

SEPTİK ŞOK ŞÜPHELİ NEONATAL BUZAĞILARDA SERUM NİTRİK OKSİT (NO) KONSANTRASYONLARI

Kemal IRMAK*

Turan CİVELEK**

Yayın Kodu: 2004/36-A

Özet: Bu çalışmada septik şok şüpheli neonatal dönem buzağılarda serum nitrik oksit (NO) konsantrasyonlarındaki değişim araştırıldı. Çalışmanın hayvan materyalini 10'u sağlıklı ve 15'i septik şok şüpheli olmak üzere, yaşları 5-29 gün arasında değişen farklı cinsiyetlere sahip toplam 25 Holstein buzağı oluşturdu. Klinik olarak septik şok şüpheli buzağuların serum nitrik oksit konsantrasyonları istatistiksel olarak önemli ölçüde ($p < 0.001$) yüksekti. Neonatal buzağılarda septik şokun değerlendirilmesinde, serum nitrik oksit konsantrasyonunun faydalı bir kriter olabileceğini kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: Septik şok, neonatal buzağı, nitrik oksit.

Sera Nitric Oxide (NO) Concentrations in Neonatal Calves with Presumed Septic Shock

Summary: The purpose of this study was to examine the changes of nitric oxide (NO) concentrations in neonatal calves serum with presumed septic shock. In this study, 10 clinically healthy and fifteen diseased (suspected with septic shock), totally twenty five neonatal Holstein calves in different ages and different sex were used. In this research, it was concluded that serum nitric oxide levels were significantly increased ($p < 0.001$) compared to control group. The study documents that serum NO may be a useful indicator for evaluation of septic shock in neonatal calves.

Keywords: Septic shock, neonatal calves, nitric oxide.

GİRİŞ

Neonatal buzağı ölümleri tüm dünyada sığır yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden biridir ve çoğunlukla enfeksiyöz hastalıklara bağlı olarak şekillenmektedir. Ölümler bakteriyemi, viremi ve endotoksemi sonucunda meydana gelir¹. Neonatal dönem hastalıklarına modern işletmelerde de sıklıkla rastlanmakta olup mortalite oranı % 15'lerden % 30'lara kadar değişmektedir².

Septik şok, sepsisle birlikte gelişen hipotansiyonu tanımlar ve sepsisli hastaların yaklaşık yarısında bir komplikasyon olarak ortaya çıkar³⁻⁵. Septik şok hipotansiyon, vasküler kollaps, vasopleji ve multiple organ yetmezliği ile karakterizedir⁵. Şok gelişimi dolaşım yetmezliğine yol açar ve vital organların perfüzyonu ve oksijenizasyonu yeterince sağlanamaz⁶. Septik şok olguları akciğer, böbrek ve beyin gibi organların disfonksiyonlarına ve sonuçta multiple organ yetmezliklerine ve ölüme yol açabilmektedir^{3,4,7}. Septik hastalarda hiperdinamik dönemde taşikardi, düşük sistemik vasküler direnç, hipoksemi, oligüri ve laktik asidozis tipiktir⁶. Enfeksiyonun ilerlemesiyle birlikte kateşolaminler, kortizol ve glukagonun dolaşımdaki seviyelerinin artması, taşikardi ve periferik vazokonstriksiyona yol açar^{3,5}. Bu dönemi, progressif vazodilatasyon takip eder ve daha sonra olay kardiyak yetmezlik, doku perfüzyonu ve oksijenizasyonundaki bozulma ile sonuçlanır^{5,6}.

Septik şok sıklıkla Gram-negatif enfeksiyonlar (endotoksemik şok) sonucu gelişmesine rağmen, vakaların yaklaşık 1/3'ünde Gram pozitif enfeksiyonlar rol oynamaktadır. Nadir gözlenmekle birlikte, viral, mantar ve paraziter etkenlerde etiyolojik nedenler arasında sayılabilir⁵. Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan LPS (lipopolisakarit) yapısındaki bakteriyel endotoksinler Gram-negatif septik şoklardaki yüksek morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleridir^{3,5,8}. Bakteriyel endotoksin (LPS)'ler; interlökinler, tümör nekrozis faktör, serbest oksijen radikalleri, toksik eicosanoidler, platelet aktive edici faktör ve nitrik oksit (NO) gibi birçok mediatörün salınımına yol açarlar. LPS, NO salınımında etkin rol oynayan kuvvetli bir uyarılabilir NO sentaz (iNOS) aktivatörüdür⁹. Gram pozitif septik şok olgularının gelişiminde ise farklı mediatörler rol oynar. Peptidoglikan ve lipoteichoic asid (LTA) bilinen başlıca mediatörlerdir^{3,5}.

Nitrik oksit (NO) nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında iNOS tarafından L-argininin terminal azot atomundan üretilen sitotoksik serbest bir radikaldir¹⁰. NO immünomodülasyonda rol oynamakla birlikte, antimikrobiyel ve tümörisidal etkisi de vardır. Ayrıca, sinirsel ileti oluşumu, solunum ve bağırsak hareketleri, hormon salınımının düzenlenmesi ve kalp damar sistemi üzerine önemli görevler üstlenmiştir. Nitrik oksit, canlıların yaşamsal işlevleri-

* Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya-TÜRKİYE

** Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyon-TÜRKİYE

ni sürdürebilmeleri için çok önemli bir molekül olmakla birlikte, fazla miktarda salındığında zararlı etkiler oluşturabilmektedir¹¹. Örneğin, septik şokta sitokinlerin uyardığı iNOS tarafından oluşturulan fazla miktardaki NO, dokularda hasar oluşturabilmektedir. NO'nun trombositlerin endotele yapışmasını engellemek ve hayati organlara kan akımını düzenlemek gibi rolleri de vardır. Bu bilgiler nitrik oksitinin hem proenflamatuvar, hem de yangı önleyici etkilerinin olduğunu göstermektedir^{11,12}.

Septik şok olgularında, uyarılabilir NO sentaz enzim aktivitesindeki uyarıma bağlı olarak NO konsantrasyonlarında aşırı yükselmeler tespit edilir¹³. NO; endotoksemi ve sepsis olgularında, dolaşıma salınan çok sayıdaki aktif biyolojik maddenin en önemlilerinden biridir¹⁴. Sepsiste gelişen multiple organ yetmezliğine yol açan irreversibl doku hasarından oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bildirilmekte ve NO'nun yüksek konsantrasyonları normal olarak sepsis olgularında gözlenen makro ve mikrodolaşım düzensizliklerinin en temel nedeni olarak gösterilmektedir. Oksijen radikalleri ve NO, sepsisin ilk dönemlerinde ortaya çıkmakta ve hastalığın gelişim seyrini etkilemektedir¹³.

Bu çalışmanın amacı septik şok neonatal buzağılarda serum Nitrik Oksit (NO) konsantrasyonlarını belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmanın hayvan materyalini yaşları 5-29 gün arasında değişen, farklı cinsiyete sahip 10'u sağlıklı ve 15'i klinik olarak septik şok şüpheli olmak üzere toplam 25 Holstein buzağı oluşturdu. Septik şok şüpheli buzağılar ortalama 1-3 günlük hastaydı ve şok tedavisi uygulanmasına karşın (sıvı ve elektrolitler, antibiyotikler, solunum ve dolaşım düzenleyiciler, nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar ve destek tedavisi) bu buzağılardan altı adedi öldü.

Serumda nitrat (NO₃) konsantrasyonlarının belirlenmesi: Nitrik oksit ölçümü için alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra, 15 dakika süre ile 1500 devirde santrifüje edilerek serumları çıkarıldı ve serumlar ölçüm yapıncaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı. Serumlardaki nitrat konsantrasyonları Stevenson¹⁵ ve Gokce ve Woldehiwet¹⁶ tarafından uygulanan metodlara göre belirlendi. Kısaca; her bir serum örneğinden 30 µl bir godeye eklendi ve üzerlerine 5 µl nitrat reduktaz enzimi (5 U/ml; Sigma) ve 15 µl NADPH (1,25 mg/ml; Sigma) eklendi ve oda ısısında

20 dk inkübe edildi. Daha sonra bu godelerden her birine 100 µl Griess Reagent (%1 oranında Sulfanilamid dihidroklorid, % 0.1 oranında naftiletendiamin dihidroklorid ve % 2.5 oranında fosforik asid) ve 100 µl triklorasetik asid (%10 solusyonu; Sigma) eklendi ve oluşan protein çökeltisi 8000 devirde santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu godelerdeki supernatantların her birinden 100 µl olmak üzere 96 çukurcuklu ELİSA plaklarının iki çukurcuğuna aktarıldı. Daha sonra örneklerin zaman geçirmeden optikal dansiteleri 550 nm filtre kullanılarak ELİSA okuyucusunda okundu. Serum nitrat konsantrasyonlarının belirlemek için sodyum nitrat (NaNO₃; Sigma) ölü buzağı serumu (Sigma) içinde 2 katı sulandırılarak (0.97-1000 µM aralığında) yukarıda açıklandığı gibi optikal dansiteleri belirlendi. Daha sonra standart olarak kullanılan NaNO₃ sonuçları grafik kağıdına aktarılarak serumdaki gerçek nitrat düzeylerinin ölçülmesinde kullanıldı.

İstatistik analiz bilgisayar ortamında istatistik programı kullanılarak yapıldı (Minitab 12, Windows). Kontrol ve hastalık grupları arasındaki karşılaştırma için two sample Student testi kullanıldı. Önemliliğin kontrolü p<0.05 değerine göre yapıldı.

BULGULAR

Sistemik klinik muayene sonucu hasta buzağılarda; sternal veya lateral yatma, depresyon, tepkisiz veya komatöz, hiperemik veya siyanotik mukoz membranlar, dehidrasyon (8-12), uzamış kapillar dolma zamanı (>3 saniye), artmış nabız oranı (>120 vuru/dakika), artmış solunum sayısı (>45 vuru/dakika), femoral arterial nabızın zayıf veya hissedilmemesi, emme refleksinin zayıf veya olmaması, artmış (>40.5°C) veya azalmış (<37°C) rektal derece tespit edildi. Bu buzağılarda aynı zamanda solunum distressi ve diyare, veya her ikisi birden belirlendi. Kan sürme preparatlarında toksik nötrofiller belirlendi. Hasta buzağılardan, sıvı-elektrolit, antibiyotik, solunum ve dolaşım düzenleyici, nonsteroidal antienflamatuvar ve destek tedavisine rağmen, altı tanesi öldü. Septik şok şüpheli buzağılarda ortalama serum NO değerleri (42.40±5.5 µM), kontrol grubuyla (19.32±1.0 µM) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde (p<0.001) yüksek bulundu.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Serumda NO'nun parçalanması sonucu bir ara ürün olan nitrat oluşmaktadır ve invivo ortamda nitrat konsantrasyonunun artışı direkt olarak NO üretiminde artmış olduğunu gösterir^{10,15}. Bu nedenle çalışmamızda

serum örneklerinde bulunan NO üretiminin bir indikatörü olan nitrat NADPH ve nitrat reduktaz enzimi ile nitrite indirgenerek ölçülmüştür.

Çalışmada neonatal buzağılarda septik şok şüpheli olgularında serum NO konsantrasyonlarındaki değişim araştırılmış ve elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistik yönden önemli veriler elde edilmiştir.

Sepsis ve septik şok olgularında serum nitrik oksit konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir¹⁷⁻¹⁹ Benzer sonuçlar Schoenberg ve ark.¹² ve Titheradge⁵ tarafından da bildirilmiştir. Üretilen bu aşırı NO'nun, vasomotor tonusta değişikliklere ve myokardiyal fonksiyonda azalmaya yol açtığı ve sepsiste gelişen vazodilatasyon ve hipotansiyon gibi patofizyolojik değişikliklerle yakın ilişkili olduğu bildirilmektedir^{5,6,18,20}. NO'nun septik şokun patogenezisinde rol oynayan önemli bir anahtar mediatör madde olduğu Wolfe ve Dasta²⁴ tarafından da bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada da septik şok şüpheli neonatal buzağılarda serum NO konsantrasyonlarında önemli derecede artış (p< 0.001) tespit edildi. Bu sonuç Shi ve ark.²⁵'in bulgularıyla benzerlik göstermekte ve yukarıdaki araştırmacıların da ifade ettikleri görüşle paralellik arz etmektedir.

Sonuç olarak, serum nitrik oksit düzeyinin neonatal buzağılarda sepsise yol açan hastalıkların seyrinin ve şiddetinin belirlenmesinde ve septik şokun değerlendirilmesinde kullanılabilecek faydalı bir kriter olduğu kanatine varıldı.

KAYNAKLAR

- 1 Lofstet J, Dahoo IR, Duizer G: Model to predict septicemia in diarrheic calves. *J Vet Intern Med*, 13, 81-88, 1999.
- 2 Martin SW, Schwake CW, Franti CE: Dairy calf mortality rate: Influence of management and housing factors on calf mortality rate in Tulare Country, California. *Am J Vet Res*, 36, 1112-1114, 1975.
- 3 Rackow EC, Astiz ME: Pathophysiology and treatment of septic shock. *J Am Med Assoc*, 266: 548-554, 1991.
- 4 Kilbourn R: Nitric oxide and shock. *Dis Mon*, 43: 281-348, 1997.
- 5 Titheradge MA: Nitric oxide in septic shock. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411: 437-455, 1999.
- 6 Thiemermann C: Nitric oxide and septic shock, *Gen. Pharmacol*, 29: 159-166, 1997.
- 7 Bone RC: Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med*, 154:26-34, 1994.
- 8 Millar GM, Thiemermann C: NO in Septic Shock, in: M.S. Goligorski, S. Gross (Eds.), Nitric oxide and the kidney. Physiology and Pathophysiology, Chapman and Hall. New York, pp: 271-306, 1997.

- 9 Wolkow PP: Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm Res*, 47(4):152-66, 1998.
- 10 Tayeh MA, Marletta A: Macrophage oxidation of L-arginin to nitric oxide, nitrite, and nitrate. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 19654-19658, 1989.
- 11 Bülbül A: Mastitisli inek sütlerinde nitrik oksit düzeyi ile somatik hücre sayısı arasındaki ilişki. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 2003.
- 12 Vincenl JL: Nitric oxide directed strategies. *Sepsis*, 1: 17-18, 1997.
- 13 Schoenberg MH, Nussler AK, Beger HG: Oxygen radicals and nitrogen monoxide in sepsis. *Chirurg*, Jan;66(1):18-26, 1995.
- 14 Parratt JR: Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxaemia? *J Physiol Pharmacol*, Dec;48(4):493-506, 1997.
- 15 Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A: IL-12-induced protection gainst blood-stage Plasmodium chabaudi as requires INF-1 and TNF-a and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *Journal of Immunology*, 155: 2545-2556, 1995.
- 16 Gokce HI, Woldehiwet Z: Production of tumour necrosis faktor-alpha (TNF-a) and reactive nitrogen intermediates by ovine peripheral blood leucocytes stimulated by Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila. *Journal of Comparative Pathology*, 126: 202-211.
- 17 Tracey WR, Tse J, Carter G: Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide syntase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 272: 1011-1015, 1995.
- 18 Symeonides S, Balk RA: Nitric oxide in the pathogenesis of sepsis. *Infection Disease Clinics of North America*, 13,2: 449-463, 1999.
- 19 Kirkeøen KA, Strand ØA: The role of nitric oxide in sepsis-an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*, 43,3: 275-288, 1999.
- 20 Vallance P, Moncada S: Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz*, Feb;1(1):77-86, 1993.
- 21 Suffredini AF: Myocardial dysfunction in sepsis: clinical and experimental investigations. *Chweiz Med Wochenschr*, Sep 26;128(39):1444-52, 1998.
- 22 McDonough KH, Smith T, Patel K, Quinn M: Myocardial dysfunction in the septic rat heart: role of nitric oxide. *Shock*, Nov;10(5):371-6, 1998.
- 23 Cobb JP: Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg Infect (Larchmt)*, Summer;2(2):93-100, 2001.
- 24 Wolfe TA, Dasta JF: Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann Pharmacother*, Jan; 29(1):36-46, 1995.
- 25 Shi Y, Li HQ, Shen CK, Wang JH, Qin SW, Liu R, Pan JJ: Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. *Pediatr*, Sep;123(3):435-8, 1993.

Yazışma Adresi (Correspondence Address)

Doç.Dr. Kemal IRMAK
Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı, KONYA, TÜRKİYE
Tel: +90 332 2232741
Fax: +90 332 2410063
e-Mail: kirmak@selcuk.edu.tr