafından indüklenebilir nitrik oksid sentaz enziminin aktivasyonu sonucudur (30).

Daha önce yapılan çalışmalar sepsisli yetişkin ve çocukların plazmalarında artmış nitrat ve nitrit konsantrasyonlarının bulunduğunu göstermiştir (30,80,81).

Wong ve arkadaşları (81) tarafından yapılan bir çalışmada sepsisli hastalar hipotansif ve hipotansif olmayan olarak iki gruba ayrılmış ve hipotansif hastalarda, hipotansif olmayan hastalara göre serum nitrit ve nitrat düzeyleri daha yüksek saptanmıştır. Aynı çalışmada serum nitrit ve nitrat düzeyi daha yüksek olan hastaların, daha yüksek dozda vazopressör tedaviye ihtiyaç gösterdiği görülmüştür.

Shi ve arkadaşları (89) tarafından yapılan bir çalışmada da, sepsisli yenidoğan bebeklerin plazmalarında nitrat, nitrit düzeylerine bakılmış ve sepsisli hastalarda plazma nitrit, nitrat düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada septik şoklu hastalardaki nitrit ve nitrat düzeyleri, sepsisli hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuş.

Bizim çalışmamızda da, Shi ve arkadaşlarınca yapılan çalışmadan farklı olarak sepsise bağlı SIRS'lu yenidoğan bebekler ele alınmış ve plazma yerine idrar nitrit düzeyleri çalışılmıştır. Benzer şekilde, idrar nitrit düzeyleri kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Literatürde SIRS'lu yenidoğanlarda plazma veya idrar nitrit düzeylerini araştıran bir başka çalışmaya rastlanılmamıştır.

Yenidoğan bebeklerde idrarla nitrit atılımının araştırıldığı bir çalışmada Miller ve arkadaşları (90), 1500 gr altındaki düşük doğum ağırlıklı prematüre bebeklerde, kan transfüzyonu ve indometazin verildikten sonra idrar nitrit

düzeylerine bakmışlardır. Kan transfüzyonundan sonra saptanan idrar nitrit düzeylerinin bir önceki gün ile karşılaştırıldığında azalmış olduğunu, indometazin verilmesinden sonra bakılan idrar nitrit düzeylerinin ise belirgin olarak yükseldiğini görmüşler.

İdrar nitrit konsantrasyonları bir çok klinik çalışmada, endojen nitrik oksid yapımını ölçmek için kullanılmıştır (30,89,91). Fakat bu metodun birkaç sakıncası vardır. Birincisi, nitritin idrar konsantrasyonları nitrojen dengesi tarafından etkilenebilir (58). Nitrojen dengesi kontrol edilebilmesi zor bir değişkendir. Çünkü nitrojen balansının idrar nitrit konsantrasyonları üzerindeki etkilerini doğru bir biçimde belirlemek için, nitrojen alımı, protein katabolizması ve arginin metabolizması gibi değerlerin de ölçülmesi gerekir. Shi ve arkadaşları (89) ile Ochoa ve arkadaşları (30) çalışmalarında bu konuya değinmemişlerdir.

İkincisi, nitrit böbrekler tarafından atıldığı için renal disfonksiyona bağlı olarak idrardaki nitrit konsantrasyonlarında değişiklik olabilir. Bu nedenle hastalarımızda renal disfonksiyonun, karışıklığa yol açabilecek herhangi bir etkisini engellemek için idrar nitrit konsantrasyonları idrar kreatinin konsantrasyonlarına indekslenmiştir.

Diare, endotoksin verilmesi, enfeksiyon ve L-arginin infüzyonu gibi nitrik oksid sentezini aktive ettiği bilinen diğer bazı durumlarda da idrarda nitrit düzeyi artar (76,88,92). Çalışmamızda çalışma grubundaki bebeklerde de enfeksiyon dışında nitrik oksid sentezini aktive edebilecek herhangi bir neden saptanmamıştır.

Enterik flora ve diyet gibi eksternal kaynaklı nedenlerle de idrarda nitrit oluşursa da parenteral veya enteral beslenmenin nitrit atılımını direkt olarak etkilemediği görülmüştür (93). Ayrıca sepsis sendromlu hastalarda bu kaynakların nitrit atılımına etkisi son derece azdır (94).

Çalışmamızdaki bebeklerin beslenmeleri, kontrol grubundaki bebeklere enteral beslenmenin az miktarlarda olsa bile erken başlanması dışında iki grup arasında çok büyük farklılıklar göstermemiştir.

Çalışmamızda kontrol ve çalışma grubundaki bebeklerde zaman zaman furosemid kullanılmışsa da furosemidin nitrit atılımında değişikliğe yol açmadığı bilindiğinden bu elde edilen idrat nitrit seviyelerini etkilememiştir (90).

Yapılan çalışmalarda elde edilen kanıtların çoğu artmış nitrik oksid üretiminin SIRS patofizyolojisine katkıda bulunduğunu desteklemektedir. Fakat nitrik oksid sentez inhibisyonunun sepsis sendromlu hastalarda terapötik değeri gösterilememiştir (8,9,30,31,80,81).

Halen SIRS sırasında NO'in aşırı üretiminin faydalı mı yoksa zararlı mı olduğu tartışılmaktadır. Her iki olasılık için de kanıtlar vardır. Nitrik oksid septik şoktaki hipotansiyona neden olsa da, vasküler bazal tonusu sağlamak, trombosit agregasyonunu inhibe etmek ve aktive lökositlerin vasküler endotele adezyonu gibi önemli görevleri mevcuttur.

Günümüzde mevcut nitrik oksid sentaz inhibitörlerinin farmakolojisi ve toksikolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Hastalara verilen bu inhibitörler nitrik oksid sentazın indüklenebilir formuna selektif değildir. Bu nedenle, nitrik oksidin rolü kesin olarak belirleninceye ve dokuya spesifik yada izoforma spesifik yeni nitrik oksid sentaz inhibitörleri geliştirilene dek sepsis sendromlu hastalarda nitrik oksid sentaz inhibitörlerinin kullanımında dikkatli olunmalıdır.

Sonuç olarak, çalışmamızda septik süreçle bağlı sistemik enflamatuvar yanıt sendromlu yenidoğan bebeklerde idrarla nitrit atılımının arttığını gösterdik. Bu da bize yenidoğanlarda da sistemik enflamatuvar yanıt sendromunda ve yaygın endotel hasarına bağlı olarak L - arginin nitrik oksid yolunun aktive olabileceğini gösterebilir.

SONUÇLAR

Yenidoğan bebeklerde septik süreçse bağıli sistemik enflamatuvar yanıt sendromu-nitrik oksid ilişkisini araştırmak amacı ile yaptığımız bu çalışmada, SIRS'lu 15 septik yenidoğanda, idrarda nitrik oksidin stabil son ürünü olan nitrit düzeyleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar, benzer gestasyonel yaş, doğum kilosu ve postnatal yaştaki 18 yenidoğandan oluşan kontrol grubunun değerleri ile karşılaştırılmıştır.

1- Kontrol grubundaki bebeklerde idrar nitrit düzeyleri, postnatal birinci günde 4.22 ± 1.86 μmol nitrit/mmol kreatinin, 2. günde 4.09 ± 2.28 μmol nitrit/mmol kreatinin, 3. günde 3.62 ± 1.62 μmol nitrit/mmol kreatinin ve 7. günde 4.01 ± 1.12 μmol nitrit/mmol kreatinin olarak saptanmıştır. Bu idrar nitrit düzeyleri birbirbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p > 0.05$).

2- Ortalama postnatal yaşı 5.7 ± 5.2 gün olan çalışma grubundaki bebeklerden sepsis ortaya çıktıktan sonra, ilk 24 saat içinde alınan idrar örneklerinde nitrit düzeyi, 18.35 ± 11.16 μmol nitrit/mmol kreatinin olarak bulunmuştur.

3- SIRS'lu yenidoğan bebeklerin idrar nitrit düzeyleri, kontrol grubunun benzer postnatal yaş olan 7. gün idrar nitrit düzeyleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p \leq 0.0005$).

ÖZET

Yaygın endotel hasarı sonucunda ortaya çıktığı düşünülen sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), enfeksiyöz yada enfeksiyöz olmayan bazı uyaranlarla meydana gelmektedir. Endotoksinler ve bazı sitokinler endotel hücrelerinde, makrofajlarda, kupffer hücrelerinde ve hepatositlerde indüklenebilir nitrik oksid sentaz aktivasyonunu sağlayarak nitrik oksid üretimini stimüle ederler. Artmış nitrik oksid SIRS'da meydana gelen hemodinamik değişikliklerden sorumludur.

Yenidoğan bebeklerde septik süreçle ilgili, sistemik enflamatuvar yanıt sendromu ile nitrik oksid ilişkisini araştırmak amacı ile yaptığımız bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatırılarak izlenen 15 SIRS'lu yenidoğan çalışma grubunu, başka nedenlerle izlenen 18 yenidoğan bebek de kontrol grubunu oluşturmuştur. Çalışma grubunun, ortalama gestasyonel yaşı 32.5 ± 4.4 (28-40) hafta ve ortalama doğum ağırlığı 1737 ± 753 (700-3500) gram iken kontrol grubunun ortalama gestasyonel yaşı 32.8 ± 3.5 (28-39) hafta ve ortalama doğum ağırlıkları da 1778 ± 535 (950-2750) gram olarak bulunmuştur.

İki grubun ortalama doğum ağırlıkları ve gestasyonel yaşları arasında farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Çalışma grubundaki 15 yenidoğan bebekten, 6 tanesi kültür negatif sepsis, 7 tanesi kültür pozitif sepsis ve 2 tanesinde kültür pozitif ağır sepsis olarak değerlendirilmiştir. SIRS'lu yenidoğan bebeklerde idrar nitrit düzeylerini saptadığımız bu çalışmada ortalama postnatal yaşı 5.7 ± 5.2 gün olan çalışma grubundaki yenidoğanlardan, SIRS bulguları ortaya çıktıktan sonra ilk 24 saat içinde, kontrol grubunda ise postnatal bir, iki, üç ve yedinci günlerde idrar nitrit düzeyleri saptanmıştır.

Kontrol grubundaki bebeklerden alınan ortalama idrar nitrit düzeyleri birinci gün 4.22 ± 1.86 μmol nitrit/mmol kreatinin, ikinci gün 4.09 ± 2.28 μmol nitrit/mmol kreatinin, üçüncü gün 3.62 ± 1.62 μmol nitrit/mmol kreatinin ve yedinci gün 4.01 ± 1.12 μmol nitrit/mmol kreatinin bulunmuş olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$).

Çalışma grubunun idrar nitrit düzeyi ise $18,35 \pm 11.16$ μmol nitrit/mmol kreatinin olarak saptanmıştır.

Çalışma grubunun idrar nitrit düzeyleri, kontrol grubunun benzer postnatal yaş olan 7. gün değerleriyle karşılaştırıldığında, anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.0005$).

Sonuç olarak, çalışmamızda septik süreçte bağlı sistemik enflamatuvar yanıt sendromlu yenidoğan bebeklerde idrarda nitrit atılımının arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç bize yenidoğanlarda da enfeksiyöz nedene bağlı sistemik enflamatuvar yanıt sendromunda yaygın endotel hasarına bağlı olarak L-arginin nitrik oksid yolunun aktive olabileceğini gösterebilir.



KAYNAKLAR

- 1- Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 467-9.
- 2- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 188: 373-7.
- 3- Govender G, Kam PCA. Nitric oxide: basic science and clinical applications. *Anaesthesia* 1994; 49: 515-21.
- 4- Lorente JA, Landin L, Renes E, Pablo R, Jorge P, Rodena E, et al. Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21: 759-67.
- 5- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Schein RM, et al. American College of Chest Physicians/society of Critical Care Medicine Concensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1481-3.
- 6- Roger C, Bone RC. The epidemiology and naturel course of systemic inflammatory response syndrome. *JAMA* 1993; 268: 3452-5.
- 7- Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP, Rangel-Frausto MS. The natural history of systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *JAMA* 1995; 273: 117-23.
- 8- Saez-Llorens X, Mc-Cracken GH. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology and managements. *J Pediatr* 1993; 123: 457-507.
- 9- Castillo L, Sanchez M. Septic shock: Pathogenesis and treatment. *Indian J Pediatr* 1993; 60: 367-79.
- 10- Dunn D. Role of endotoxin and host cytokines in septic shock. *Chest* 1991; 100: 1645-85.
- 11- Wong P, Chaudry IH. Nitric Oxide: To block or enhance its production during sepsis ? *Arch Surg* 1994; 129: 1137-43.
- 12- Joulov-Shaeffer G, Gray-Fleming I. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves the L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990; 259: H 1038-43.

- 13- Mizoguchi Y, Ichikawa Y, Kloka K, Kawada N, Kabayashi K, Yamamoto S. Effects of arachidonic acid metabolites and interleukin-1 on platelet activating factor production by hepatic sinusoidal endothelial cells from mice. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 283-8.
- 14- Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM. Interleukin 1 induces prolonged L-arginine dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991; 87: 602-8.
- 15- Guillermin R, Vargo TM, Rossier J. Beta-endorphin and adrenal corticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. *Science* 1977; 197: 1367-70.
- 16- Roilides E, Pizzo PA. Modulation of host defenses by cytokines: evolving adjuncts in prevention and treatment of serious infections in immuno compromised hosts. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 508-24.
- 17- Weisbart RH, Gasson JC, Golde DW. Colony-stimulating factors and neutrophils: colony stimulating factors and host defense. *Ann Intern Med* 1989; 110: 297-303.
- 18- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34.
- 19- Argenbright LW, Barton RW. Interactions of leukocyte integrins with intercellular molecular 1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo. *J Clin Invest* 1992; 89: 259-72.
- 20- Calandra T, Glauser MP, Schelekens J. Treatment of gram negative septic shock with human IgG antibody to E. coli J5. *J Infect Dis* 1988; 158: 312-9.
- 21- Greenman RL, Schein RMH, Martin MA. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram negative sepsis. *JAMA* 1991; 266: 1097-102.
- 22- Petrak R, Balk R, Bone R. Prostaglandins, cyclooxygenase inhibitors and thromboxane synthesis inhibitors in the pathogenesis of multiple organ failure. *Crit Care Clin* 1989; 5: 303-14.

- 23- Mustafa MM, Ramilo O, Mertsola J. Modulation of inflammation and cachectin activity in relation to treatment of experimental H. Influenzae type b meningitis. *J Infect Dis* 1989; 160: 818-25.
- 24- Hinshaw L, Beller-Todd B, Archer L. Current management of the septic shock patient: Experimental basis for treatment. *Circ shock* 1988; 9: 543-53.
- 25- Bone R, Fisher C, Clemmer T. A controlled clinical trial of high - dose methyl prednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987; 317: 653-8.
- 26- Napolitano L, Chernow B. Endorphins in circulatory shock. *Crit Care Med* 1988; 16: 566-7.
- 27- Walsh C , Sugerman H. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor α attenuates cardiopulmonary dysfunction in porcine gram negative sepsis. *Arch Surg* 1992; 127: 138-45.
- 28- Vincent J, Baker J, Marceaux G. Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients. *Chest* 1992; 101: 810-15.
- 29- Zimmerman J, Ringer T. Inflammatory host responses in sepsis. *Crit Care Clin* 1992; 8: 163-89.
- 30- Ochoa JB, Udekwu AQ, Billiar TR, Curran RD, Cerna FB, Simmons RL, et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 16: 621-6.
- 31- Evans T, Carpenter A, Silva A, Cohen J. Inhibition of nitric oxide synthase in experimental gram negative sepsis. *J Infect Dis* 1994; 169: 343-9.
- 32- Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992; 266: 68-77.
- 33- Koshland DE. The molecule of the year. *Science* 1992; 258:1861.
- 34- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 1251-7.

- 35- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524.
- 36- Vallance P, Moncada S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *Crit Care Med* 1993; 1: 77-86.
- 37- Pohl V, Busse R, Kuon F, Bassenge E. Pulsatile perfusion stimulates the release of endothelial autocoïdes. *J Appl Cardiol* 1986; 1: 109-14.
- 38- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-8.
- 39- Tuna R, Çağlayan GB. Bir endojen maddenin kısa tanımlanması. Nitrik oksid. *Sendrom* 1995; 7(7): 25-8.
- 40- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem* 1992; 17: 399-402.
- 41- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hadson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-52.
- 42- Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338: 1557-60.
- 43- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572- 5.
- 44- Rapoport RM, Murad F. Agonist induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res* 1983; 52: 352-7.
- 45- Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 485-90.
- 46- Carbert JA. Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans. Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide. *J Clin Invest* 1992; 90: 2384-91.

- 47- Yuen PS, Potter LR, Gerbers DL. A new form of guanyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 1990; 29: 10872-8.
- 48- Ujiie K, Drewett JG, Yuen PS, Star RA. Differential expression of mRNA for guanyl cyclase-linked endothelium-derived relaxing factor subunits in rat kidney. *J Clin Invest* 1993; 91: 730-4.
- 49- Star RA. Southwestern internal medicine conference: Nitric oxide. *Am J Med Sci* 1993; 306: 348-58.
- 50- Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
- 51- Anggard E. Nitric oxide: Mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994;343: 1199-206.
- 52- Knowles R. Nitric oxide synthases. *Biochemistry* 1994; 3-6.
- 53- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2: 1057-58.
- 54- Yao SK, Ober JC, Krishnaswami A, Funguson JJ, Anderson HV, Golino P, et al. Endogenous nitric oxide protects agonist platelet aggregation and flow variations in stenosed and endothelium injured arteries. *Circulation* 1992; 86: 1302-9.
- 55- Mugge A, Forestermann V, Lichtlen PR. Platelets, endothelium dependent responses and atherosclerosis. *Ann Med* 1991; 23: 545-50.
- 56- Moncada S, Palmer RM, Higgs A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1909-89.
- 57- Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistad DD. Restoration of endothelium dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 1987; 80: 1808-87.
- 58- Moncada S, Palmer RM, Higgs A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
- 59- Luscher TF, Vanhoutte PM, Raji L. Anti hypertensive treatment normalizes decreased endothelium dependent relaxations in rats with salt-induced hypertension. *Hypertension* 1987; 9 (Suppl 3): 193-7.

- 60- Tuna R, Çağlayan GB. Fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü: Nitrik oksid. Sendrom 1995; 7(8): 54-9.
- 61- Nava E, Palmer RM, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: How much is beneficial? Lancet 1991; 338: 1155-7.
- 62- Frostell CG, Fratacci MD, Wain JC, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. Circulation 1991; 83: 2038-47.
- 63- Pepke-Zabe J, Higenbottom TW, Dinh - Zuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide causes selective pulmonary vasodilation in patients with pulmonary hypertension. Lancet 1991; 338:1173-4.
- 64- Frostell CG, Blomquist H, Hedenstierna G, Zapol WM, Lundberg J. Inhaled nitric oxide selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. Anesthesiology 1993; 78: 427-35.
- 65- Deguchi T. Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal soluble fraction of rat brain. J Biol Chem 1977; 252: 7617-52.
- 66- Garthwaite J, Charles SL, Chees-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature 1988; 336: 385-96.
- 67- Rosenblum WI. Endothelium derived relaxing factor in brain blood vessels is not nitric oxide. Stroke 1992; 23: 1527-37.
- 68- Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long term potentiation. Eur J Pharmacol 1991; 199: 379-85.
- 69- Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Mayes TJ. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. Neuroscience 1992; 50: 7-14.
- 70- Loiacono RE, Beart PM. Hippocampal lesions induced by micro injection of the nitric oxide donor nitroprusside. Eur J Pharmacol 1992; 216: 331-3.
- 71- Ress DD, Celtek S, Palmer RM, Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone. An insight into endotoxin shock. Biochem Biophys Res Commun 1990; 173: 541-8.

- 72- Brecht DS, Hwang PM, Synder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neurol role for nitric oxide . *Nature* 1990; 347: 768-70.
- 73- Taylor GS, Bywater RA. Novel autonomic neurotransmitters and intestinal function. *Pharmacol Ther* 1989; 40: 401-38.
- 74- Snyder SH. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science* 1992; 257: 494-8.
- 75- Garcia-Pascual A, Costa G, Garcia-Sacristan A, Andersson KE. Relaxation of sheep urethral muscle induced by electrical stimulation of nerves. Involvement of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 1991; 141: 531-9.
- 76- Granger DL, Hibbs JB, Broadrax LM. Urinary nitrate excretion in relation to murine macrophage activation. *J Immunol* 1991; 146: 1294-302.
- 77- Schmidt HH, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F. Insulin secretion from pancreatic β cell caused by L-arginine derived nitrogen oxides. *Science* 1992; 255: 721-23.
- 78- Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Doney FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediatory of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *New Engl J Med* 1992; 326: 90-4.
- 79- Palacios M, Knowles RG, Palmer RMJ, Moncada S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 802-6.
- 80- Jimenez JG, Salgado A, Mourelle M, Martin MC, Sugura RM, Peracaula R, et al. L-arginin: Nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med* 1995; 23: 253-8.
- 81- Wong HR, Carcillo JA, Burckart G, Shah N, Janosky JE. Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1995; 23: 835-42.
- 82- Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 559-73.

- 83- Biancone L, Tetta C, Tunello E. Platelet activating factor biosynthesis by cultured mesangial cells is modulated by proteinase inhibitors. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1251-61.
- 84- Dinorella CA, Gelfand JA, Wolf SM. The anticytokine strategies in systemic inflammatory response syndrome treatment. *JAMA* 1993; 269: 1829-65.
- 85- Kilbourn RG, Belloni P. Endothelial cell production of nitrogen oxide in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 772-6.
- 86- Kilbourn RG, Griffith OW. Over production of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 827-31.
- 87- Hibbs JB, Westenfelder C, Taintor R. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992; 89: 867-77.
- 88- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-64.
- 89- Shi Y, Li HQ, Shen CK, Wang J, Quin S, Liv R. Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. *J Pediatr* 1993; 123: 435-8.
- 90- Miller MJS, Eloby-Childress S, Snapp B, Chotinaruemol S, Steen VL, Clark DA. Urinary nitrite oxide excretion in premature infants: effects of transfusion or indomethacin. *Acta Pediatr* 1993; 82: 291-5.
- 91- Jacob TD, Ochoa JB, Undekwu AQ, Wilkinson J, Murray T, Billiar TR. Nitric oxide production is inhibited in trauma patients. *J Trauma* 1993; 35: 590-96.
- 92- Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stuehr DJ, Demetris AJ, Simmon RL. Modulation of nitrogen oxide synthesis invivo: N^G-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukocyte Biol* 1990; 48: 565-9.
- 93- Leaf CD, Wishnok JS, Hurley JP, Rosenblad WD, Fox JG, Tannenbaum SR. Nitrate biosynthesis in rats, ferrets and humans. Precursor studies with L-arginine. *Carcinogenesis* 1990; 11: 855-8.
- 94- Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrite synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 1981; 212: 56-8.