

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. KEMAL ALTAŞ

132 221

E.COLİ İLE SEPSİS MODELİ OLUŞTURULMUŞ  
SIÇANLARDA İMMÜN PROFİL VE KOMPLEMAN  
SİSTEMİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

ÜMİT ZEYBEK, MSc.

İstanbul - 2003

132221

12221

**Bu tez, „E.coli ile Sepsis Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda İmmün Profil ve Kompleman Sistemindeki Değişimlerin İncelenmesi“ başlığı altında T-914/06112000 sayılı tez projesi olarak İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'nca desteklenmiştir.**

## TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam sũresince desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Kemal ALTAŞ ve Prof. Dr. Turgay İSBİR'e, Molekũler Tıp ile Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dallarında ki çalışma arkadaőlarım, önemli bir zamanını, geceli gũndũzlũ, DETAE'nin laboratuvarlarında benimle çalıőarak paylaőan Dr. Bayram Kıran'a , Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Baőkanı Yard. Doç. Dr. Mutlu KũũK' e, tezimle ilgili uęraő verdiğim dönemlerde her tũrlũ kahrımı çeken sevgili eőim ve iki kızıma sonsuz **teőekkũrler...**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.ENFEKSİYONLAR VE SEPSİS</b>	
<b>2.2.SEPSİS PATOGENEZİ</b>	
<b>2.3.FARE PERİTONİT SEPSİS MODELİ</b>	
<b>2.4.SİTOKİNLER</b>	
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR</b>	
<b>3.2.ÇÖZELTİLERİN VE TAYİN YÖNTEMLERİNİN HAZIRLANMASI</b>	
<b>3.3.DENEY HAYVANI SEÇİMİ</b>	
<b>3.4.LPS DOZUNUN SAPTANMASI</b>	
<b>3.5.SEPSİS MODELİNİN VE DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI</b>	
<b>3.6.KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI</b>	
<b>3.7.HÜCREİÇİ IL-4 VE IFN-<math>\gamma</math> SİTOKİNLERİNİN TAYİN YÖNTEMİ</b>	
<b>3.8.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME</b>	
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.ÇALIMA GRUPLARININ BELİRLENMESİ</b>	
<b>4.2.HÜCREİÇİ IFN-<math>\gamma</math> VE IL-4 ORTALAMA DEĞERLERİ, ORAN KINETİĞİ VE SAĞKALIM SÜRELERİ İLE İLGİLİ VERİLER</b>	
<b>4.3.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME</b>	
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>58</b>
<b>6. ÖZET .....</b>	<b>68</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>70</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>72</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>73</b>

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis sendromu; hastanede tedavi gören hastalarda ölüm ve hastalığa yakalanma nedeni olarak, yaklaşık %40'luk ölüm oranıyla önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde yaygın olan tanımlamaya göre, ekseriya piyojen olan patojen bir bakterinin vücuda yerleştiği odaktan zaman içerisinde kan dolaşımına karışarak çoğalması ve vücudun buna karşı gösterdiği reaksiyon sonucu ortaya çıkan belirtiler septisemi olarak adlandırılmıştır.(1-11) Septisemide klinik belirtiler bakterinin cinsine göre değişmekle beraber, ortak özellikler mevcuttur. Sepsise, A grubu hemolitik streptokoklar, stafilokoklar, pnömokok, E.coli ve pseudomonas gibi bakterilerin neden olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur.(1-4, 6, 8-18)

Bu bakterilerden E.coli, gram (-) bakteriyemilerin en sık etkeni olup özellikle idrar yolu infeksiyonuyla kendini göstermektedir. Normal konak savunmasının yetersiz olduğu koşullarda E.coli'nin kana geçip bakteriyemiye yol açtığı belirtilmiştir.(1-3,5,8-15,17-20) Gram (-) bakteri hücre duvarı komponenti lipopolisakkaridin(LPS) başlıca tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1 (IL-1) gibi proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonuyla sepsisin tüm patofizyolojik reaksiyonlarını indüklediği rapor edilmiştir.(4,19-41)

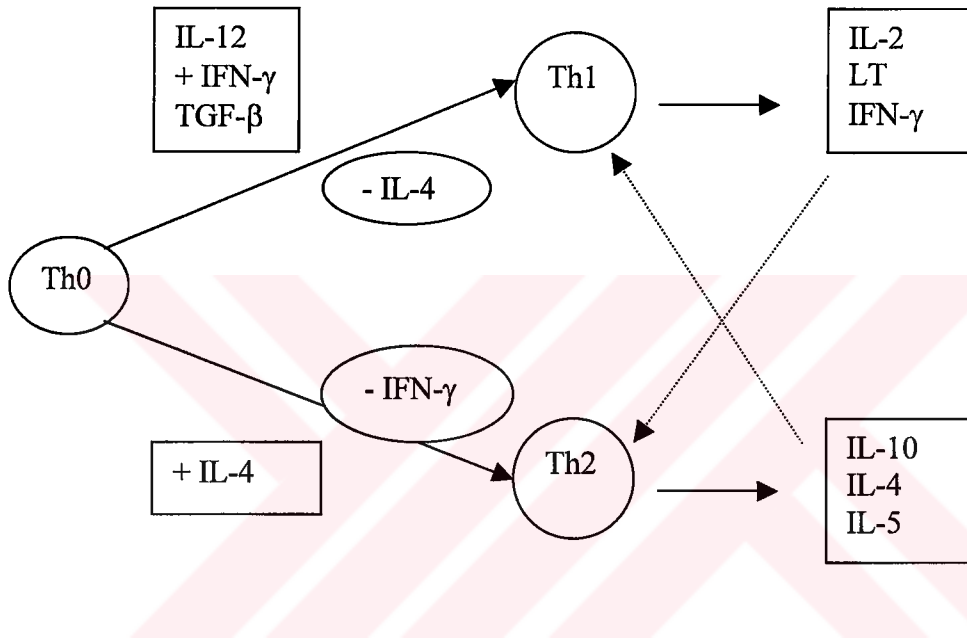
Günümüze dek yapılan araştırmalarda, sepsisteki sistemik inflamatuvar cevap sendromunun (SIRS), başta TNF- $\alpha$ , IL-1, interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve interlökin-12 (IL-12) gibi proinflamatuvar sitokinler olmak üzere, artmış oranda salgılanan endojen mediatörler sonucu oluştuğu gösterilmiştir.(23,24,27,30,42-44) SIRS etyopatogenezinde başrolü oynayan endotel hücrelerinin, aktive yardımcı T ( T-helper,  $T_H$  ) hücrelerinden salgılanan interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) etkisiyle, mononükleer fagositlerden salgılanan IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  sitokinleri sonucu aktive olduğu kanıtlanmıştır.(45)

Naif  $T_{H0}$ -hücreleri antijenik uyarıyla beraber IL-12 ve interlökin-4 (IL-4) sitokinlerinin etkisiyle  $T_{H1}$  ve  $T_{H2}$  olmak üzere iki ayrı alt gruba ayrıldığı gösterilmiştir.(Şekil.1)(29,46,47)

$T_{H1}$ -lenfositleri interlökin-2 (IL-2), IFN- $\gamma$  ve tümör nekroz faktör- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) salgılayarak hücrel immün cevabın başlamasını indüklerken, $T_{H2}$  lenfositlerinden IL-4, interlökin-5 (IL-5), IL-6, interlökin-10 (IL-10) ve interlökin-13 (IL-13) sentezlenmektedir. Söz konusu iki grup  $T_H$  lenfositin de salgıladıkları sitokinlerin etki mekanizmalarının özelliklerinden dolayı, antagonistik olarak immün cevabın düzenlenmesinden sorumlu oldukları bulunmuştur. Hücrel immünitinin yanısıra sepsis etkeni olan mikroorganizmalara karşı kompleman sisteminin de önemli sorumluluklar yüklendiği açıklanmıştır.(Şekil 2)(19,36-39,48,49)

Proinflamatuvar sitokinlerin periferik sirkülasyonda yarılanma ömürlerinin son derece kısa olması ve kanda çözünür TNF reseptörleri , IL-1 antagonisti gibi doğal inhibitörlerin bulunması nedeniyle sadece kan düzeylerinin araştırılmasının yanıltıcı sonuçlara yol açtığı düşünülmektedir.(19,36,49-55) Bu nedenle, son yıllarda sepsisli olgularda yapılan çalışmalarda özellikle periferik kan lenfositlerindeki (=PKL) intrasitoplasmik sitokin düzeyleri araştırılmış ve yüksek düzeylerde IL-8 sitokin bulunduğu saptanmıştır. İmmün sistemde  $T_{H1}$  mi yoksa  $T_{H2}$ mi reaksiyonların etkili olduğu araştırılmış ve T lenfositlerindeki intrasitoplasmik IL-4 ve IFN- $\gamma$  düzeylerinin saptanmasının daha anlamlı olacağı rapor edilmiştir.(1,48,50-53,56-65)

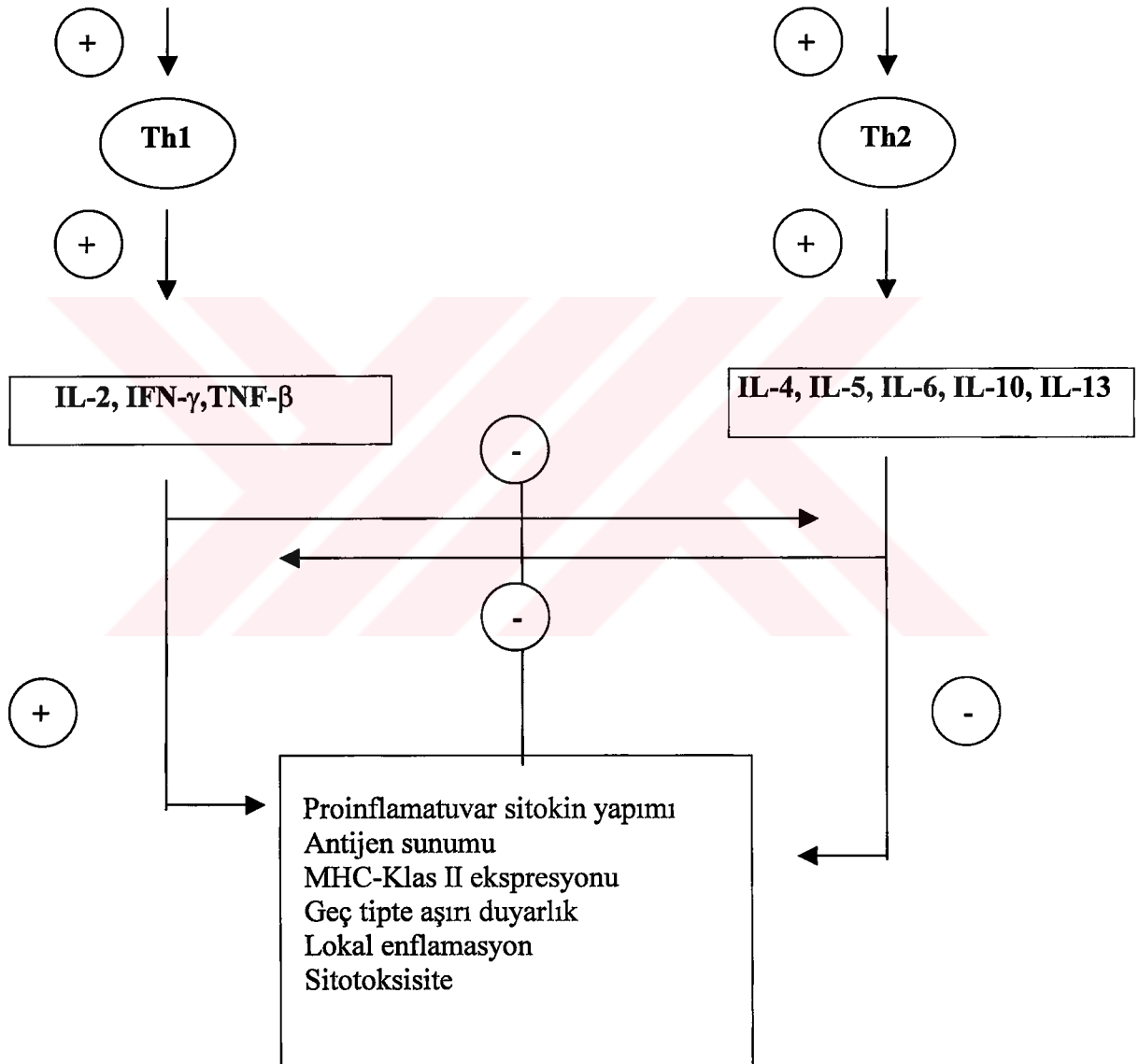
IL-12'nin gram (-) ve (+) mikroorganizmalara karşı gelişen immün cevapta IFN- $\gamma$  salgılanmasını, ve dolayısıyla sitotoksik T lenfositleri ve NK sitotoksitesini artırarak anahtar rol oynadığı görüşü ileri sürülmüştür.(56-63,66) Ancak aşırı IL-12 düzeylerinin hayvanlarda ölümcül etkilere yol açabileceği görüşü değişik literatürlerde rapor edilmiştir.(48,64,67)



**Şekil.1.Th1 ve Th2 Sitokin Profili**

Akut HVGD  
Kontakt dermatit  
Hücre-içi mikrobik infeksiyonlar  
Organ-spesifik otoimmünite  
Romatoid artrit

GVHD  
Allograft akseptansı  
Allerjik hastalıklar  
Gebelik  
HIV infeksiyonu  
Kızamık  
Primer helmint infeksiyonu  
Sistemik lupus eritematous



Şekil .2. TH1 ve TH2 fenotipleri arasında çapraz inhibisyon ve dominant fenotipe göre ortaya çıkan etkiler



Çekum ligasyonu-ponksiyonuyla oluşturulan sepsis modelinde ve neonatal septik kemirgenlerde IL-12 nötralizasyonu hayvanlardaki ölüm oranını artırırken; diğer sepsis modellerinde bu oranının azaldığını gösteren araştırmalar mevcuttur.(12,19,22,41,46,54,60,62,63,67-82) Ancak IL-12'nin ise bazı sepsis modellerinde ölüm oranını azalttığı ve IL-12 tedavisi sonrası düşük olan IFN- $\gamma$  düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde TNF-  $\alpha$  , IL-1 ve IL-12 gibi sitokinlerin etkilerini bloke eden , hücrel immünite üzerine baskılayıcı rol oynayan anti-enflamatuvar bir sitokin olan IL-10'nun deneysel oluşturulan sepsis modellerine olan etkilerinin çelişkili olduğu görüşünü destekleyen açıklamalar mevcuttur.(22,54,66,67,69,71,72,74,76,83-87) LPS ile oluşturulan sepsis modelinde IL-10 uygulanması hayvanlardaki yaşam süresini artırırken, diğer modellerde bu etkinin gözlenmediği bildirilmiştir.(22,36,37,41,46,48,54,56,62,64,66,67,69-72,74,76,83-101)

Aslında gerek insanlarda yapılan çalışmalarda, gerekse hayvan modellerinde septik uyarı sonucu hem IL-12 gibi proenflamatuvar, hem de bunların aşırı zararlı etkilerini modüle etmek için antiproenflamatuvar IL-10 gibi sitokinlerin salgılanmasının indüklendiği; bu dengenin bozulması durumunda ise multiorgan yetmezlikleriyle ölüm oranının arttığı düşünülmektedir.(1,6,8-11,14,17,18)

Çalışmada amacımız, E.coli hücre duvarı komponenti olan LPS ile oluşturulmuş endotoksik şok sendromu modelinde, intrasitoplasmik IFN- $\gamma$  ve IL-4 tayiniyle  $T_{H1}$  ve  $T_{H2}$  oran kinetiğinin belirlenmesi,  $T_{H1}$  ve  $T_{H2}$  oranlarında anahtar rol oynayan IL-12 veya IL-10 uygulanmasıyla bu oranların ve hayvanlardaki ölüm yüzdelerinin ne oranda değişeceğinin saptanmasıdır. Diğer yandan elde edilecek sonuçların, özellikle  $T_{H1}$  ve  $T_{H2}$  olmak üzere, her iki tip sitokin profilinin gelişmediği öncelikle septik anejrik hayvan modellerinde ve daha ileri dönemlerde hastalarda yapılması düşünülen immünoterapötik girişimlerin uygulanmasında, gerek monitörizasyon gerekse terapötik etki açısından yol gösterici olacağı görüşünden hareket ederek bu çalışma planlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. İnfeksiyonlar ve sepsis**

İnsanlar, hayvanlar ve bitkiler yaşayan diğer varlıklardan mikroplar ile sürekli ilişki halindedir ve mikroplara konaklık ederler. Meydana gelen bu karşılıklı ilgi sonucunda mikrobun konağın direncini ve bağışıklığını yenerek onun vücuduna girmesi, yerleşmesi, üreyebilmesi, zararlı etkisini göstermesi ve ayrıca konak canlıının da buna karşı reaksiyona devam etmesi ile infeksiyon hastalığı gözlenmektedir.(1,6,8-11,17,18,102)

İnfeksiyon hastalıkları dışarıdan vücuda alınan mikroplarla oluşabileceği gibi vücutta mevcut mikroplar etkisiyle de gerçekleşebilir. Söz konusu hastalık grubu, klinik belirtilerine, epidemiyolojisine, patoloji anatomisine, hastalığı bulanın adına ve hastalığın etkenine göre olmak üzere değişik şekillerde isimlendirilmektedir.(1,8-11,17,18,41,102)

Yukarıda bahsedilen özellikler, virus, riketsiya, mantar, protozoon ve helmint kaynaklı infeksiyonlar kadar bakterilerle oluşan infeksiyon hastalıkları için de geçerlidir.

Diğer yandan çeşitli infeksiyon etkenlerinin konak ile kurdukları biyolojik etkiler şu şekilde sınıflandırmak mümkündür;

- 1- Mikroorganizma konakta ürer, ancak klinik hastalık oluşturmaz.  
(subklinik veya inaparan infeksiyon)
- 2- Mikroorganizma konakta ürer, kısa veya uzun bir inkübasyon sonrası histopatolojik hasar yaparak hastalık oluşturur.(klinik infeksiyon)
- 3- Mikroorganizma hücre içinde belirgin bir süre üreme göstermeden uzun süre canlı kalabilir.(latant infeksiyon)
- 4- Mikroorganizma hücre genomuna eklenebilir ve uzun sürede, maligniteye sebep olabilir.(tümör oluşumu)

Ayrıca infeksiyon etkenlerinin konak canlı ile kurdukları biyolojik etkileşim sonucunda hastalık yapıcı bu mikroorganizmaların hastalık oluşturma mekanizmaları ise genel olarak şu başlıklar altında nitelenebilir ;

1-Sentezledikleri toksik ve enzimatik materyal aracılığıyla hasar yaparak yayılırlar. (invazif etkenler)

2-Organizmaya girdikleri yerde, sentezleyip sekrete ettikleri spesifik ekzotoksinleri ile etkili olurlar. (non invazif etkenler)

3-Aşırı duyarlılık reaksiyonları oluşturarak hasarlayıcı ve hastalık yapıcı etki gösterirler.

4-İmmünosit fonksiyonlarını bozarak, immün yetmezlik oluştururlar ve bu zeminde çeşitli etkenlerin geliştirdiği infeksiyonlara neden olurlar.

5-Hiç bir organik hasar oluşturmaksızın sadece bazı hücrelerin fonksiyonunu değiştirebilirler.

Yukarıda bahsedilen özellikler, virus, riketsiya, mantar, protozoon ve helmint kaynaklı infeksiyonlar kadar bakterilerle oluşan infeksiyon hastalıkları için de geçerlidir.

Bakteriler doğada çok yaygın olarak bulunurlar ancak bunların bir kısmı insan vücuduna yerleşip hastalığa yol açabilirler. Hastalık yapabilecekleri dokulara yapışıp buralarda çoğalmaları için bakteri yüzeyindeki ligandlarla konak hücre üzerindeki reseptörlerin etkileşime girmesi gerekir. Bakteriler insan vücudunda esasen toksinleriyle, enzimleriyle, zararlı olan metabolizma ürünleriyle ve antijenleri ile hastalığa neden olurlar. Bakterinin gücü ve sayısı oranında hastalık şiddeti değişir.(1,8-11,17,18) Bakterilerin konak direncini etkisiz hale getirmek için oluşturdukları aggressinler arasında salgı IgA'sını zarara uğratan IgA proteazı, normal serumun bakteri öldürmesinde rol oynayan demir bağlayıcı siderofiller (E.coli' deki enterobactin), bir çok bakteri de fagositoza karşı koyan polisakkarit kapsül, protein A, polipeptid kapsül,M proteini, K polisakkaridi (E. coli) ve lipopolisakkaritler gösterilmektedir.(1,8)

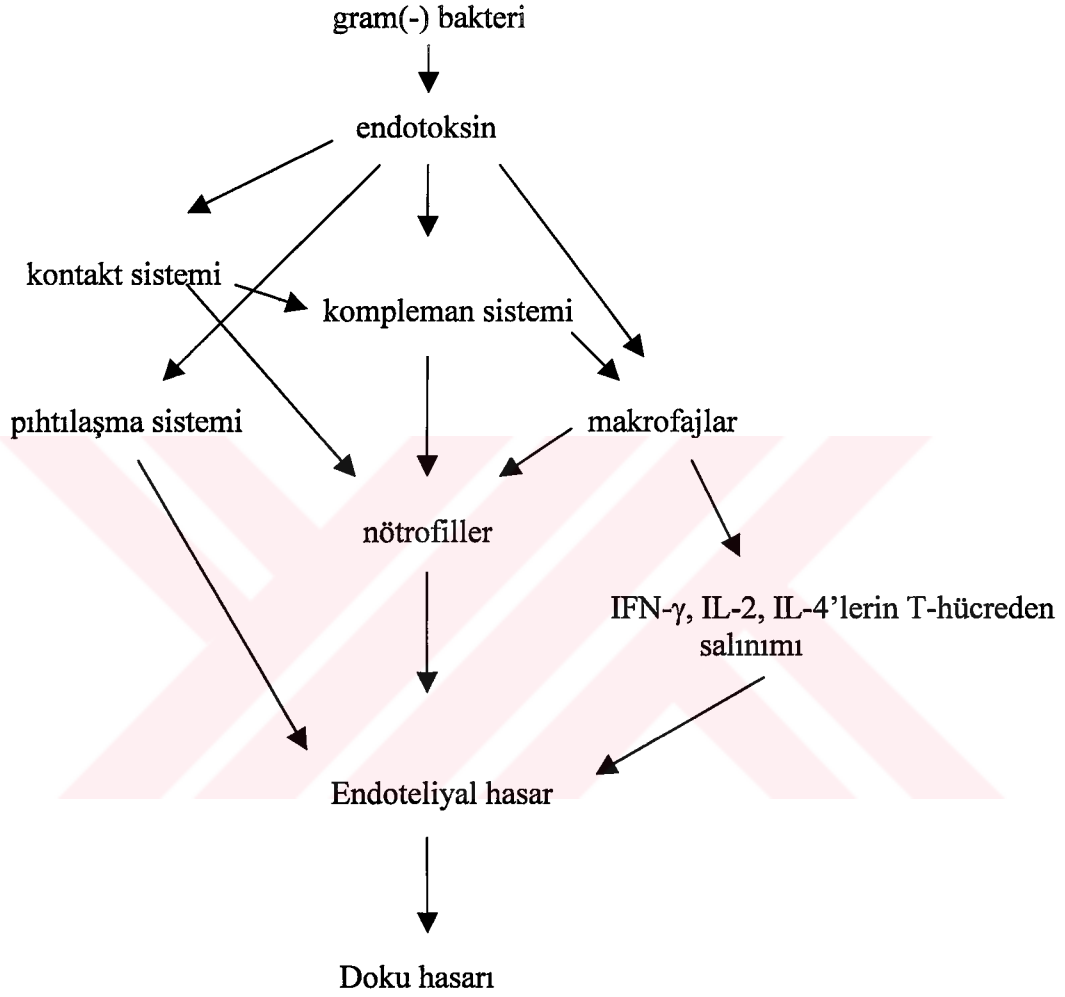
Genellikle piyojen özellikte bakterilerin yol açtığı infeksiyonlardan olan sepsisi Schottmüller, “vücutta gelişmiş bir odakta mikropların sürekli olarak veya zaman zaman kan dolaşımına geçtiği ve böylece subjektif ve objektif bir takım hastalık belirtilerine sebep olduğu durum olarak” tanımlamıştır. Bazı araştırmacılara göre ise sepsis ağır bakteriyemi ile birlikte görülen klinik sendrom olarak adlandırılmaktadır.(1,8) Son yıllarda ise “genellikle piyojen olan patojen bir bakterinin vücuda yerleştiği bölge dışında sık aralıklarla kan dolaşımına karışarak çoğalması ile konak canlıının buna karşı gösterdiği reaksiyon etkisinde meydana gelen belirtilerle tanımlanan, ayrıca bakterinin cinsine göre değişen klinik bulgulara sahip olmasına karşın ortak değerleri de içeren hastalık septisemi olarak tarif edilmiştir.” tanımlaması ağırlık kazanmıştır. (3,4,19,41)

Sepsis, A.B.D.’ de yılda ortalama 100.000 ölüm vakasına sebep olması nedeniyle, özellikle son zamanlarda, yoğun bakım ünitelerinde görülen en yaygın infeksiyonlardandır. (2,3,19,29,103)

Sepsiste doku ve organ fonksiyon bozukluklarına yol açan ağır ve sistemik bir infeksiyon söz konusudur. Eğer sıvı tedavisine cevap vermeyen bir hipotansiyon gözlenirse septik şok gelişir ve seyri ağırlaşır. (4,5,11,15,21,28,29,31,34,35,37,41,70,96,104,105)

Gram (-) bakterilere bağlı bakteriyemi olgularında septik şokun görülme sıklığının oldukça yüksek olması (%25 civarı) ve endotoksinin yalnız gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunmasından dolayı bu tabloya endotoksik şok ismi de verilmektedir.(Şekil.3.)(4,11,28,29) Hastalık etkeni olan gram (-) bakteriler arasında öncelikle; Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Proteus gibi enterik çomaklar ile pnömokok, meningokok, gonokoklar ve bakteroidler olduğu gösterilmiştir.(1,8-11,17,18)

Diğer yandan sepsis nedeni gram (+) bakterilerde ise septik şok görülme sıklığının %10 olabileceği bildirilmektedir.Ancak metastatik yayılma komplikasyonları daha fazladır. Gram (+) sepsisin başlıca etkenlerinin,



**Şekil.3.Gram (-) sepsisin(endotoksik şok) immuno-inflamatuar akış şeması**

A grubu hemolitik streptokoklar, enterokoklar ve stafilokoklar olduğu gösterilmiştir.(1,8-11,16-18,102)

Hastalık yapıcı mikroorganizmalardan E.coli, gram (-) bakteriyemilerin en çok görülen etkenidir. Özellikle idrar yolu infeksiyonuyla kendini gösteren E.coli, konak savunması yetersizse kana geçip bakteriyemiye yol açar.

(Tablo.1)(1,4,8-11)

### **Tablo. 1**

#### **E. coli ile ilgili özellikler:**

1-1-3 / 0.6 µm. büyüklüğündedir.

2-Adi besiyerinde 15 – 46 °C 'de ürer.

3-Glikozdan asit ve gaz yapar, genellikle laktozu da parçalar.

4-Bazılarında kapsül vardır.

5-İnsan barsağında bulunur.

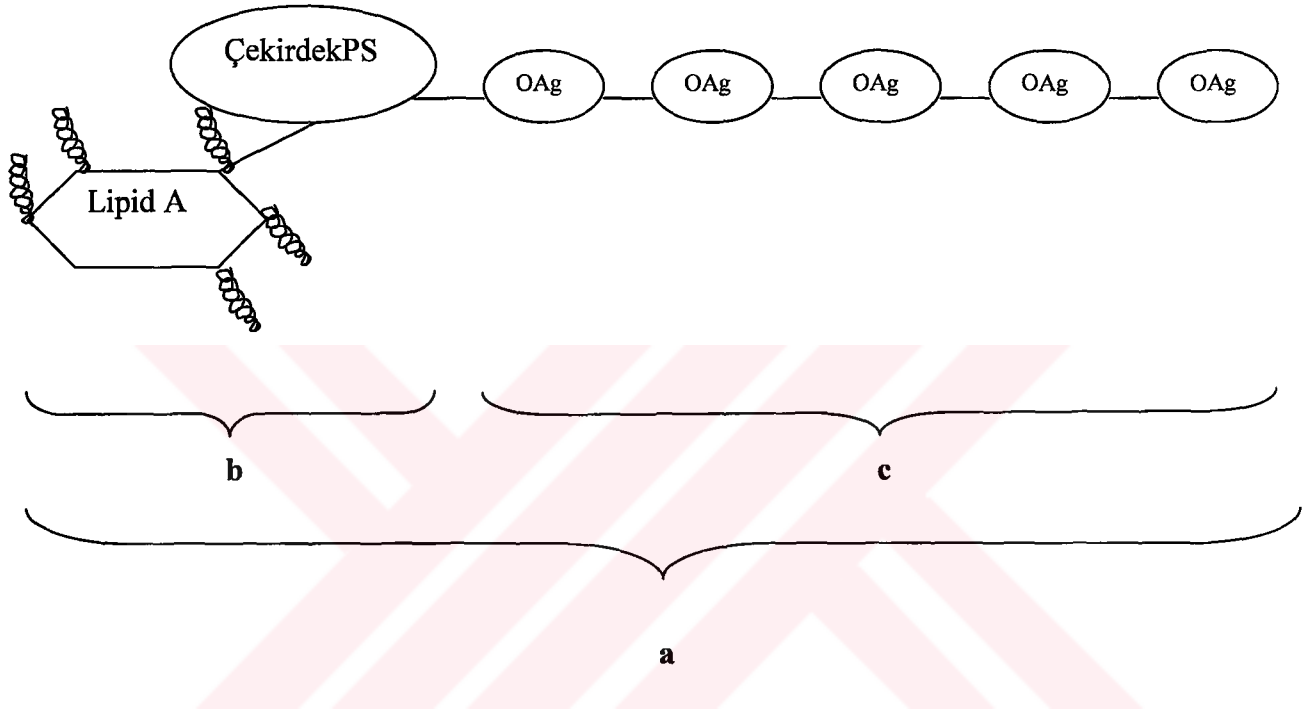
6-E.coli, ya barsağı enterotoksinle hastalandırır veya saldırarak enfekte eder.

7-İdrar ve safra yolları infeksiyonları, peritonit, apendisit ve sepsis gibi hastalıkların etkenidir.

8-Endo ve McConkey gibi uygun besiyerlerine ekilir ve burada üreyen laktozu parçalayan kolonilerden saf kültür elde edilip biyokimya ve antijen özellikleri incelenerek tanımlanır.

Endotoksik şok ile sepsise yol açan endotoksinler, bakteri duvarı lipopolisakkaridleridir (LPS). (Şekil 4) Ayrıca gram (+) koklar (pnomokok ve streptokok gibi), toksik şok sendrom toksini-1, gibi gram (+) bakteri toksinleri üreterek benzer sendromlara yol açarlar.(1,4,8-11,17,18,102)

Bakteriyal LPS veya endotoksin, makrofajların mevcut aktivatörü gibi nitelenebilecek gram (-) bakteri duvarının karma bir parçasıdır. Sistemik veya lokal enflamasyonu indükler. Lipopolisakkarid (LPS), çeşitlilik gösteren



**Şekil .4. Endotoksin yapısı**

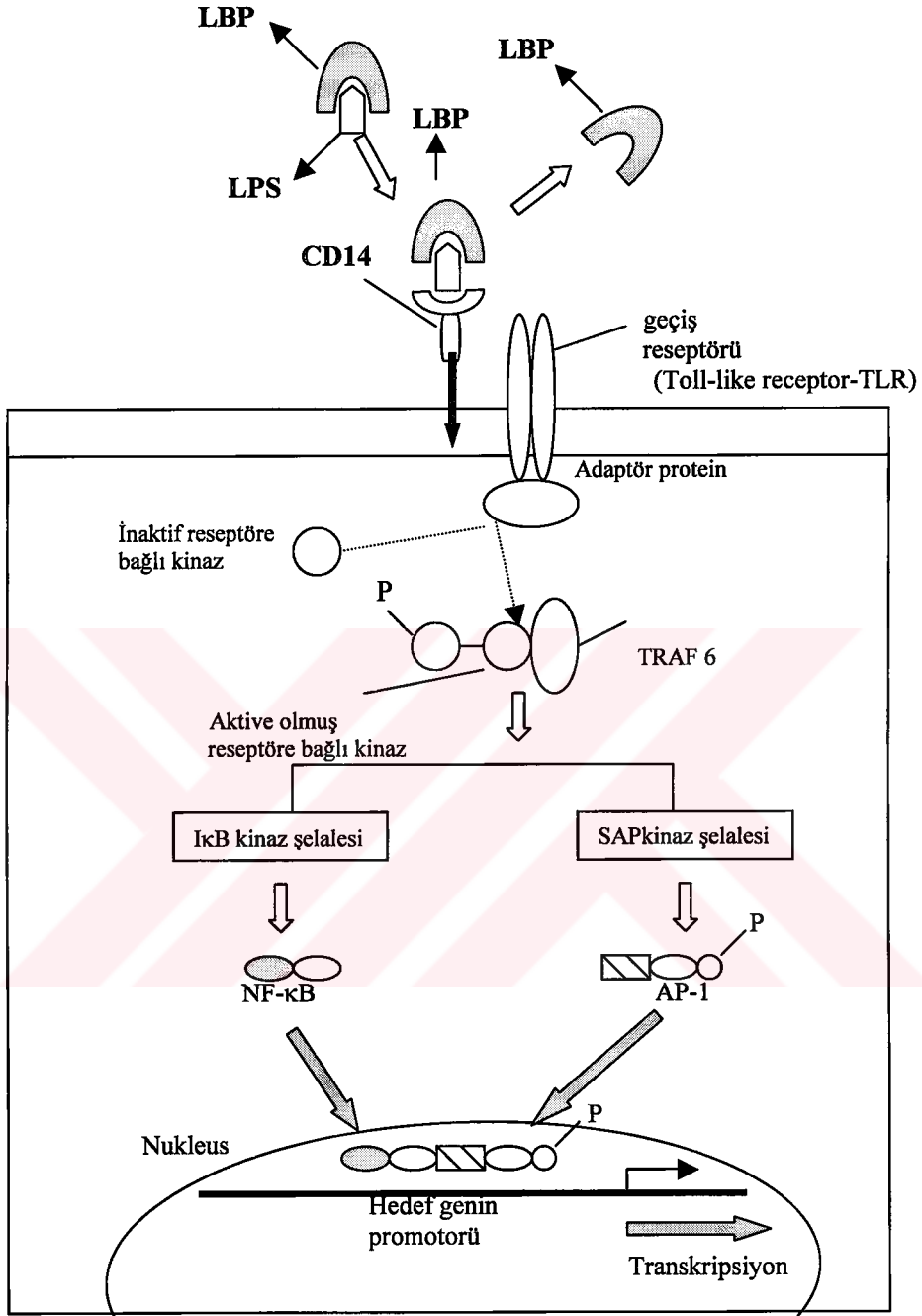
- a. Lippopolisakkarid**
- b. “Glikolipid çekirdek”, Polisakkarid kısım(R-antijen) v e bir lipid parçası.**
- c. Polisakkarid yan zinciri, tekrarlayan bölümlerden oluşan terminal serisi(O-antijen).**

bir polisakkarid zincir (O-antijeni) ve buna kovalent olarak oligosakkarid uzantı ile bağı bir lipid A parçasından oluşur.(kompleks bir polisakkarid kabuk ). Oligosakkarid önemli oranda korunmuşken, lipid A yüksek oranda muhafaza edilmiştir. Korunmuş yapılarından dolayı oligosakkarid ve lipid A birlikte düşünülüp glikolipid çekirdek şeklinde de adlandırılmaktadır.Diğer yandan lipid A, LPS'nin toksik bölümüdür. (4,17-18,21,28,29,36)

Septik şokun tüm hemodinamik ve metabolik olayları LPS'nin yarattığı infeksiyonla tetiklenir. LPS dolaşıma geçtiğinde dolaşımda bulunan protein kompleksleri ve lipoproteinler hem infeksiyona karşı enflamatuar cevap hem de LPS'nin toksik etkisinin giderilmesinde ve temizlenmesinde rol oynarlar. LPS formları serumdaki LPS bağlayan protein (LBP) ile kompleks oluşturur ki bunlar CD 14 reseptörlerine, endotelial hücrelere ve diğer hücre tiplerine sıra ile bağlanırlar.(Şekil.5)(4,5,21,25,28,29,31-33,36,38,39,41,104,106-111)

Bu bağlanmalarda transmembran proteinleri, sinyal reseptörü gibi işlev yaparlar. Bunlara "Toll" reseptörler denir. Değişik sınıflara ait patojenlere karşı cevap sinyalini başlatmakta etkilidirler. Memelilerde bulunan Toll-like reseptörler, TLR-4 , şeklinde adlandırılır. LPS bağlayan protein (LBP) ile LPS'nin oluşturdukları yapının, reseptör proteini CD14 ile birleşmesi bir hücre cevabını tetikler. Ancak bu üçlü kompleksin (CD14 ve ona bağı LBP:LPS ligandı) TLR-4 ile birleşmesiyle, TLR-4, transkripsiyon faktörü NFκB'yi aktive edecek sinyali nukleusa gönderir. Yani LPS ve TLR-4 arası temas sonucunda bir sinyal transdüksiyonu ortaya çıkmaktadır. Toll reseptörlerinin başlattığı metabolik kademeler ile NFκB'nin aktivasyonu, sitokin ve kemokin gibi doğal immünitinin önemli mediyatörlerinin üretimine neden olur. Aynı zamanda Toll sinyali ile kazanılmış immün cevabın indüksiyonu için esas teşkil eden molekülleri de aktive eder. Burada dikkat çekici önemli bir nokta, TLR-4'ün LPS'ye özgü algılama özelliği





**Şekil. 5.**Lipolisakkaridle oluşan sinyal kademeleri

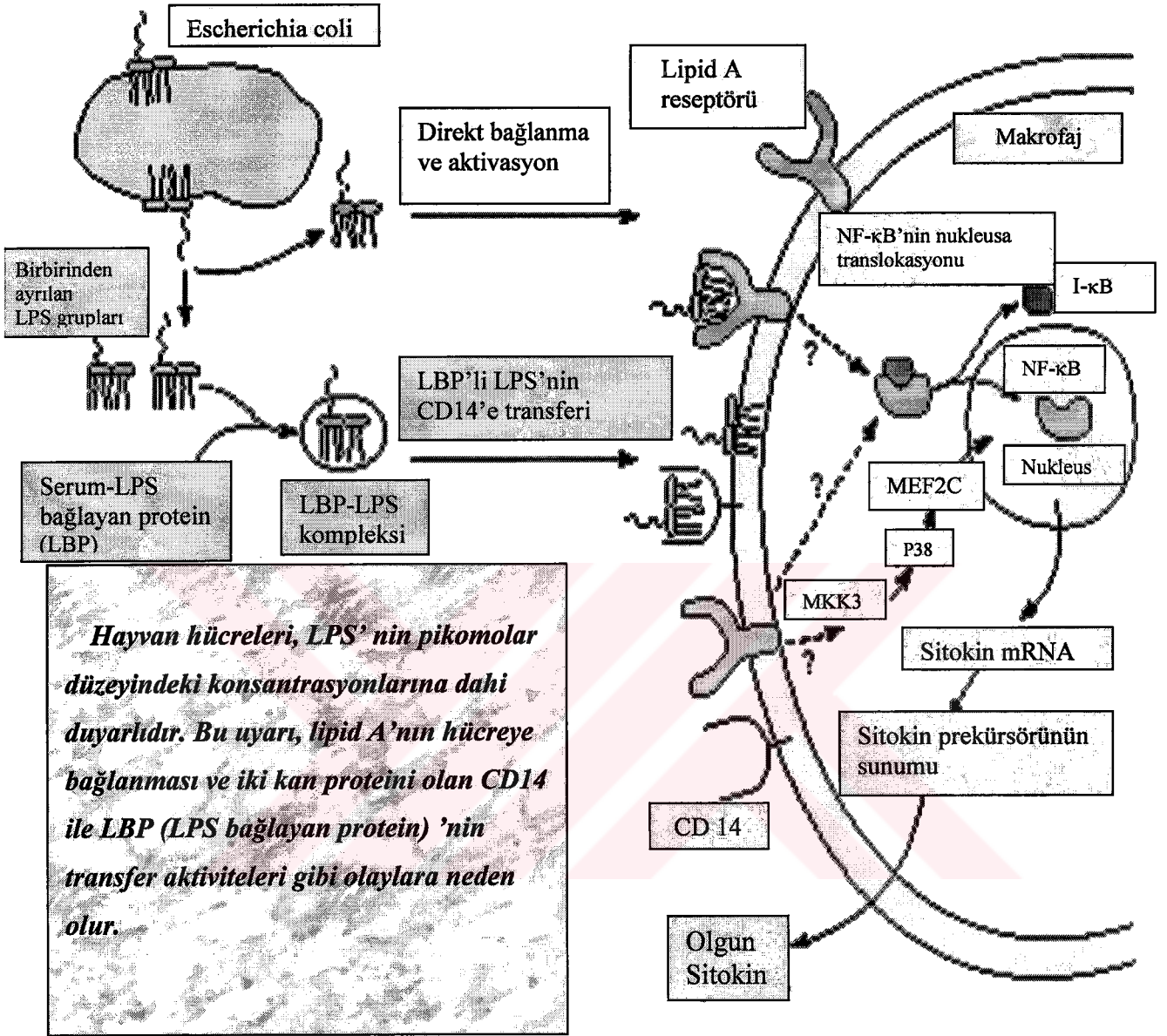
gösteren bir reseptör olduğudur.(28,31,33,101,107-109,111)

LPS-LBP-CD14-TLR-4-NFκB beşlisinin aktif rol aldığı reaksiyon kademelerinden sonraki aşamada LPS'nin organizmayı direkt veya indirekt olarak, iki yolla etkilediği belirtilmiştir. Şekil.6. (32-36,101,104)

Direkt olarak, hücre hasarlarına yol açarak veya hücrelerin fonksiyonlarını değiştirerek etkili olurlar.

İndirekt yolla ise, plazma veya çeşitli hücrelerden (monosit, makrofaj, nötrofil, endotelial hücreler ve diğerleri) kaynaklanan mediatör şelasenin sentezi, salınım veya aktivasyonunun başlatılması ile işlev kazanırlar ve bu mediatörler sıra ile organ sistemlerinin bir kısmına etki ederler. Tablo.2'de etkilenen doku ve organlar ile gözlenen değişiklikler belirtilmiştir.

Ayrıca indirekt yolun içinde yer alan ve yaptıkları etkiler ile septik şokun gelişiminde rolü olan endojen mediyatörler ise Tablo.3' te görülmektedir.



**Şekil.6. Hayvan hücrelerinde sinyal transdüksiyonunun CD-14' e bağlı olan veya olmayan aktivasyonu.**

**Tablo. 2**

<u>Etkilenen Organ Sistemi</u>	<u>Görülen Etki</u>
<u>Kalp</u>	Miyokardiyal disfonksiyon
<u>Vaskular sistem</u>	Vazodilatasyon ve hipotansiyona yol açan
<u>Mikrosirkulasyon</u>	Endotelial hasara ve aktivasyona ilerleyen, lökosit agregasyon ve adhezyonu da gözlenen
<u>Koagulasyon sistemi</u>	DIC ile neticelenen
<u>Akciğerler</u>	Akut respiratory distress sendromuna (ARDS) doğru ilerleyen.
<u>Karaciğer</u>	Karaciğer yetmezliği ile sonuçlanan
<u>Böbrek</u>	Akut böbrek yetmezliğine neden olan
<u>Merkezi Sinir Sistemi</u>	Koma ile sonuçlanan

### **Tablo. 3**

---

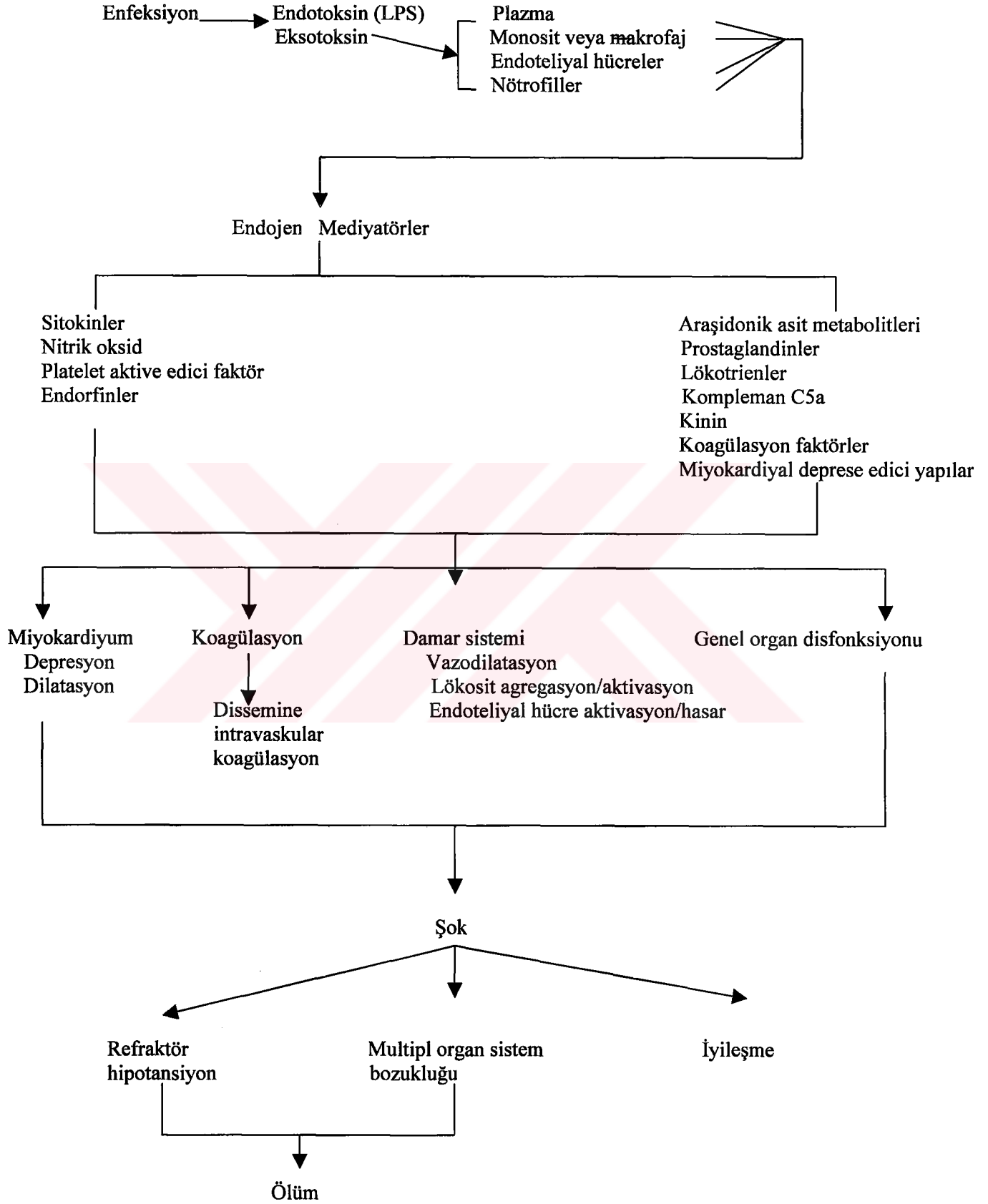
**Endojen Mediatörler:** (Şok ile devam eden tabloya yol açan mediatörler)

- \* Sitokinler (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8)
- \* Platelet aktive eden faktör
- \* Nitrik oksid
- \* Kompleman sistemi
- \* Prostaglandinler
- \* Lökotrienler
- \* Kinin sistemi
- \* Oksijen metabolitleri
- \* Katekolaminler
- \* Endorfinler
- \* Miyokardiyal depresan faktör

---

Bu mediyatörlerin septik şok ile ilişkisini söylemek diğer mediyatörlere göre daha geçerlidir, ayrıca bunların bir kısmı insanlara uygun yöntemle dayanan hayvan çalışmaları ile ortaya konmuştur. (13,19,21,25,27,30,41, 60, 66,70,92-94,103,106,112-116)

Bununla birlikte endotoksin kaynaklı aktivasyon, mononuklear fagosit sistemi ve IL-1 ile TNF- $\alpha$ 'nın rol aldığı septik şok patogenezinde anahtar rol oynamaktadır. Sepsiste etkili olan sitokinlerin endotelial aktivasyon, lökosit adezyonu ve agregasyonuna yol açtığı, intravaskular koagülasyonu başlattığı, kapiller trombozu tetiklediği gösterilmiştir.(Şekil.7.) (13,21,25,30,43,60,94,113,117)



**Şekil. 7. Septik şoktaki olayların patogenetik aşamaları.**

Tabloda görülen prostoglandinler, platelet aktive eden faktör ve nitrik oksidi içeren grup sekonder sinyal mediatörleridir. Sepsisin gelişiminde etkisi olan mediyatörler daha sonra sıra ile vazodilatasyon ve diğer proenflamatuar etkilere neden olurlar. Gerçekten endotoksinlerin metabolik ve hemodinamik etkilerinin çoğu IL-1 veya TNF- $\alpha$  'nın infüzyonu ile tetiklenebilmektedir ki laboratuvar hayvanlarında bu sitokin kombinasyonu daha detaylı çalışılmıştır. Bu durumun aksine, TNF- $\alpha$  veya IL-1 reseptör antagonistlerine karşı antikorların yönetimi veya TNF- $\alpha$  reseptör eksikliği, hayvanlarda ve insanlarda ki septik şoka karşı koruyucu etki yapmaktadır. Diğer yandan biyolojik aktif mediyatörlerin salınımı ile bakteriyal toksinler hücre ve dokulara hasar verirler. Septik şokta subnormal arteriovenöz oksijen farklılıkları sık sık not edilmiştir. (4,19-41,60,61,65,118-120)

Son yıllarda hematolojik ve diğer habis hastalıklarda tedavi olanaklarının artmasına paralel, polimikrobik septisemi ve fungal sepsis oranının da artışlar gözlenmektedir.(77,118,121,122)

En sık karşılaşılan hastane infeksiyonlarından sepsis, deri, üriner sistem, akciğer ve yumuşak doku infeksiyonlarının hemen arkasında yer almaktadır. Özellikle cerrahi girişimler, kateterizasyon, drenaj tübü takılması, siroz, diabetes mellitus, lösemi, lenfoma, kanser kemoterapisi gibi müdahale ve hastalıklar sepsis riskini arttırmaktadır. (35,37,44,46,105,122,123)

Sepsise neden olabilecek bakterinin konak organizmaya giriş yeri bakterinin cinsine göre değişir. Piyojen bakteriler genellikle deri, burun, boğaz, ürogenital, ortakulak gibi yolları kullanırlar. Ürogenital veya gastrointestinal giriş kapısı kaynaklı infeksiyonlar çoğunlukla gram (-) sepsise yol açarken, deri ve yumuşak doku girişli infeksiyonlar gram (+) bakterilerle ilgilidir. Primer odak, ya giriş yeri bölgesinde oluşur veya lenf yolları ve kan yolu ile giriş yerinden uzak kısımlara giderek buralarda gözükür. Primer odak bölgesinde lokal savunma mekanizması yetersiz kalırsa ve trombofilebit meydana gelirse sepsis ortaya çıkar. (1,8-11,16-18,105)

## **2.2. Sepsis Patogenezi**

Sepsisin patogenetik aşamalarını septisemi ve septik şok olarak ikiye ayrılarak incelenebilir.

### **2.2.1. Septisemi:**

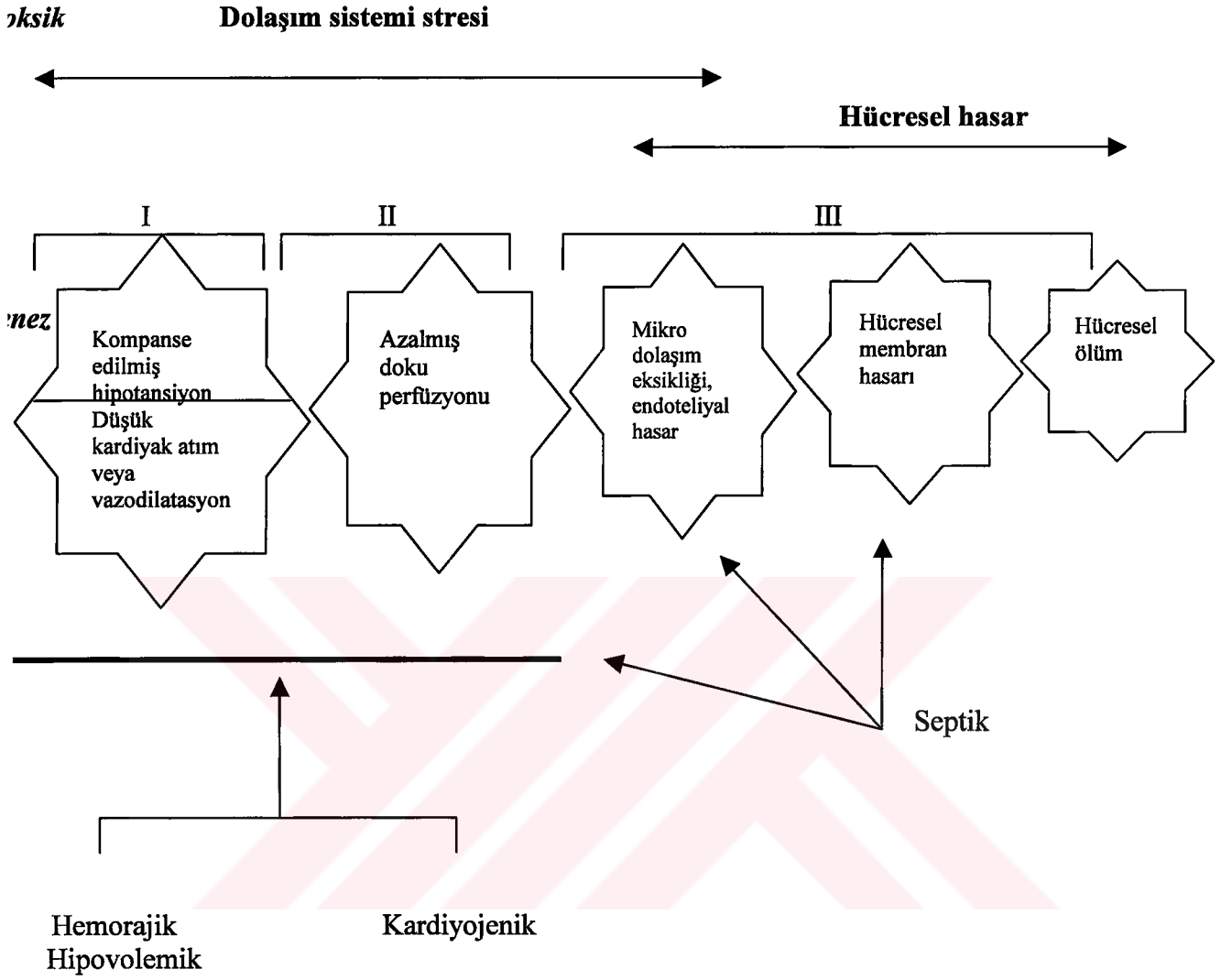
Kandaki patojen organizmaların organlara yerleşmesi ve sekonder abselere yol açmasıdır. Bu dönemde kardiyojenik, nörojenik şoklar ile gastrointestinal sistemde ve peritonda sıvı veya kan birikmesi sonucu hipovolemik şoklar gözlenmektedir. Ortaya çıkan bu tablo bir anlamda septik şoka zemin hazırlamaktadır. Bu durumun belirmesine yol açan metabolik olaylar esnasında konak canlıının patojen mikroorganizmaların uzaklaştırılmasına yönelik çabaları söz konusudur. Metabolik olaylar içinde; kompleman sistemi, pıhtılaşma sistemleri, ACTH-endorfin sistemi ve interlökinler ile tümör nekrozis faktörlerin aktivasyonu önemli yer tutmaktadır.(2,10,11,14,15,19,30,34,35)

### **2.2.2. Septik şok:**

Patojen organizmaların veya toksinlerin kan dolaşımına katılarak enflamatuvar, endokrin ve metabolik değişikliklere yol açması ile damarsal kollaps gelişimi ve doku perfüzyonunun bozulmasıdır.(Şekil.8)(2,10,19,79)

Yukarıda adı geçen olaylar sonrası, bakteriyemi veya fungeminin septik şoka ilerlemesi iki aşamada gerçekleşir; erken ve geç dönemler. Erken dönemde hipermetabolik değişiklikler baskın rol oynamaktadır. Bu tabloda ateş ve taşikardi gibi klinik veriler ön plana çıkmaktadır. Ayrıca sistemik





**Şekil 8. Endotoksik şokun fazları ve patogenez.**

vasküler direnç azalıp kalp debisinin arttığı, doku perfüzyonunda azalma olduğu, damar endotel hasarı sonucu kapiller dışına sızmanın fazlaştığı gözlenmektedir.(10,11,14,15,19,79,96,103,124,125)

Belirli bir aşama sonucu geç döneme ulaşırsa “multipl organ yetersizliği” sendromuna ait bulgular ortaya çıkar. Bu dönemde gastrointestinal sistem bozuklukları (kanama), karaciğer yetmezliği, akut böbrek yetmezliği, sıkıntılı solunum sendromu, kardiomyopati gibi hastalık tablolarından bir veya birden fazlası görülmektedir.(34,35,60,79,103)

### **2.2.3. Sepsisin Moleküler Mekanizması:**

Sepsisin gözlem tablosu açısından radikal değişime yol açan somut bir veri olarak, enflamasyon, koagülasyon ve fibrinoliz üçlüsünün doğal gelişiminin doğrudan etkilerinden bahsedilmektedir. Bunlar arasında yer alan enflamasyonun sepsisin gelişimi esnasında erken odaklanması, organ yetersizliğinin ilerlemesine hızlı ve baskın bir yönelim yaratır.(14,15,19,34,35,96,124,125)

Moleküler düzeyde düşünülecek olursa bir çok araştırmacı, koagülasyonun büyüklüğü ve fibrinolizin yaygınlığının sepsiste gözlenen endotelial fonksiyon bozukluklarıyla bağlantılı olduğunu ve homeostatik mekanizmanın dengesizleşmesine giden yolun tetiklenmesinde önemli bir başlangıç noktası şeklinde yer aldığını belirtmektedir. Bu dengesizlik yayılmış damar içi pıhtılaşma bozukluğu (DIC) mikrovaskular tromboz gibi oluşumlarla beraberdir ve belki de organ fonksiyon bozuklukları ile ölüme gidişte birinci derecede sorumlu olduğu kabul edilmektedir.(34,35,96,103) Sepsis patofizyolojisinde yukarıda adı geçen koagülasyon, fibrinoliz ve enflamasyonun ilerleme kademeleri kontrol edilememekte, iç dengenin bozulmasına yönelik gelişim engellenememektedir. İç denge siklusunun her

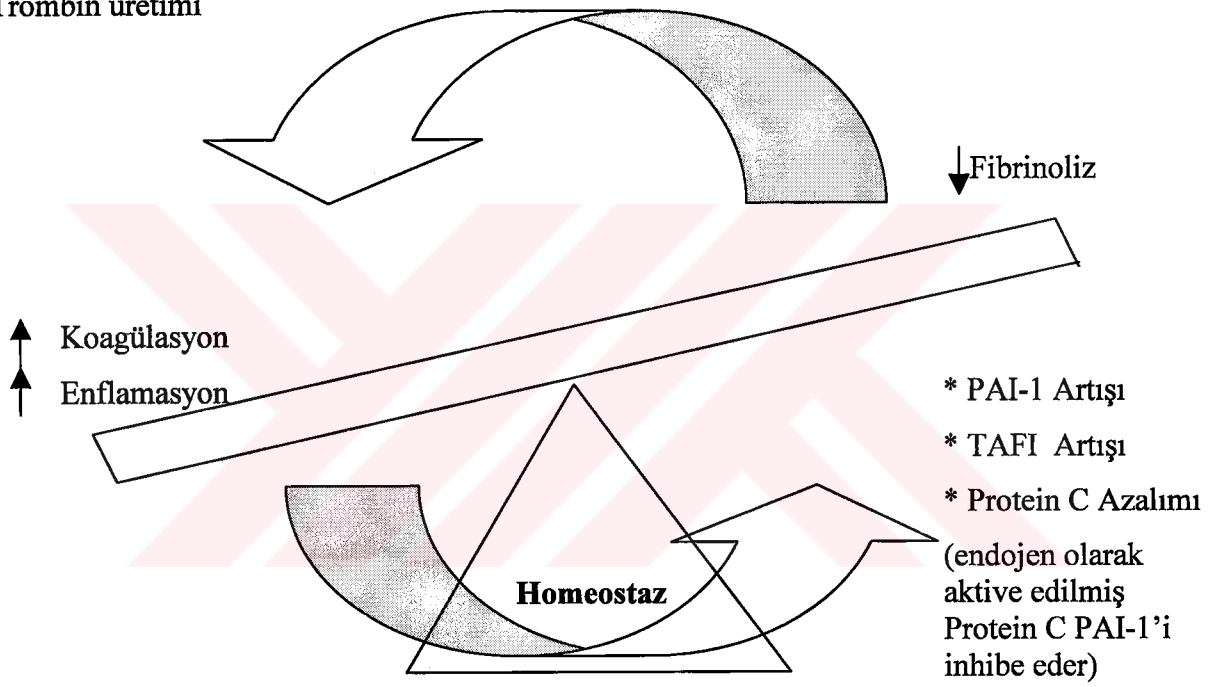
adımında otomatiksel genişleme mekanizması, koagülasyon anomalileri, enflamasyon ve endotelial hasarın hız artışına yardımcı olmaktadır. Konağın immün cevabı ile tetiklenen sepsis oluşum kademelerindeki her olay doğrudan vaskular endotelyuma hasar vermektedir. Subendotelial yapılar açığa çıkmakta ve kollajenazlar serbestleşmektedir. Endotelial hücreler doku faktörünü salmakta (TF), ekstrinsik koagülasyon kademeleri tetiklenmekte ve trombin üretimini hızlandırmakta ve homeostaz kaybolmaktadır.(Şekil.9) (34,35,79,124,125)

Nötrofil aktivasyonu ve nötrofil – endotelial hücre adezyonuna neden olan, enflamasyon şiddetini arttıran endotelial hasar, inflamatuvar sitokinlerin daha fazla sentezine yol açar. Bu inflamatuvar oluşum vaskular endotelial fonksiyon bozukluğunu şiddetlendirir. Mikrovasküler seviyede ortaya konabilen işlemler sonucunda organ fonksiyon bozukluğu ve yetersizliğine giden azalmış doku perfüzyonu ve hipoksemi gözlenmektedir. (10,34,35,79,96)

Sepsiste enflamasyon aktive edilir ve vücut bir enfeksiyona başlangıç cevabı esnasında pro-enflamatuvar elemanları indükler ve bu mediyatörler salınır. Salınan mediyatörler var olan veya oluşmaya yüz tutmuş hasara yol açan ajanlarla onarımın düzenlenmesi için çok yönden aşırı bir etkileşime girerler. Bunu takiben sekrete edilen tamamlayıcı antienflamatuvar cevap normale dönmektedir. (2,10,14,15,19,30,34,35,60,79,124)

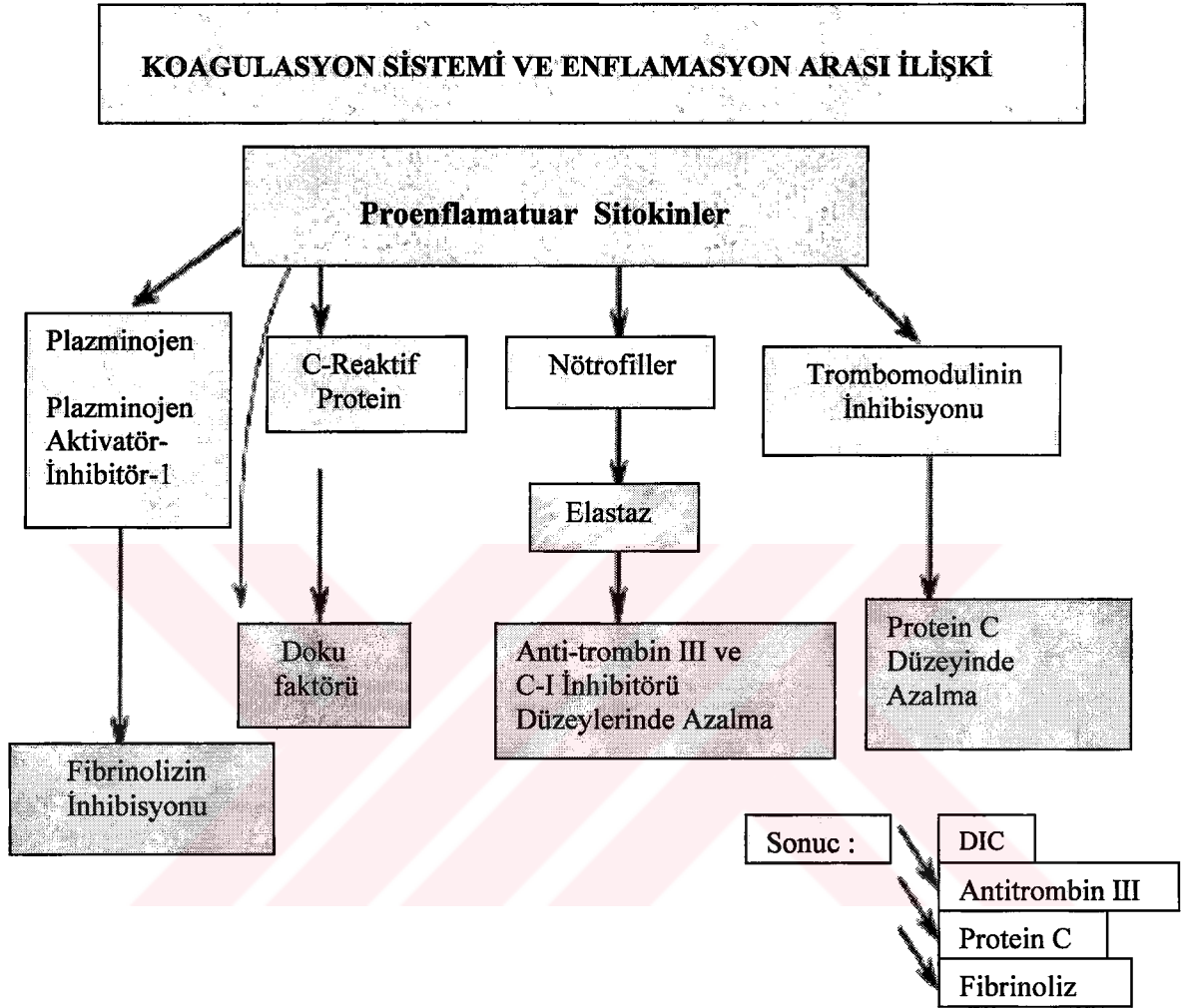
Sepsiste enflasyona erken cevap düzeni kaybolmuştur ve etkili sistemik reaksiyon oluşmuştur. Bu aşırı ve kendine özgü inflamatuvar reaksiyonlar zararlıdır. Normalden fazla salınan inflamatuvar mediatörler kaçınılmaz bir fizyolojik cevap tetikler. Bunları takiben doku ve diffüze kapiller hasarı gelişir. Enflamatuvar reaksiyonlar normal doku fonksiyonlarına müdahale edip doku hasarı ve organ fonksiyon bozukluklarına yol açar. Sepsiste aktive edilen koagülasyon vardır.Enflamasyonun ilerleyişi ile koagülasyon arasında bir ilişki söz konusudur. (Şekil.10.) (10,11,14,15,19,34,35,79,124,125)

- \*Proinflatuar ajanlar
- \*Endoteliyal hasar
- \*Doku faktör ekspresyonu
- \*Trombin üretimi



**Şekil.9. Sepsis'te kaybolan homeostaz**

(PAI-1: plazminojen aktivatör inhibitör 1, TAFI: trombin aktive edebilen fibrinoliz inhibitörü)



**Şekil.10. Sepsis ve Enflamasyon ile Koagulasyon İlişkisi.**

İnfeksiyonla savaş için salınan birçok enflamatuar ajan ayrıca koagulasyonu başlatır ve sepsise yardımcı olur. Diğer yandan koagulasyonu başlatan enfeksiyöz ajanların kendilerinin direkt endotelial hasara neden olabileceği gösterilmiştir. (60-64,74-76,96,98,103,104,121)

Sepsiste birden fazla sitokin (IL-1,TNF-alfa gibi) endotelial hücreler ve monositlerdeki doku faktörünün ekspresyonunu uyarır ve koagulasyonun başlamasına neden olurlar. Doku faktörü (TF) immün sistem ve koagulasyon arasında anahtar bir ajandır ve koagulasyonun temel aktivatörüdür. Levi ve ark. trombin üretimi ile ilgili bir parametre olan trombin – antitrombin kompleksinin (TAT) endotoksin ve TNF-alfa uygulanmış gönüllülerde anlamlı derecede arttığını belirtmişlerdir.(104,121,123,124)

Sepsiste fibrinolizin baskılanması söz konusu olup fibrinolitik sistem direkt etkilenmektedir. Doku plazminojen aktive edici faktör (t-PA)'ün plazminojenden dönüşümünü tetiklediği plazmin, fibrinolizin birincil etkileyicisidir. Fibrinoliz, plazminojen aktivatörü-1 (PAI-1) ve trombin aktive edebilen fibrinoliz inhibitörü TAFI, tarafından inhibe edilmektedir.(123,124)

PAI-1, platelet ve endotelial hücreler ile üretilir ve t-PA'nın esas ve hızlı etki eden inhibitörleridir ve gram (-) patojenlerden salınan endotoksinlerin PAI-1'in aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir.(34,35,121,123,124)

Deneyisel çalışmalarda endotoksin veya TNF-alfanın sağlıklı gönüllülere uygulanması fibrinolitik yönelimin ön bulgularını göstermektedir. Elde edilen diğer veriler ise koagulasyonda ki değişimlerden bağımsız fibrinolitik deaktivasyonu işaret etmiştir. Bu değişimler sepsisin ilerlemesinde ve organ fonksiyon bozukluklarında günümüzde en önemli etken olarak görmektedir.

Sepsisli olgularda, PAI-1 aktivite artışı,t-PA aktivite düşüşü, azalan protein C seviyeleri ve yine azalan plazminojen düzeyleri başlıca fibrinolitik bozukluklar olarak karşımıza çıkmaktadır.Sonunda fibrinolizin baskılanması

ile beraber koagulasyonun aktivasyonu sepsisli hastalarda ki koagulasyonun dinamik yolunu ortaya çıkarır. (34,35,96,124,125)

Sepsiste iç denge kaybolur ve baskılanmış fibrinoliz ve koagulopatiye ek olarak diğer fizyolojik mekanizmalar sepsisteki kötüye gidişi maskeleyen özelliğine sahiptirler. Aslında basitçe söylemek gerekirse sepsis, normal şartlarda olması gereken temel iç dengeye karşıt olarak ortaya çıkan bir fonksiyon bozukluğu şeklinde tanımlanabilir. Diğer taraftan proenflamatuar ajanlar endotelial hasar, doku faktörü ekspresyonu ve trombin üretimi ile yönlendirilen enflamasyon ve koagulasyon artışının gözlemlendiği vurgulanmıştır.

Sepsiste görülen koagulopati, akut organ fonksiyonsuzluğu ve ölüme doğru bir ilerlemeyi yönlendirir. Septik şok gelişimi gözlenen hastalarda koagulopati anlamlı derecede hızlandırır ve içinde tam bir protein C eksikliği, fibrin monomerlerinin artışı, fibrinojenin azalışı gibi bulgularında yer aldığı laboratuvar verilerinde değişimler görülmektedir. Koagulopatinin "bazı araştırmacılar tarafından DIC olarak adlandırılır" sepsisin geç bir komplikasyonu olduğu yaygın olarak düşünülmektedir. Önemli bir nokta olarak, koagulasyonun baskın olduğu DIC, sepsisteki multiple organ yetersizliğinin bilinen yaygın klinik tablosudur ve kötü prognozu önceden haber vermektedir. (10,11,15,19,30,60,79,96,124,125)

## **2.3. Fare Peritonit Sepsis Modeli**

Bakteriyal peritonit özellikle cerrahi müdahelerden sonra lokal veya yaygın olarak yüksek morbidite ve mortalitenin eşliği ile büyük oranda karşımıza çıkan bir hastalıktır. Yeni antibiyotiklerin kullanılması ve cerrahi girişimlerin yenilenmesine karşın kontaminasyonun iyice yerleşmesiyle birlikte multiple organ yetmezliğine doğru hızlı bir gidiş önemli sayılabilecek düzeydedir. En çok etkilenen uzak bölge organı akciğerdir. Bu arada hastaların bakım süreleri ve hastanede kalma sürelerini uzatmanın yanında diğer organ yetmezliklerine de yol açan artan mortalite gözlenmektedir. Multiple organ yetmezliğinden son 10 yıldaki mortalite oranı (%40-50) civarında rapor edilmiştir.(6,12-16,19,22,41,46)

### **2.3.1. Patoloji:**

Intraabdominal sepsis ve gram (-) sepsis sık sık arasında değişkenliktedir. Bununla birlikte intraabdominal sepsis çoğunlukla polimikrobiyal infeksiyon sonucu gözlenir. Bu gösteriyor ki aerobik gram (-) sepsisin etkileri anaerobik bakteriyeminin potansiyeliyle bağlantılıdır. Klinik çalışmalar gram (-) sepsisli hastaların yarısından fazlasındaki endotoksin seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bakteriyemi de olduğu gibi lokal ve periferik dokulardaki sitokin cevabının sonuçları intraabdominal sepsisin patolojik aşamalarından sorumlu olabilmektedir. (19,22,25,27,41,46,112,125)

### **2.3.2. Deneysel Modellerle İlgili Genel Bilgi:**

Witcheman ve ark. sepsis çalışmalarında çeşitli laboratuvar modellerini sunmuşlardır. İntraabdominal sepsis için; 1) bakteriyel endotoksin veya



gram (-) bakterinin intravenöz enjeksiyonu, 2) bakterinin intraperitoneal uygulaması (gram (-) veya polimikrobiyal), 3) hayvanın kendi florasıyla (intestinal) peritoneal kontaminasyonu sağlamak (çekal ligasyon ve punkture "CLP") modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır.(12-16,60,70,78,80-82,126)

Özellikle antimikrobiyal ajanları deneme açısından , Browder ve ark. 1987'de E. coli , Matsomoto ve ark. 1991'de E.coli, S aureus, C. Albicans, Tokunaga ve ark. 1997'de E. coli KC-14, E. Coli TT-48 suşlarını kullanarak fare peritonit sepsis modelini incelemişlerdir. Bu modelde bakterileri intraperitoneal enjeksiyonla hayvana uygulamışlar ve kısa sürede lokal immün yanıt aldıklarını rapor etmişlerdir. Söz konusu modellerde lokal makrofajlar, nötrofil granülositlerin artışı ile birlikte sayı ve aktivite olarak yükselme gösterdikleri Malaviya ve ark., Ayala ve Chaudry tarafından yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Kan dolaşımına duktus torakisi kullanarak lenfatik sistem yoluyla bakteriler aktarıldığı ve inokulasyondan 30 dakika sonra bakteri sayısında bakteriyemiye yol açacak seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. (Esperson ve ark., Frimodt-Moller ve ark., Thomsen )

Belirtilen bakteriyemik durum infeksiyonun şiddetini işaret etme açısından çok da gerekli değildir ve fareye verdiği morfolojik hasar dışında birkaç saat sonra dahi tespit edilemeyebilir. (Esperson ve ark.). İnterlökin sistemi hızla indüklenir ve kompleman sistemi şelalesi ile immunoglobulinlerin akut fazının konsantrasyon artışı etkisiyle immün sistem cevabı oluşturulmaktadır. (Echtenacher ve ark., Ayala ve Chaudry, Takashima ve ark.) İnfeksiyonu iyileştirmeye yönelik olmamakla birlikte spesifik Ig G üretilir. (Brown ve ark.) Bakterilerin birçoğunun letal infeksiyona neden olduğu büyüme eğrilerinde (invivo) invitro kültürlerindeki benzer şekilde gösterilecektir. Özellikle yükselme fazı sonrası giderek artan bir çoğalma söz konusudur.

İkinci etapta kendini gösteren bir durgunluk fazı belirlenir. Daha sonra hayvanların genelde öldüğü azalma fazı gözlenir. (70,73,77,78,80-82,86,126)

Sonuçta hayvanlar artık karşı konulamaz infeksiyon nedeniyle ölürler, ancak toksinlerin çeşitli derecelerde ki üretimin de ölümlerden sorumlu tutulduğu bildirilmiştir. Diğer yandan bakteri sayısını azaltan tedaviler fare ölümlerini önleme üzerinde çok etkili olmadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. ( 6,12-16,25,55,60,77,80-82,86,112,123,126)

Ancak burada en kritik nokta, %50 letal dozun (LD<sub>50</sub>) belirlenerek çıkan sonuçlara göre çalışmalara yön verilmesidir.(44,77,80-82,86,123)

Hayvanların ölüm ve canlılık durumu veya periton ve kandaki bakteri sayısı, tedaviye cevap ve infeksiyon monitörizasyonunda gözönünde tutulması gereken iki parametredir. Hayvanın yaşaması veya ölümünü izleme kolaylığı deneyin tedavi protokolünün işlerliği açısından önemli bir avantajdır. Yaşam eğrisini ortaya koyarak farelerin ölüm zamanını saptamak tedavinin etkinliği açısından önemlidir. Farelerin ölümü ile sonuçlanabilen kısa süreli deneylerde özellikle (ilk 24 saat içinde)12-24 saat arasını izlemek çok gereklidir. Diğer yandan uygulanan tedavi droglarının bazı toksik yan etkilerini inokulasyon yapılmamış gruplarda deneyerek ortaya koymak yerinde olur. Tedavi gruplarındaki ölüm sayıları, %50 yaşamın sona erdiği, %50 koruma dozu (PD<sub>50</sub>) veya %50 efektif doz (ED<sub>50</sub> ~ LD<sub>50</sub>) oranlarının , in-vitro koşullarda birbirleriyle etkileşimleri sonucunda netleştiği söylenebilir.

Farelerdeki infeksiyonun ilerlemesinde, kandaki lökosit sayıları, periton sıvısındaki lökosit sayıları, çeşitli interlökinler, karaciğer enzimleri, renal fonksiyon parametreleri, IgM ve IgG antikorların sorumlu olarak gösterilebileceği çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir.(25,44,80-82,86,123)

## 2.4. Sitokinler:

Sitokinler genel olarak doğal ve kazanılmış immünitelerde rol oynarlar. 8-25 kDa arasında değişen molekül ağırlıkları vardır ve tek zincirlidirler. Enflamasyonda veya antijen uyarısına yanıt olarak sentezlenirler ve lokal etki ederler.(25,26,36-38,110)

İmmün cevabın aktivasyon fazında sitokinler lenfositlerin büyüme ve değişimlerini stimüle ederken, etki fazında mikropları ve diğer antijenlerin eliminasyonunu sağlayan efektör hücreleri aktive eder. İmmün stimülasyon sonrası sentezlenen sitokinler hedef hücredeki reseptörlere bağlanırlar. Sinyal iletimi ile biyolojik etki ortaya çıkar. Burada sinyal nukleusa gider ve gen ekspresyonunda değişikliğe neden olur. (36-39,41,132)

Sitokin sekresyonu kısa süreli bir olaydır. Aynı hedef hücrede birden fazla etki yaparlar. Ayrıca diğer sitokinlerin sentez ve etkisini düzenlerler. (Tablo.4.)(5,25,26,36-38,49,110)

Diğer polipeptid hormonu gibi, hedef hücre yüzeyindeki spesifik reseptör bağlanıp etki gösterirler. Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu spesifik sinyaller tarafından regüle edilir. Sitokinlere hücre yanıtta yeni mRNA ve protein sentezine gerek vardır.(25,26,36-38,49)

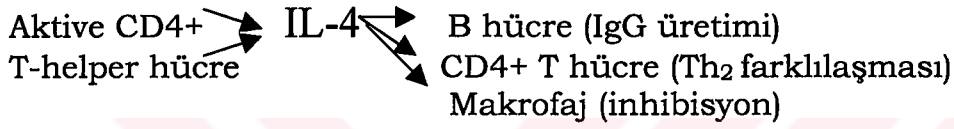
Diğer yandan sitokinlerin şu şekilde sınıflandırılması yapılabilir:

- a) Doğal immünitelerde rol oynayanlar. (Tip1 IFN- $\gamma$ , TNF  $\alpha$  ve  $\beta$ , IL-1,IL-6, kemokinler...)
- b) T lenfositleri tarafından üretilip, lenfosit aktivasyonu, büyümesi ve farklılaşmasını regüle edenler. (IL-2, IL-4, TGF  $\alpha$  ve  $\beta$ )
- c) İmmün kaynaklı enflamasyon regüle edenler. (IFN- $\gamma$ , TNF  $\beta$ , IL-10, IL-5, IL-12, MIF)
- d) Olgunlaşmamış lökositlerin büyüme ve farklılaşmasını stimüle edenler. (IL-3 ve IL-7)

Tablo. 4

**Sitokinlerin hücelere yaptığı etki yolları :**

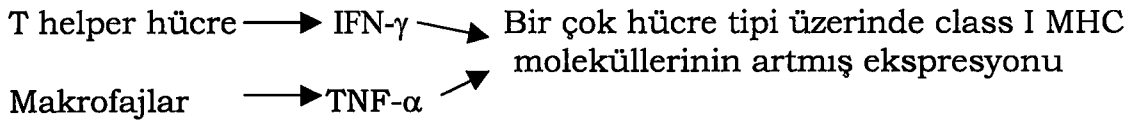
a) pleiotropizm; bir sitokinin farklı hücre tiplerine yaptığı çoklu etkilerdir.



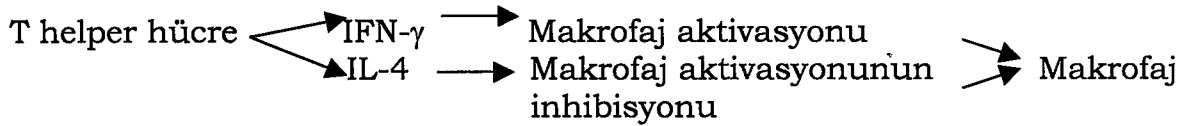
b) redundancy; birçok sitokinin aynı veya çakışan etki göstermesi.



c) sinerji; iki veya daha çok sitokinin toplam etkilerinden daha büyük oranda etki yapması.



d) antagonizm; bir sitokinin bir diğzerinin aksiyonunu inhibe etmesi.



### **2.4.1. Sitokinlerin fonksiyonel sınıflandırılması:**

Ara rol oynayan ve düzenleyici olarak görev yapan ajanlar infeksiyon etkenlerine karşı cevapta esasen mononuklear fagositlerce üretilir. LPS gibi bakteriyal ürünler ve viral ajanlar doğal immünitinin parçası sitokinlerin salınımını makrofajları direkt uyararak sağlarlar. (36-38)

Ayrıca aynı sitokinler, antijen uyaran T hücrelerin stimüle ettiği makrofajlarla salınabilmektedir. Kazanılmış immünitede rol alan araçlar ve düzenleyiciler yabancı antijenleri spesifik tanıyan T lenfositlerce üretilir. Bazı T hücre sitokinleri öncelikle çeşitli lenfosit popülasyonlarının farklılaşması ve büyümesinin düzenlenmesinde fonksiyoneldir ve böylece T hücrelerine bağlı immün cevabın aktivasyon fazında önemli rol oynarlar. Diğer T hücre kökenli sitokinler kazanılmış immünite cevabının efektör fazında antijenleri elemine etmede mononuklear fagositler, eozinofiller, nötrofiller gibi özelleşmiş hücrelerin düzenlenmesinde ve aktive edilmesinde rol alır.(36-38,132)

Diğer taraftan IL-12, IL-4, IL-3, IL-5... Tip1 (hemopoietin) reseptörleri içerir. Yapısında iki korunmuş sistemin parçası ve bir membran proksimal amino asid serisi vardır.(WSXWS)

IFN- $\gamma/\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 Tip 2 reseptör içerir. Tip1'e benzer. (iki ekstraselüler, korunmuş sisteinli alan kapsar)(36-39,41,132)

#### **2.4.1.1. İnterlökin-10 (IL-10):**

İnterlökin-10 (IL-10), 1989'da Th<sub>2</sub> hücrelerinden üretilmiş çok uyarıcı özellikte bir immün düzenleyici sitokin olarak bulunmuştur. Başlangıçta Th<sub>1</sub> sitokinleri gibi sitokinlerin üretimini inhibe etme özelliğinden dolayı sitokin

sentezi inhibitörü tanımlaması da yapılmıştır. Diğer ilginç bir özellik Einstein-Barr Virus (EBV) genomundaki BCRF1 ile DNA ve aminoasit sekuensinde güçlü bir homoloji göstermesidir. Yapısında 4 adet  $\alpha$ -helikal globüler bölüm vardır. 35 kD'lık lovalent olmayan bağ içeren homodimerik bir sitokindir. IL-10'nun reseptörü, interferon reseptörleridir. (36-39,132)

IL-10 özellikle CD4+ T hücrelerinde Th<sub>0</sub> , Th<sub>1</sub> ve Th<sub>2</sub> 'lerden CD8+ T hücrelerinde, monositlerde, makrofajlarda ve normal veya neoplastik B lenfositlerinde saptanmıştır. Ancak en önemli kaynak Th<sub>2</sub> hücreleridir. IL-10 konağın immün cevabının inhibitörüdür. Th<sub>1</sub> sitokinlerini (IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF ve lenfotoksin) ve monosit sitokinlerinin ( IL-1 $\alpha$  ve  $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ...) sentezini inhibe eder. Ayrıca makrofajlardan IL-1 reseptör antagonistinin sentezini indükler. Aynı zamanda CD8+ T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırır. Kısaca IL-10, mikroplara karşı cevap veren makrofajların işlemlerini sona erdirmekte ve sistemi dinlenme fazına döndürmektedir. Diğer taraftan IL-10 enflamasyonlu otoimmün hastalıkların bazılarında ve sepsiste terapötik bir özelliğe sahiptir.(36-39,41,132)

#### **2.4.1.2. İnterlökin-12 (IL-12):**

IL-12 bir proenflamatuar sitokindir. IL-12 ilk olarak monositlerden üretilen lenfosit olgunlaştırıcı faktör ve doğal öldürücü uyarıcı faktör gibi fonksiyonlar ile tamamlandı. Yaklaşık 70 kD moleküler ağırlığı olan bir heterodimerik glikoproteindir. Birbiriyle ilişkili olmayan ve tek disülfid bağı ile kovalent olarak bağlanmış sıra ile 40 kD (ağır zincir-p40) ve 35 kD'lık (hafif zincir-p35) iki glikoprotein alt ünitelerden oluşmaktadır. 40 kD'lık alt ünite IL-6 reseptörü ile benzerlik gösterirken 35 kD'lık alt ünite özellikle IL-6 ve granulosit stimüle eden faktör (GCSF) gibi tek zincirli sitokinler ile yapısal

yakınlığa sahiptir. Bu yüzden molekül komple olarak, her iki sitokinin ve sitokin reseptörünün karakterini göstermektedir. IL-12 reseptörü aktive T hücrelerde, NK hücrelerinde ve kemik iliği hücrelerinde belirlenmiştir.  $\beta 1$  ve  $\beta 2$  alt ünitelerinden oluşan bir heterodimerdir. Her iki zincir sitokinin yüksek affinite ile bağlanmasını gerektiren bir özelliğe sahiptir ve sadece  $\beta 2$  zinciri sinyal kapasitesini içerir.(36-39,132)

IL-12, makrofajlar, NK hücreleri, T lenfositleri ve diğer antijen sunan hücrelerden üretilir. Üretim için uyarıcı en önemli etkenler ise bakteriler, bakteri ürünleri (endotoksin...) ve hücre içi parazitlerdir. Özellikle hücre içi mikroplarına karşı makrofaj cevabı olarak salınan IL-12, IFN- $\gamma$ ' yı indükleyerek makrofaj aktivasyonuna yol açar ve mikrobun ölümü gerçekleşir. IL-12 ile IFN- $\gamma$  arasında pozitif bir feedback vardır. Ayrıca NK ve lenfokin kaynaklı öldürücü hücrelerin sitotoksik aktivitesini de artırır (36,39)

Bununla birlikte IL-12, enfeksiyöz hastalıkların patogeneğinde, naif CD4+ T hücrelerinin Th<sub>1</sub> hücrelerine farklılaşmasını başlatarak önemli bir rol oynar. Aynı zamanda T hücrelerinin büyüme faktörüdür. (36-39,41,132)

Diğer yandan IL-12'nin antitümör ve antimetastatik aktiviteleri bilinmektedir. Bir çok deneysel ve klinik çalışma ile sepsis ve endotoksemi durumlarında üretildiği gösterilmiştir. (5,6,12-16,19,25,44,49,55,125)

IL-12, hücre içi mikroplara karşı erken doğal immün reaksiyonların başlaması ve bu mikroplara karşı konağın kazanılmış immün cevapların ortaya çıkmasını sağlayarak, doğal ve kazanılmış immünite arasında bir köprü gibi görev alır. (36-39,132)

Özellikle Th<sub>1</sub> cevabında ve Th<sub>2</sub> hücrelerini farklılaşmasının inhibe edilmesinde immün düzenleyici bir moleküldür.

#### **2.4.1.3. İnterlökin-4 (IL-4):**

IL-4, IgE antikorlarının üretimi ve naif CD4+ T hücrelerinden Th<sub>2</sub> hücrelerin gelişimi için en önemli uyarandır. Th<sub>2</sub> alt gruplarının üretilmesi ve indüklenmesi ile etki gösteren sitokindir. 4 adet  $\alpha$ -helikal yapı içeren sitokin ailesindedir. IL-4'ün esas hücrel kaynağı, aktive mast hücreleri ve bazofiller kadar Th<sub>2</sub> alt gruplarının CD4+ T lenfositleridir. (36-39,41,132)

Diğer yandan IFN- $\gamma$ 'nın makrofaj aktive edici etkisini antagonize eder ve böylece hücrel immünite reaksiyonlarının inhibisyonuna yol açar. Bu durum Th<sub>2</sub> hücre fonksiyonlarının, immün enflamasyon inhibitörleri gibi işlev yaptığını göstermektedir. Bununla birlikte, IL-4, IgE reaksiyonlarını, mast hücre/eozinofil reaksiyonlarını başlatırken makrofaj bağımlı reaksiyonları baskılar. (36-39,41,49,132)

#### **2.4.1.4. İnterferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ):**

Tip II interferon (IFN) diye de adlandırılan Th hücrelerinden Th<sub>1</sub> alt gruplarının oluşumuna sebep olan bir sitokindir. Homodimerik bir proteindir. IFN- $\gamma$ 'nın reseptörü, tip II reseptör ailesi özelliğinde iki yapısal açıdan homolog iki polipeptidten oluşur. Hücre içi mikroplara karşı hücrel immünitede önemli fonksiyonları vardır. Bir makrofaj aktive eden sitokin olarak T lenfositleri ve NK hücrelerinin aktive edilmesini sağlayarak fagosite edilmiş mikropların makrofajlarca öldürülmesini sağlar.(36-39,41,132,133)

Ayrıca IFN- $\gamma$ , vasküler endotelial hücrelerin bir aktivatörüdür. Bununla birlikte nötrofilleri aktive ederek NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini uyarır.



### **3. GEREÇ ve YÖNTEM:**

#### **3.1 Kimyasal Maddeler ve Cihazlar:**

Lipopolisakkarid, (LPS from E.coli Serotype 0111: B4), PBS (Phosphate buffered saline), Fix and Perm Cell Permeabilization Kiti (Caltag), Rat IgG<sub>1</sub> İzotip Kontrol antikoru (Caltag) , IL-4 antikoru (Rat monoclonal antibody to mouse IL-4, Caltag), Potasyum mono hidrojen fosfat (Merck) , Sodyum hidrojen fosfat (Merck), Beckton Dickinson Flow Cytometer (FACS) Calibur cihazı, Laminar Flow kabin, Vortex (nuve), Santrifüj (Herause), Hassas terazi (Mettler), Pipet takımı (Eppendorf), pH metre (Hanno)

#### **3.2. Çözeltilerin ve Tayin Yöntemlerinin Hazırlanması:**

##### **3.2.1. LPS'nin Hazırlanması:**

E. coli'den elde edilen toz halindeki lipopolisakkarid LPS, Laminar Flow kabin içinde, steril koşullar altında, PBS (Phosphate buffered saline) ile sulandırılarak hazırlandı. Sulandırma, her uygulama dozu için ayrı ayrı, 35 IU PBS (Phosphate buffered saline) içinde, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg ve 25 mg/kg LPS olacak şekilde yapıldı.

##### **3.2.3. Tayin Kitlerinin Hazırlanması:**

Farelerin gözlerinden (orbital sinus) hayvan başı 50 µl hematokrit tüpüne alınan heparinize kan örneklerinde yapılan intrasitoplazmik sitokin tayininde, kit içeriğinde formaldehid ve deterjan-saponin- yer alan Fix and Perm Cell Permeabilization Kiti (Caltag Laboratories), Kontrol için Rat IgG<sub>1</sub> İzotip Kontrol antikoru (Caltag Laboratories), IL-4 tayini için mouse IL-4

antikor (Rat monoclonal antibody to mouse IL-4, Caltag Laboratories) ve IFN- $\gamma$  analizi için mouse IFN- $\gamma$  antikorundan (Rat monoclonal antibody to mouse IFN- $\gamma$  ,Caltag Laboratories) 50'şer  $\mu$ l kullanıldı.

Analizler Beckton Dickinson Flow Cytometer cihazı ile yapıldı .

#### **3.2.4. Glukoz Ölçümleri:**

Her farenin gözünden (orbital sinus) alınan 25'er  $\mu$ l kan sticklere damlatılarak, Accturend marka glukoz ölçer cihazında kan glukozu değerleri ölçüldü.

#### **3.2.5. Ateş Ölçümleri:**

Farelerin ateşleri, rektal problu Lae marka digital termometre kullanılarak rektal yolla ölçüldü.

#### **3.2.6. Lökosit Ölçümleri:**

Hematokrit tüpüne alınan fare başı 100'er  $\mu$ l kan 11 taksimatlı lökosit sulandırma pipetine çekildi. Daha sonra sulandırılmış kan toma kamerasının lökosit sayma bölümüne yayılarak ışık mikroskobu altında sayım yapıldı.

### **3.3. Deney Hayvanı Seçimi:**

Çalışmamızda 25.0  $\pm$ 1.0 g. ağırlığında, genel amaçlı, elle tutulup çalışılması kolay, diğer soylara göre daha uysal, monoklonal antikor üretimi gibi özellikli araştırmalarında içinde bulunduğu immünoloji çalışmalarında , infeksiyonlara ve toxoplazmalara duyarlı olduğu için çeşitli infeksiyon (salmonella,leishmaniosis,E.coli) deneylerinde ve bu araştırmalarla bağlantılı immünolojik monitorizasyonun değerlendirilmesinde tercih edilen, üretim özellikleri iyi olan Balb/c soyu erkek fareler seçildi.

### **3.4. LPS Dozunun Saptanması:**

Sepsis modeli oluşturmada kullanılacak olan LPS'nin dozunun belirlenmesi için çeşitli literatürlerde belirtilen dozlar 10 mg/kg, 15 mg/kg ile bunlardan farklı iki ayrı doz 20 mg/kg ve 25 mg/kg 12 adet Balb/c soyu erkek farelere intraperitoneal yolla uygulandı. Hayvanlara verilen 4 ayrı doz miktarı içinde, septik Şok nedeniyle ölüm görülmeyen ancak septik Şokun ve sepsise ilerleyişin belirtileri olarak söylenebilecek hızlı solunum, taşikardi, dehidratasyon, hipertermi, lökositoz, hipoglisemi gibi özelliklerin daha net gözleendiği 15 mg/kg dozun, uygulanacak LPS miktarı şeklinde olduğuna karar verildi.

### **3.5. Sepsis Modelinin ve Deney Gruplarının Oluşturulması:**

Çalışmada 25.0 ±1.0 g. ağırlığında, genel amaçlı, Balb/c soyu erkek fareler seçildi.

Model belirleme amacıyla, öncelikle 12 fareye, (doz başı 3 hayvan) 4 ayrı doz olmak üzere, (10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg ve 25 mg/kg) E. coli'den elde edilen lipopolisakkarid (LPS from E.coli Serotype 0111: B4) enjekte edildi. Uygulanacak olan LPS ise Laminar Flow kabin içinde, steril koşullar altında hazırlandı. Sulandırma, her uygulama dozu için ayrı ayrı, 35 IU PBS (Phosphate buffered saline) içinde, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg ve 25 mg/kg LPS olacak şekilde yapıldı.

25 mg/kg verilen hayvanlar septik Şok sonucu ilk 24 saat içinde öldü. 20 mg/kg dozunda yer alan hayvanlardan ilk gün iki ölüm görüldü. Hayatta kalan farenin hızlı solunum, taşikardi, hipertermi gibi belirtileri ilk 24 saat içinde dikkat çekiciydi ve kısa sürede girdiği septik Şok tablosundan çıkamayıp 2. gün öldü. 3. grup hayvanlar, ilk gün, hızlı solunum, palpasyonla hissedilen hızlı kalp atımı, ateş artışı, lökosit yükselmesi,

kafesin bir köşesinde genelde hareketsiz kalışları, az su ve yem tüketimi, tüylerin dikenleşmesi gibi özellikler sergilemelerine karşın ölüm olmadı. Hayatta kalım süreleri septik şok tablosu ile beraber ortalama 6 gün sürdü. 4. doz grubu farelerinde ise enjeksiyon sonrası 3.grup farelerin özelliklerini daha az şidette gösterdiler. Ateş ve lökosit düzeyleri normale daha yakındı. Bundan dolayı hayatta kalım süreleri ortalama 10 gün civarına çıktı.

Yukarıda belirtilen her 3 gruba ait yaşayan farelerde takip edilen özelliklerden elde edilen bulgular sonucunda 15 mg/kg LPS dozunun uygulanmasına karar verildi.

Yapılan ön deney çalışmalarından sonra, belirlenen dozun uygulanacağı deney gruplarının oluşturulma aşamasına geçildi.

Balb/c soyu 25±2 gr. ağırlığında erkek fare içeren 4 adet çalışma grubu, her grupta 10 adet deney hayvanı yer alacak şekilde meydana getirildi :

---

**1. Grup:** Kontrol grubu; sadece i.p. yolla serum fizyolojik (%0.9 NaCl) uygulandı.

**2. Grup:** LPS grubu; 1. gün 15 mg/kg LPS dozu i.p. yolla uygulandı.

**3. Grup:** LPS+ IL-12 grubu;15 mg/kg LPS uygulanmasını takiben enjeksiyondan 30 dak. sonra başlamak üzere gün aşırı 25 ng IL-12 toplam 10 gün süre ile i.p. yolla uygulandı.

**4. Grup:** LPS+ IL-10 grubu; sadece 1. gün 15 mg/kg LPS verilmesini takiben enjeksiyondan 30 dak. sonra 0,5 µg i.p. yolla uygulandı.

---

Kontrol grubu hariç diğer gruplarda ki farelere, E.coli'den elde edilmiş lipopolisakkarid, (LPS from E.coli Serotype 0111: B4 ) 15 mg/kg dozda ve i.p. yolla enjekte edilerek sepsis modeli oluşturuldu. Deney hayvanlarına uygulanan LPS ise Laminar Flow kabin içinde, steril koşullar altında, 35 IU PBS (Phosphate buffered saline) içinde 15mg/kg LPS olacak şekilde hazırlandı.

LPS ile sepsis modeli oluşturulan gruplardan 3. ve 4. gruplarda yer alan farelere yukarıda belirtilen doz ve sürelerde IL-10 ve IL-12 sitokinleri i.p. yolla enjekte edildi. Bu iki grupta yer alan hayvanların orbital sinuslarından enjeksiyon sonrası 36. saatte alınan kan örneklerinde Flow sitometrik (FACS) olarak T lenfositlerinde intrasitoplazmik IL-4 ve IFN- $\gamma$  düzeyleri tayin edildi.

### **3.6. Kan örneklerinin alınması:**

Intrasitoplazmik sitokin (IL-4 ve IFN- $\gamma$ ) tayini, lökosit ve glukoz ölçümleri için her iki gruba ait farelerin gözlerinden (orbital sinus) 36. saatte ve hayvan başı 250  $\mu$ l olacak şekilde, hematokrit tüplerine kan alındı. Elde edilen kanlardan glukoz ve lökosit ölçümlerinde kullanılanların dışındakiler intrasitoplazmik sitokin (IL-4 ve IFN- $\gamma$ ) tayini için fareden alınmasını takiben aşağıda belirtilen metod dahilinde incelemeye hazırlanıp, 24 saat içinde analiz edildi.

### **3.7. Hücreiçi IL-4 ve IFN- $\gamma$ sitokinlerinin tayin yöntemi:**

Farelerin gözlerinden (orbital sinus) alınan heparinize kanların öncelikle 50  $\mu$ l PMA (Pormol Milistat Asetat) + ionomisin ile stimülasyonu yapıldı. Ancak kontrol olarak stimülasyonsuz çalışma da yapıldı. Daha sonra kanların 4 saat kültüre edilmesini takiben oda sıcaklığında eritrosit lizisine tabi tutuldu.

Stimüle edilen örnekler, 2,5 µl CD3 kontrol antikoru ve 2,5 µl izotip antikoru konup vortexlendi. Vortex ile iyice karıştırılan örnekler karanlıkta ve oda ısısında 30 dak. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası %10'luk formaldehit içeren 50 µl fiksasyon medyumu eklenip vortexlenme tekrarlandı. Vortexleme sonrası karanlıkta ve oda ısısında 15 dak. örneklerin inkübe edilmesine geçildi.

İnkübasyonu tamamlanan karışıma, yıkama amaçlı, 5 ml PBS (phosphate buffer) eklendi ve 1650 rpm'de 5 dak. santrifüjlenme gerçekleştirildi.

Bu işlemler sonucunda oluşan supernatant atılıp, geriye kalan pellet üzerine saponin ve deterjan ihtiva eden 50 µl permeabilizasyon medyumu (reagent B) kondu. Bu şekilde elde edilen karışım karanlıkta ve oda ısısında 10 dak. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, tüplere 2'şer µl IL-4, IFN-γ ve kontrol antikoları eklendi ve yavaş devirde vortexlendi. Tekrar karanlıkta ve oda ısısında 15 dak. inkübasyon yapıldı. İnkübasyonu biten tüplere 5 ml PBS (staining buffer) ilave edildi ve karışım 1650 rpm'de 5 dak. santrifüjlendi.

Oluşan supernatant atıldı ve kalan hücrelerin üzerine 500 µl %1'lik formaldehit çözeltisi ilave edildi. Yeni karışımı içeren tüpler 2-8 ° C'de karanlıkta saklandı ve 24 saat içinde Flow Cytometer cihazında analiz edildi.

### **3.8. İstatistiksel Değerlendirme:**

Elde edilen sonuçlar SPSS 10.0 ile One Way Anova yöntemi kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

## **4. BULGULAR :**

### **4.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi :**

Materyal ve Metod bölümünde belirtilen şekilde deney grupları oluşturulmuştur. Buna göre, serum fizyolojik enjekte edilen grup kontrol, LPS, LPS ile birlikte IL-10 ve yine LPS ile birlikte IL-12 enjekte edilen gruplar sırasıyla grup1, grup 2, grup 3, grup 4 olarak tanımlanmıştır.

LPS enjeksiyonu yapılan 3 grupta sepsis modelinin oluşma durumunu ortaya koyma açısından öncelikle lökosit, kan glukozu ve ateş değerleri saptandı. Bunun yanında gözlemsel olarak taşipeni ve taşikardi gibi özellikler takip edildi. Elde edilen bulgulara göre yukarıdaki kriterlerden en azından 3 tanesini gösteren farelerle deneye devam edilmiştir.

Yukarıda verdiğimiz gruplara ait ortalama lökosit, vücut ısıları ve kan glukoz değerleri sırasıyla Şekil 1, 2 ve 3'te gösterilmiştir.

Şekil 1 ' de görüldüğü gibi lökosit düzeyleri 36. saatte yükselmiş ancak 24 saatteki değerlerle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık olmamıştır. Şekil 2'de ortalama vücut ısısı değerleri 36. saat maximum değere ulaşmış ve diğer gruplardaki değişimler çok küçük sınırlar içinde kalmıştır.

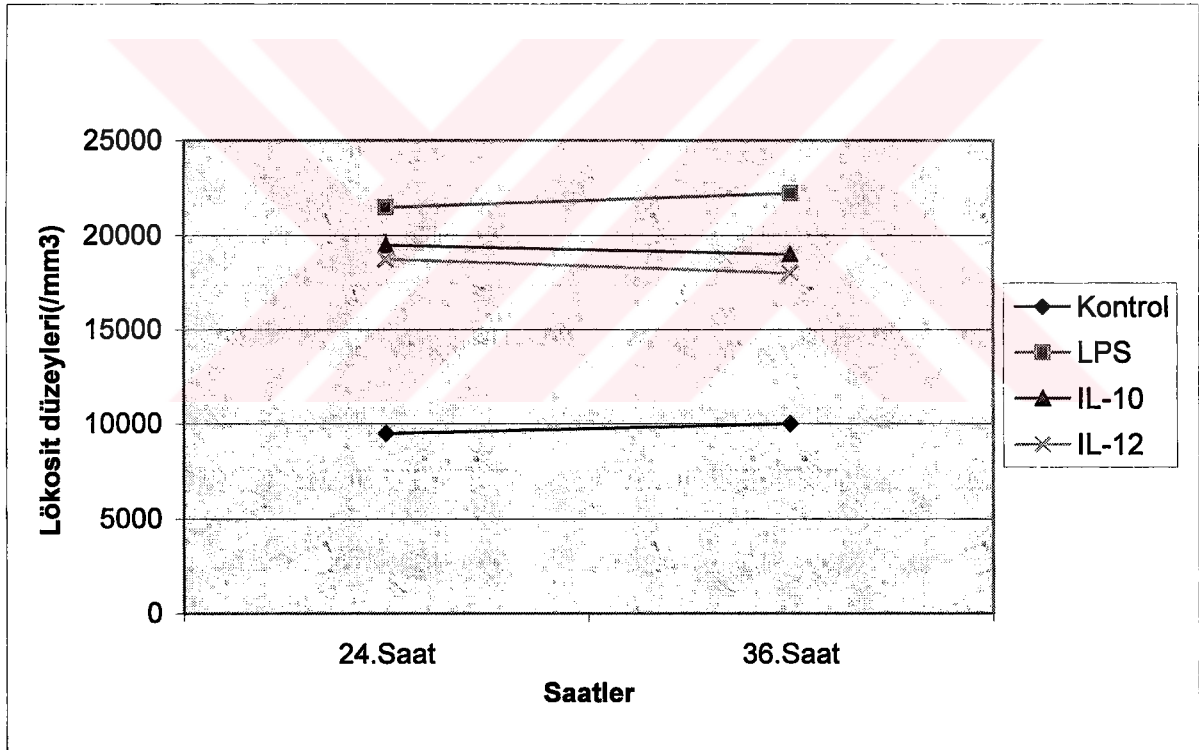
Grupların kan glukoz düzeylerine göre incelendiğinde (Şekil 3) bütün gruplar arasında kontrole oranla anlamlı düşüş gözlenmiştir.

Bununla birlikte farelerin kafes içindeki genel durumları takip edildiğinde, hayvanların septik şoka girdikten sonra kafesin bir köşesine çekilip hareketsizleştikleri, tüylerinin dikenleştiği, gıda ve su tüketiminin kısmen azaldığı ve bir miktar idrar atılımının arttığı gözlenmiştir.

Sadece LPS uygulanan grupta, yukarıda belirtilen klinik tablo (takipeni, taşikardi, hareketsizlik, gıda ve su tüketiminin kısmen azlığı...) ilk 72 saatte daha belirgin ve farelerin ölümlerine kadar büyük ölçüde devam ettiği belirlenmiştir.

Grup No ve Adı	Lökosit değeri (/mm <sup>3</sup> )	
	24. saat	36. saat
1. grup ortalama (Kontrol)	9.500 ± 2.000	10.000 ± 1500
2. grup ortalama (LPS grubu)	21.500 ± 1.500	22.250 ± 1.000
3. grup ortalama (IL-10 grubu)	19.500 ± 1.500	19.000 ± 1.000
4. grup ortalama (IL-12 grubu)	18.750 ± 2.000	18.000 ± 1.250

(A)



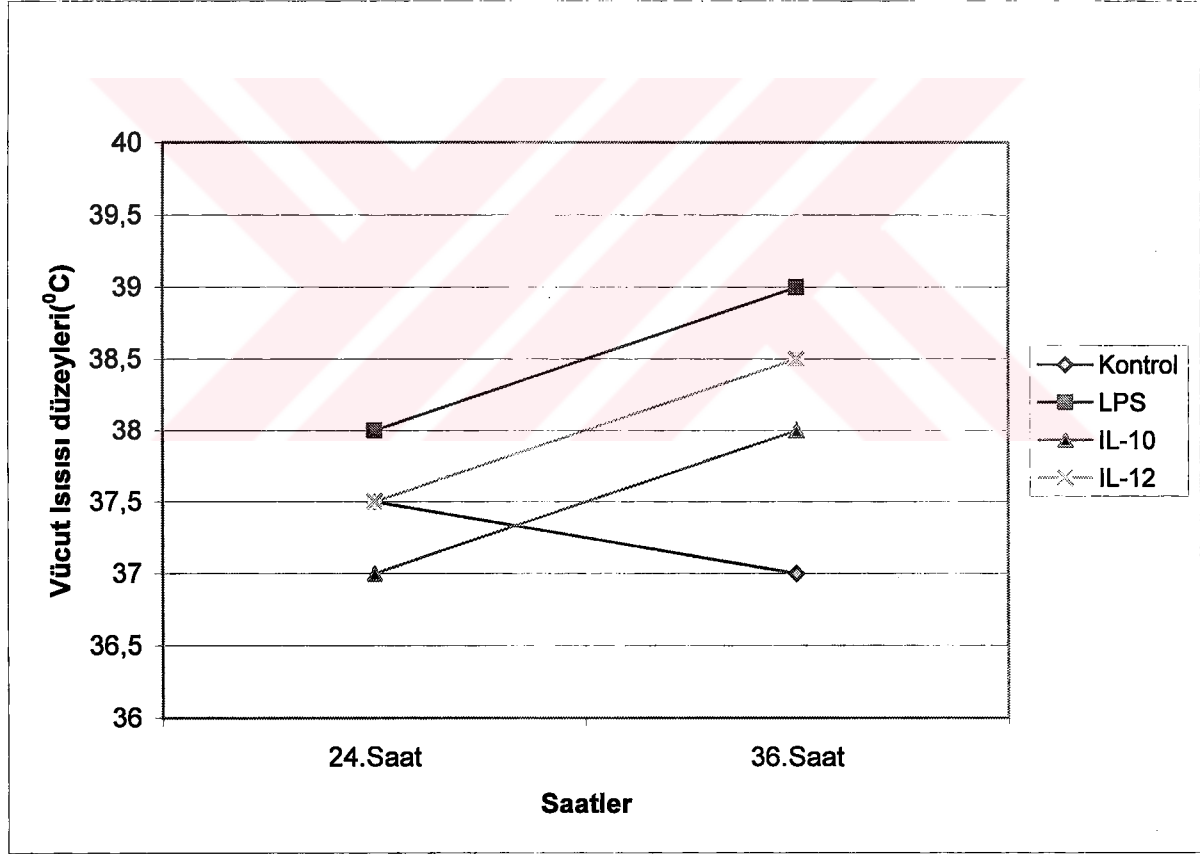
(B)

**Şekil : 1- Lökosit Değerleri, A- Tablo , B- grafiksel olarak gösterilmiştir. Tablo ve grafikte ki değerler ± standart sapma olarak belirtilmiştir.**



Grup No ve Adı	Vücut ısısı (°C)	
	1.grup ortalama (Kontrol)	37.5 ± 0.5 (24.saat)
2.grup ortalama (LPS grubu)	38.0 ± 0.5 (24.saat)	39.0 ± 0.5 (36.saat)
3.grup ortalama (IL-10 grubu)	37.0 ± 0.5 (24.saat)	38.0 ± 0.5 (36.saat)
4.grup ortalama (IL-12 grubu)	37.5 ± 0.5 (24.saat)	38.5 ± 0.5 (36.saat)

(A)

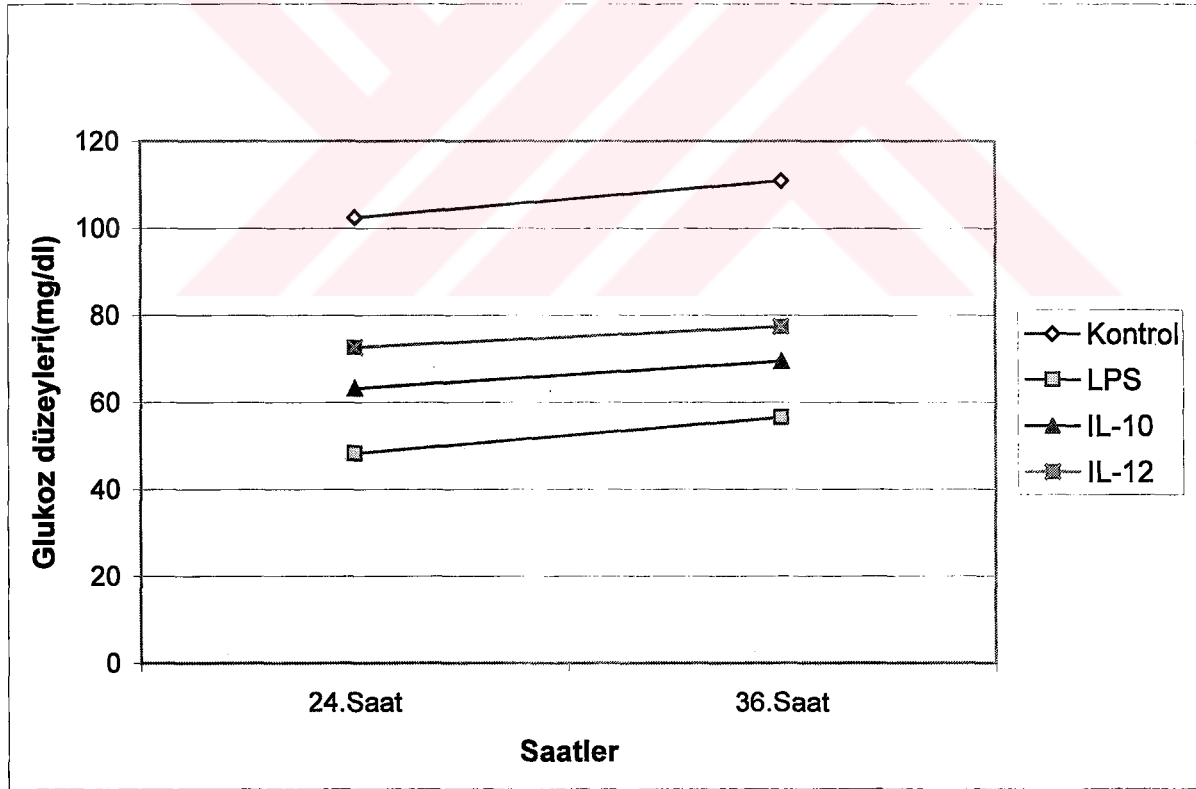


(B)

**Şekil : 2- Vücut Isısı Değerleri, A- Tablo , B- grafiksel olarak gösterilmiştir. Tablo ve grafikte ki değerler ± standart sapma olarak belirtilmiştir.**

Grup No ve Adı	Kan glukozu değerleri(mg/dl)	
	24. Saat	36. Saat
1.grup ortalama (Kontrol)	102.5 ± 6.9 (24.saat)	111.0 ± 7.4(36.saat)
2.grup ortalama (LPS grubu)	48.3 ± 3.2 (24.saat)	56.6 ± 4.1 (36.saat)
3.grup ortalama (IL-10 grubu)	63.2 ± 4.8 (24.saat)	69.5 ± 5.0 (36.saat)
4.grup ortalama (IL-12 grubu)	72.7± 6.4 (24.saat)	77.5 ± 6.8 (36.saat)

(A)



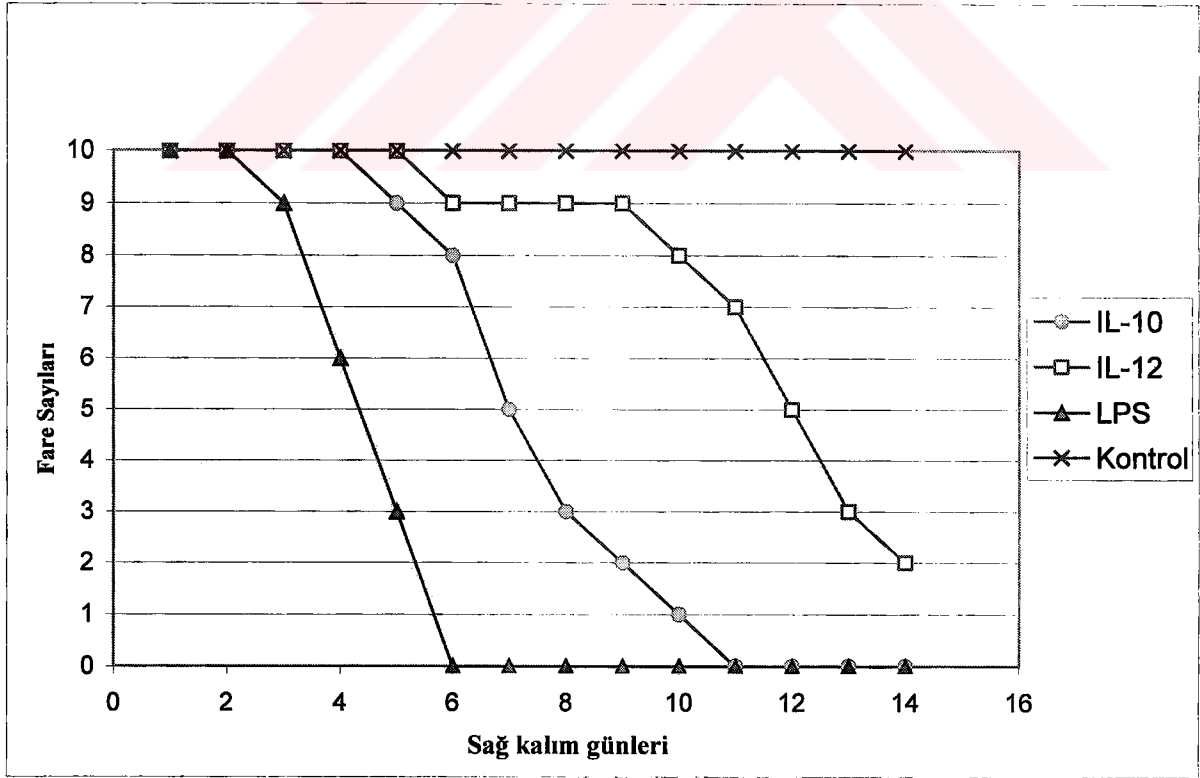
(B)

**Şekil : 3- Kan Glukozu Değerleri, A- Tablo , B- grafiksel olarak gösterilmiştir. Tablo ve grafikte ki değerler ± standart sapma olarak belirtilmiştir.**

Hayvanların sağkalım sürelerine bakıldığında, tedavisiz-LPS uygulanan gruba ait fareler 3 ile 5. günler arasında öldüğü saptanmıştır.

IL-10+ LPS uygulanan gruba ait farelerde ise söz konusu klinik tablonun çok uzun süreli olmadığı gözlenmiştir. Bu gruba ait farelerin daha hareketli oldukları ve ilk 24 saatten sonra su ve besin tüketimlerinin yanında hareketliliklerin yavaş yavaş artarak solunum hızlarının kısmen eski hızliliğini kaybetmeye başladığı ve yaşam sürelerinin 4 ile 9 gün arasında değiştiği kaydedilmiştir.

Son olarak ise IL-12+LPS uygulanan gruba bakıldığında, klinik tablonun IL-10 verilen gruba göre daha iyi prognoz ortaya koyan bir tablo sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca ilk 48 saat LPS uygulanan deney grubuna benzer bir tablo gözlemlendi. 48. saatten sonra ise hareketlilik, gıda ve su tüketimi yavaş yavaş artarak, solunum eski hızına göre bir miktar azaldığı saptanmıştır. Yaşam sürelerinin ise 5 ile 14 gün arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 4).



**Şekil 4: Deney Hayvanlarının Sağ Kalım Süreleri**

## **4.2. Hücreiçi IFN- $\gamma$ ve IL-4 Ortalama Değerleri, Oran Kinetiği ve Sağkalım Süreleri İle İlgili Veriler**

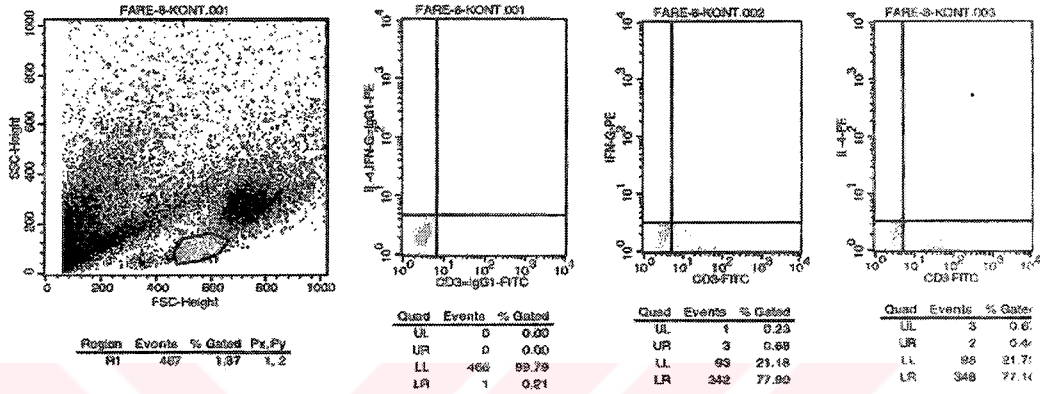
Yukarıda belirtilen kriterler ışığında, sepsis modeli tablolarına göre oluşturulan gruplarda, hücreiçi sitokin içeriği olarak 36.saat % lenfosit IFN- $\gamma$  ve IL-4 düzeyleri incelenmiş ve hayvanların sağkalım süreleri ile karşılaştırılmıştır. Kontrol, tedavisiz ve tedavili (IL-10, IL-12) sepsis grupları olmak üzere ayrılan 4 ayrı Balb/c soyu fare grubunda hücreiçi IL-4 ve IFN- $\gamma$  düzeyleri flow sitometri cihazında ölçülmüş (Şekil.5-a,b) ve elde edilen sonuçlar sağkalım süreleri ile birlikte tablo 1'de gösterilmiştir Elde edilen bulgularımız hücreiçi IFN- $\gamma$  ve IL-4 ortalama değerleri şekil 6,7 ve 8'de gösterilmiş ve tek yönlü ANNOVA istatistiksel analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir.

**Tablo.1.: Deney gruplarına göre sitokin düzeyleri ve sağkalım süreleri.**

<b>DENEY GRUPLARI</b>	<b>% LENFOSİT IFN-<math>\gamma</math> SİTOKİN DÜZEYİ</b>	<b>% LENFOSİT IL-4 SİTOKİN DÜZEYİ</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> / IL-4 ORANI</b>	<b>SAĞKALIM SÜRESİ(gün)</b>
GRUP: IL-10 ENJ.	1,16	4,68	0,25	5
GRUP: IL-10 ENJ.	1,05	5,18	0,20	5
GRUP: IL-10 ENJ.	2,66	4,88	0,55	7
GRUP: IL-10 ENJ.	3,97	7,91	0,50	7
GRUP: IL-10 ENJ.	0,88	3,06	0,29	6
GRUP: IL-10 ENJ.	0,77	4,78	0,16	4
GRUP: IL-10 ENJ.	10,55	25,00	0,42	8
GRUP: IL-10 ENJ.	19,56	25,33	0,77	9
GRUP: IL-10 ENJ.	7,35	35,97	0,20	6
GRUP: IL-10 ENJ.	3,97	7,90	0,50	6
<b>GRUP: ORTALAMA</b>	<b>5,19</b>	<b>12,47</b>	<b>0,42</b>	<b>6,3</b>
GRUP: IL-12 ENJ.	9,85	0,52	18,94	14
GRUP: IL-12 ENJ.	18,40	1,37	13,43	13
GRUP: IL-12 ENJ.	5,27	0,46	11,46	12
GRUP: IL-12 ENJ.	4,98	0,73	6,82	10
GRUP: IL-12 ENJ.	5,77	0,90	6,41	11
GRUP: IL-12 ENJ.	9,78	1,52	6,43	9
GRUP: IL-12 ENJ.	30,07	2,20	13,67	12
GRUP: IL-12 ENJ.	19,95	0,89	22,42	14
GRUP: IL-12 ENJ.	9,75	1,08	9,03	11
GRUP: IL-12 ENJ.	17,93	9,76	1,84	5
<b>GRUP: ORTALAMA</b>	<b>13,18</b>	<b>1,95</b>	<b>6,76</b>	<b>11,1</b>
GRUP: KONTROL	0,30	0,59	0,51	-
GRUP: KONTROL	0,56	1,14	0,49	-
GRUP: KONTROL	1,46	0,48	3,04	-
GRUP: KONTROL	0,96	0,78	1,23	-
GRUP: KONTROL	1,01	0,56	1,80	-
GRUP: KONTROL	1,04	0,83	1,25	-
GRUP: KONTROL.	0,45	0,38	1,18	-
GRUP: KONTROL.	0,03	0,02	1,50	-
GRUP: KONTROL	0,36	0,33	1,09	-
GRUP: KONTROL	0,77	0,48	1,60	-
<b>GRUP: ORTALAMA</b>	<b>0,69</b>	<b>0,56</b>	<b>1,23</b>	<b>-</b>
GRUP: LPS ENJ.	5,82	4,89	1,19	5
GRUP: LPS ENJ.	4,02	7,44	0,54	3
GRUP: LPS ENJ.	23,06	17,79	1,30	4
GRUP: LPS ENJ.	5,95	5,66	1,05	4
GRUP: LPS ENJ.	10,37	2,98	3,48	3
GRUP: LPS ENJ.	2,08	4,05	0,51	4
GRUP: LPS ENJ.	2,18	3,74	0,58	5
GRUP: LPS ENJ.	12,15	11,46	1,06	2
GRUP: LPS ENJ.	2,08	3,14	0,66	3
GRUP: LPS ENJ.	2,04	3,29	0,62	5
<b>GRUP: ORTALAMA</b>	<b>6,98</b>	<b>6,44</b>	<b>1,06</b>	<b>3,8</b>

**T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
DETAE  
İMMUNOLOJİ ABD**

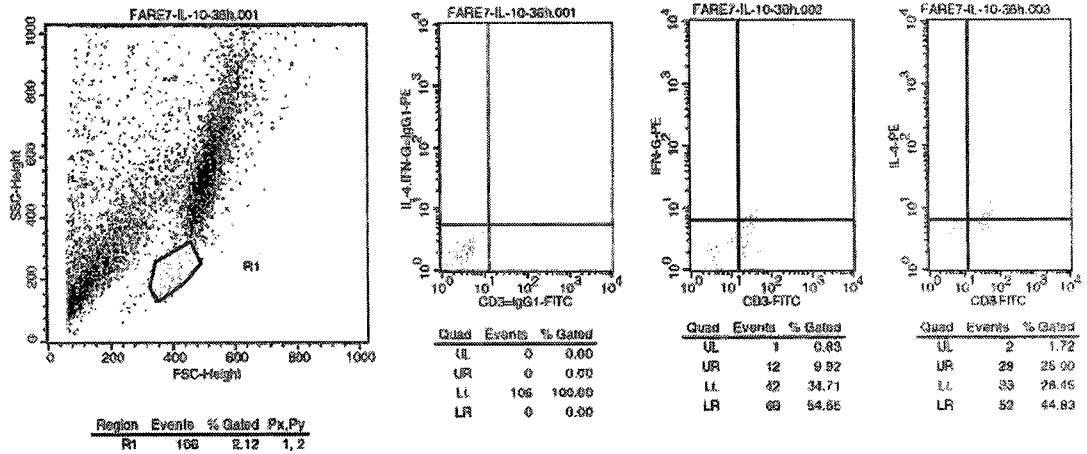
HASTANIN ADI SOYADI : FARE10-KONTROL  
TARİH: 05.05.2001  
YAS: -  
ORNEK:PERİFERİK KAN  
UCRET/SEVKLI: -



(1)

**T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
DETAE  
İMMUNOLOJİ ABD**

HASTANIN ADI SOYADI : FARE-7-İL-10-36h  
TARİH: 18.05.2001  
YAS: -  
ORNEK:PERİFERİK KAN  
UCRET/SEVKLI: -

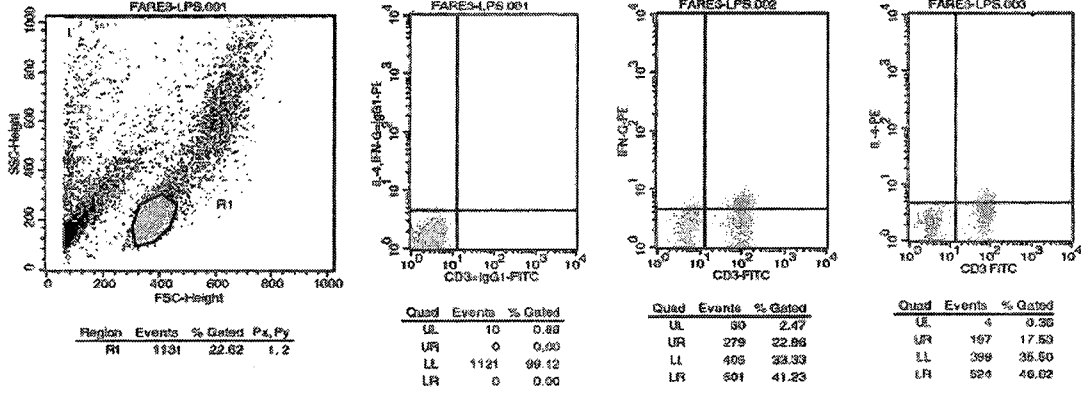


(2)

Şekil 5-a, kontrol grubuna ait flow cytometri (1) ,deney hayvanlarına IL-10 verildikten sonra ki flow cytometri (2) sonuçlarından örnekler.

**T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
DETAE  
İMMUNOLOJİ ABD**

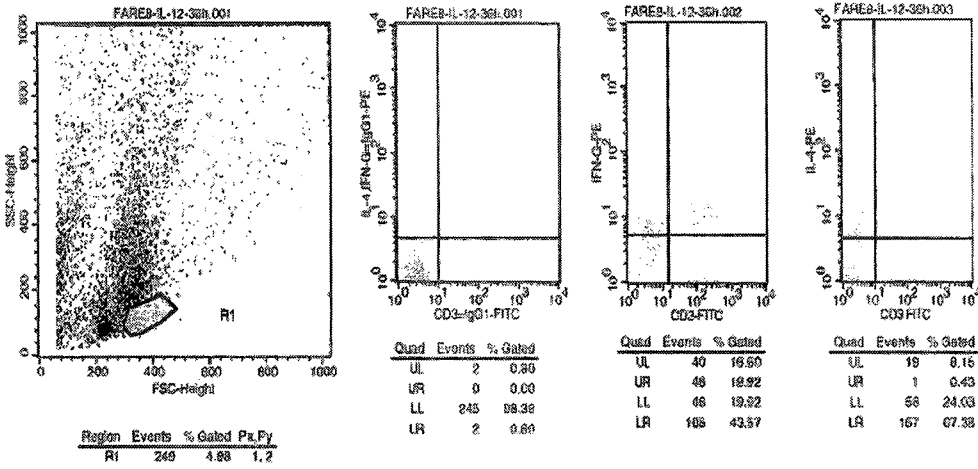
HASTANIN ADI SOYADI : FARE3-LPS  
TARİH: 05.05.2001  
YAS: -  
ORNEK/PERİFERİK KAN  
UCRETİ/SEVKLİ: -



(1)

**T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
DETAE  
İMMUNOLOJİ ABD**

HASTANIN ADI SOYADI : FARE-8-IL-12  
TARİH: 18.05.2001  
YAS: -  
ORNEK/PERİFERİK KAN  
UCRETİ/SEVKLİ: -



(2)

**Şekil 5-b, LPS verilen deney hayvanlarına grubuna ait flow cytometri (1), deney hayvanlarına IL-12 verildikten sonra ki flow cytometri (2) sonuçlarından örnekler.**

### 4.3. İstatistiksel Değerlendirme:

#### IFN- $\gamma$ değerlendirilmesi:

##### a) IL-10 grubu için:

##### IL-10 Enj. ve IL-12 Enj. Grubu:

LPS'yi takiben IL-10 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (1. Grup) IFN- $\gamma$  sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%5,19), IL-12 enjeksiyonu yapılan grubun (2.Grup) fare lenfositlerine göre (% 13,18) oldukça düşüktür. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.006 saptandığı için ileri derecede anlamlı bulunmuştur(p<0.05).

##### IL-10 Enj. ve Kontrol Grubu:

LPS'yi takiben IL-10 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (1. Grup) IFN- $\gamma$  sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%5,19), Kontrol (3. Grup) fare lenfositlerine göre (%0,69) yüksektir. Ancak yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.106 olduğu için anlamlı fark bulunamamıştır (p>0.05).

##### IL-10 Enj. ve LPS Enj. Grubu:

LPS'yi takiben IL-10 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (1. Grup) IFN- $\gamma$  sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%5,19), sadece LPS enjeksiyonu yapılan tedavisiz grubun (4.GRUP) fare lenfositlerine göre (%6,98) az oranda düşüktür. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.515 olduğundan anlamlı fark bulunamamıştır (p>0.05).

**Tablo-1: IL-10 Enj. grubu ile diğer grupların IFN- $\gamma$  açısından değerlendirilmesi.**

DEĞİŞKEN	A	B	A-B	SS	$\rho$
IFN- $\gamma$	Grup 1	*Grup 2	-7,9830	2,7141	0,006
		Grup 3	4,4980	2,7141	0,106
		Grup 4	-1,7830	2,7141	0,515



**b) IL-12 grubu için:**

IL-12 Enj. ve Kontrol Grubu:

IL-12 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (2. Grup) IFN- $\gamma$  sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%13.18), Kontrol grubu (3. Grup) fare lenfositlerine göre (%0.69) çok yüksektir. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde ileri derecede anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

IL-12 Enj. ve LPS Enj. Grubu:

IL-12 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (2. Grup) IFN- $\gamma$  sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%13.18), LPS Enj. Grubu (4. Grup) fare lenfositlerine göre (%6.98) yüksektir. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.028 olduğu için ileri derecede anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

**Tablo-2: IL-12 grubu ile diğer grupların IFN- $\gamma$  açısından değerlendirilmesi.**

DEĞİŞKEN	A	B	A-B	SS	$\rho$
IFN- $\gamma$	Grup 2	*Grup 3	12,4810	2,7141	0,001
		*Grup 4	6,2000	2,7141	0,028

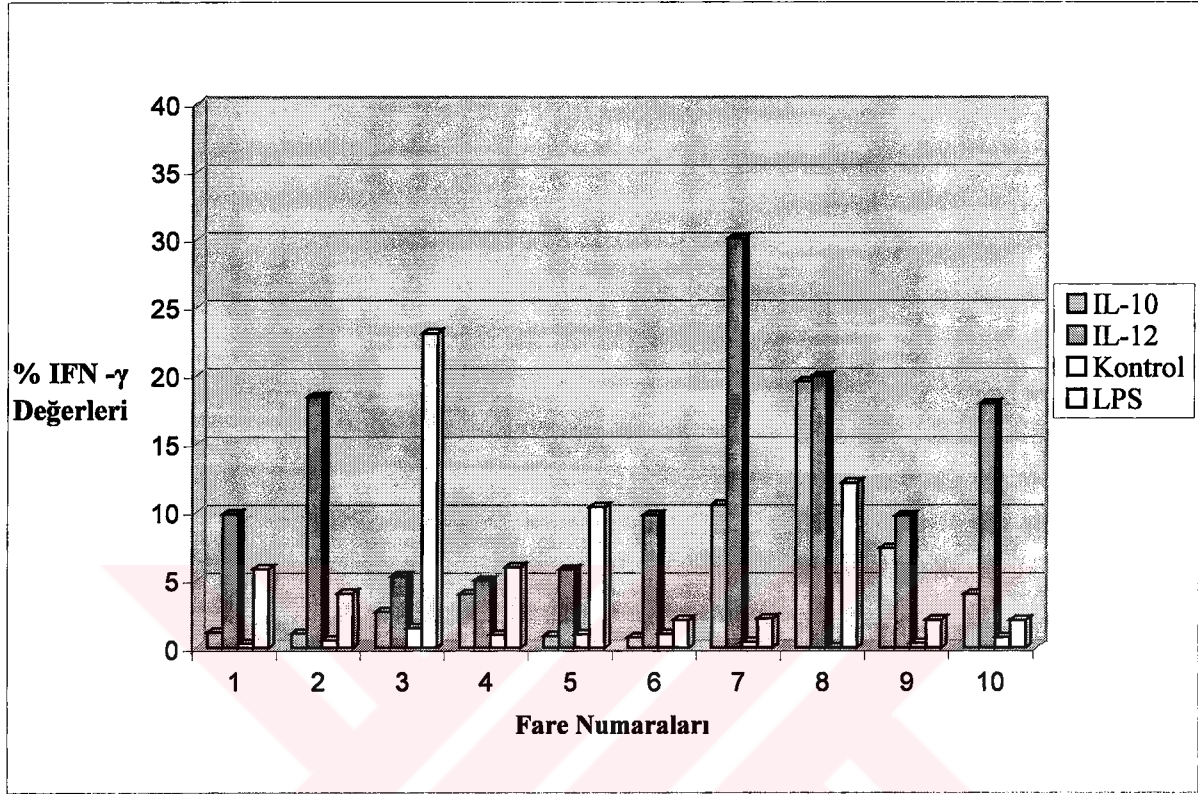
**c-) Kontrol grubu için:**

Kontrol ve LPS Enj. Grubu:

Kontrol grubuna ait farelerin (3. Grup) IFN- $\gamma$  sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositleri (%0.69), LPS Enj. Grubu (4. Grup) fare lenfositlerine göre (%6.98) oldukça düşüktür. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.026 saptandığı için ileri derecede anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

**Tablo-3: Kontrol ile LPS Enj. gruplarının IFN- $\gamma$  açısından değerlendirilmesi.**

DEĞİŞKEN	A	B	A-B	SS	$\rho$
IFN- $\gamma$	Grup 3	*Grup 4	6,2810	2,7141	0,026



Şekil 6. Grupların IFN- $\gamma$  Değerleri

#### **IL-4 değeriendirilmesi:**

##### **a) IL-10 grubu için:**

###### **IL-10 Enj. ve IL-12 Enj. Grubu:**

LPS'yi takiben IL-10 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (1. Grup) IL-4 sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%12,47), IL-12 enjeksiyonu yapılan grubun (2.Grup) fare lenfositlerine göre (% 1,95) oldukça yüksektir. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.001 saptandığı için ileri derecede anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

###### **IL-10 Enj. ve Kontrol Grubu:**

LPS'yi takiben IL-10 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (1. Grup) IL-4 sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%12,47), Kontrol (3. Grup) fare lenfositlerine göre (%0,56) yüksektir. Ancak yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05).

###### **IL-10 Enj. ve LPS Enj. Grubu:**

LPS'yi takiben IL-10 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (1. Grup) IL-4 sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%12,47), LPS Enj. Grubu (4. Grup) fare lenfositlerine göre (%6,44) yüksektir. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.045 olduğu için anlamlı fark bulunmuştur. (p<0.05).

**Tablo-4: IL-10 grubu ile diğer grupların IL-4 açısından değeriendirilmesi.**

<b>DEĞİŞKEN</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A-B</b>	<b>SS</b>	<b>ρ</b>
<b>IL-4</b>	Grup 1	<b>*Grup 2</b>	10,5260	2,8968	0,001
		<b>*Grup 3</b>	11,9100	2,8968	0,001
		<b>*Grup 4</b>	6,0250	2,8968	0,045

**b) IL-12 grubu için:**

IL-12 Enj. ve Kontrol Grubu:

LPS'yi takiben IL-12 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (2. Grup) IL-4 sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%1,95), Kontrol (3. Grup) fare lenfositlerine göre (%0,56) yüksektir. Ancak yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.636 saptandığı için anlamlı fark bulunamamıştır (p>0.05).

IL-12 Enj. ve LPS Enj. Grubu:

LPS'yi takiben IL-12 enjeksiyonu yapılan fare grubunda (1. Grup) IL-4 sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositler (%1,95), LPS Enj. Grubu (4. Grup) fare lenfositlerine göre (%6,44) düşüktür. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.126 olduğu için anlamlı fark bulunamamıştır (p>0.05).

**Tablo-5: IL-12 grubu ile diğer grupların IL-4 açısından değerlendirilmesi.**

DEĞİŞKEN	A	B	A-B	SS	ρ
IL-4	Grup 2	Grup 3	1,3840	2,8968	0,636
		Grup 4	-4,5010	2,8968	0,126

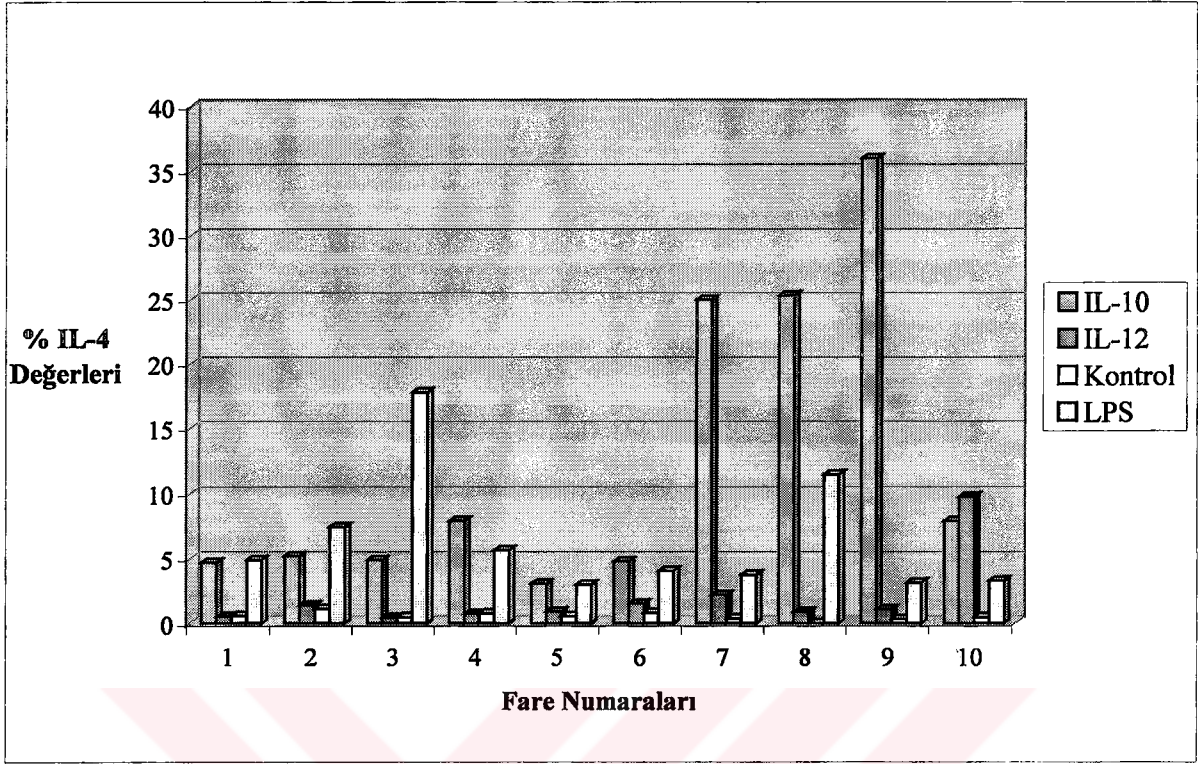
**c-) Kontrol grubu için:**

Kontrol ve LPS Enj. Grubu:

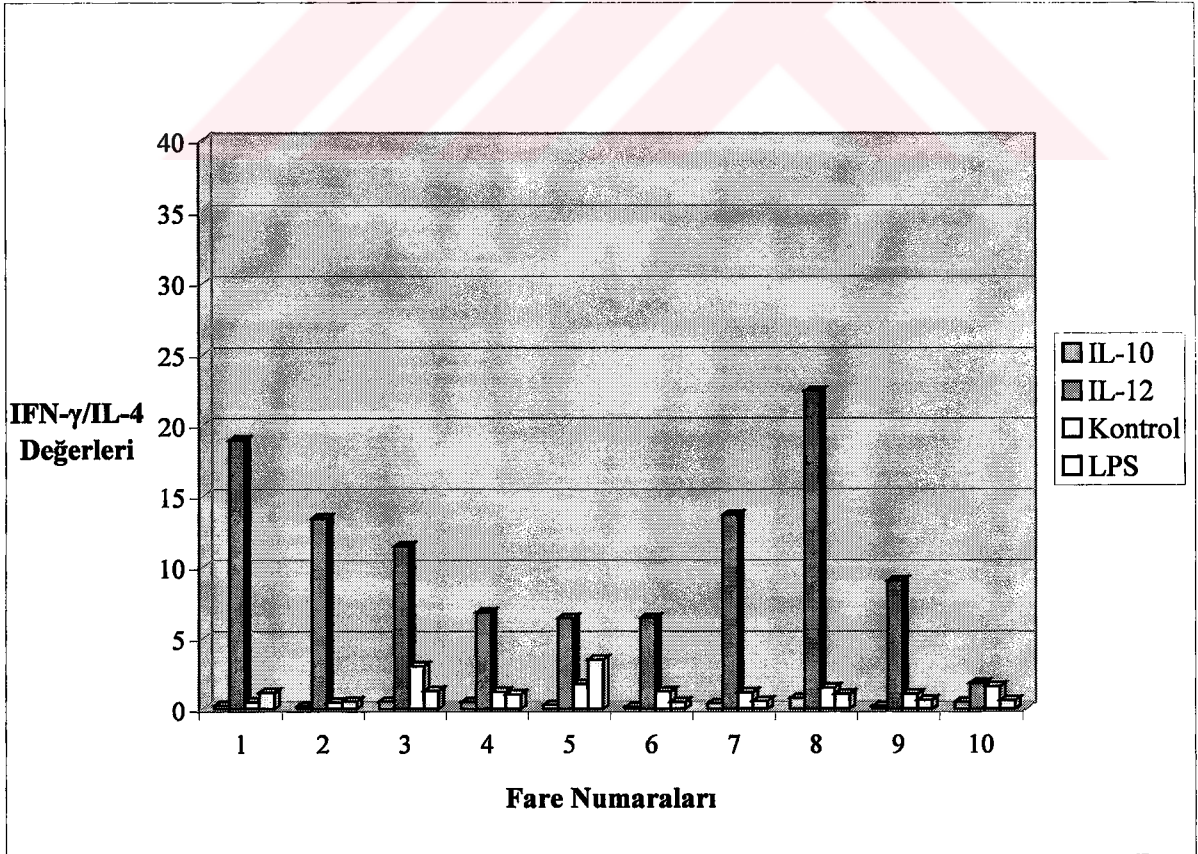
Kontrol grubuna ait farelerin (3. Grup) IL-4 sitokini salgılayan CD<sub>3</sub><sup>+</sup> lenfositleri (%0.56), LPS Enj. Grubu (4.Grup) fare lenfositlerine göre (%6.44) oldukça düşüktür. Yapılan tek yönlü ANNOVA istatistiksel analizinde p=0.050 saptandığı için anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

**Tablo-6: Kontrol ile LPS Enj. gruplarının IFN-γ açısından değerlendirilmesi.**

DEĞİŞKEN	A	B	A-B	SS	ρ
IL-4	Grup 3	*Grup 4	-5,8850	2,8968	0,050



Şekil : 7 Grupların IL-4 Değerleri



Şekil 8: Grupların IFN-γ/IL-4 Oranlarının Değerlendirilmesi

## 5. TARTIŞMA

Kindborg'un 1905 yılında farenin peritonuna letal doz pnömokok enjeksiyonu ile oluşturmaya çalıştığı kayıtlı ilk deneysel peritonit çalışmasından bu yana bakteri kullanarak yapılan peritonit ve sepsis modelleri günümüzün önemli araştırma konuları arasında yerini korumaya devam etmektedir. Deneysel peritonit ve sepsis modellerinin yaklaşık yüzyıllık gelişimi esnasında, özellikle anti-mikrobiyal ve anti-enflamatuar ilaçların özel patojenlere veya enflamatuar ajanlara karşı etkilerini incelemek bir çok araştırmacı için ilgi odağı olmuştur. Söz konusu modeller çalışılırken özellikle pro-enflamatuar sitokinlerin salgılanması sonucu immün sistemin baskılanmasına veya aktive edilmesine sebebiyet veren bir dizi immüno-enflamatuar reaksiyon indüklenir. Bu reaksiyonların çoğalması ile organizmanın yaşamasına engel olan bir seri patofizyolojik hasar gözlenir, hasarların şiddeti artar ve septik şok sendromu halini alır. Septik şokun oluşumu ile birlikte enfeksiyonların neden olduğu komplikasyonların ortaya çıkması ve multi organ yetmezliğinin gelişimi sonucunda ölüm yüzdesinin yüksekliği, gelişmiş ülkelerde karşılaşılan önemli bir sağlık sorunu olarak belirtilmektedir.(1-5,11-16,2022,32-35,41,54-59,71,76,81-83,91-95,126,

Diğer yandan pro-enflamatuar sitokinlerin aktivite veya baskılama özelliklerini ortaya koymada, sadece serum değerlerini belirlemek yanıltıcı sonuçlara neden olabilmektedir.(47,65)

Zira pro-enflamatuar sitokinlerin periferik dolaşımında yarılanma ömürleri kısadır. Ayrıca kanda çözünür doğal inhibitörler bulunmaktadır.(interlökin-1 antagonisti, tümör nekroz faktör- $\alpha$  reseptörleri...) (65)

Bahsedilen dezavantajlardan dolayı, günümüzde yapılan sepsisle ilgili klinik ve deneysel çalışmalarda, periferik kan lenfositlerindeki hücre içi sitokin düzeylerinin incelenmesi tercih edilmektedir. Bu şekilde, immün sistemin T lenfositlerindeki Th1 ve Th2 hücre tipi sitokinlerinin tayini sayesinde, T lenfositlerin Th1 veya Th2 yönü reaksiyonlarından hangisine yöneldiği en geçerli yolla saptanmaktadır. (14-18,35-39,57-59,77,123,125)

Son 30 yıl içinde yapılan araştırmalara bakıldığında Witcherman ve ark. (1980), sepsis çalışmalarında çeşitli intraabdominal sepsis hayvan modellerini geliştirmişlerdir.. Özellikle antimikrobiyal ajanları deneme açısından , Browder ve ark. (1987) E. coli , Matsushita ve ark.(1989) E.coli, Matsomoto ve ark. (1991) E.coli, S.aureus ve C. Albicans, Williams ve ark. (1993) Lippopolisakkarid, Malaviya ve ark. (1994,1995) E.coli, Tokunaga ve ark. (1997) E. coli, Kristof ve ark. (1998) lipopolisakkarid kullanarak fare peritonit sepsis modelini incelemişler ve oluşan peritonit-sepsis modellerinde kısa sürede lokal immün yanıt aldıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca lokal makrofajlar, nötrofil granülositlerin artışı ile birlikte sayı ve aktivite olarak yükselme gösterdikleri, Malaviya ve ark. (1994), Ayala ve Chaudry (1996) tarafından yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.(44,77,81,103,123,126)

Bununla birlikte bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda, kan dolaşımına duktus torakisi kullanarak lenfatik sistem yoluyla bakteriler aktarıldığını ve inokulasyondan 30 dakika sonra bakteri sayısında bakteriyemiye yol açacak seviyeye ulaşıldığını bildirmişlerdir. (77,81,123,126)

Belirtilen bakteriyemik tablonun enfeksiyonun şiddetini işaret etme açısından çok da gerekli olmadığını ve fareye verdiği morfolojik hasar dışında bakteriyal ajan uygulandıktan birkaç saat sonra dahi enfeksiyonun net olarak tespit edilemeyebileceği söylenmektedir. (81)

Bunun yanında interlökin sistemi hızla indüklenebileceği ve kompleman sistemi şelalesi ile immunoglobulinlerin akut fazının yoğunluğunun artışı sonucunda, immün sistem cevabı oluşturabileceği görüşü ileri sürülmüştür. (Echtenacher ve ark. 1995-96, Ayala ve Chaudry 1996, Takashima ve ark. 1997) Bakterilerin birçoğunun letal enfeksiyona neden olduğu büyüme eğrilerinde (invivo) invitro kültürlerindeki benzer bir tablo gösterdiği belirtilmektedir. Özellikle yükselme fazı sonrası giderek artan bir çoğalmayı takiben ikinci etapta bir durgunluk fazı, sonuçta ise hayvanların öldüğü azalma fazı tablosu ortaya konmaktadır.(44,77,123)

Diğer yandan, özellikle son yıllarda, farelere E.coli'den elde edilen LPS (lipopolisakkarid) enjekte edilerek oluşturulan sepsis modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinler araştırılmaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan araştırmalarda, gram negatif veya gram pozitif bakterilere cevap olarak salgılanan proinflamatuar sitokinlerin immün sisteme etkisi, ortaya çıkan immünoenflamatuvar reaksiyonların indüksiyonu ile görülen patofizyolojik reaksiyonların şiddeti ve ilerleyen dönemde gözlenen septik şok sendromunun tedavisine yönelik uygulanan anti-enflamatuvar sitokinlerin yaptıkları etkiler gösterilmiştir.(69,88,93,94)

Anti-enflamatuar sitokinlerden olan interlökin-10 (IL-10), tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-12 (IL-12) gibi sitokinlerin etkilerini bloke eden , hücrel immünite üzerine baskılayıcı rol oynayan özelliktedir. Bu sitokinin septik hayvanlara uygulanması sonucunda elde edilen veriler farklılık göstermektedir. Ertel ve ark. (1999), farelerde E.coli LPS endotoksemisi oluşturdukları araştırmalarında tedavi amacıyla IL-10 kullanmışlar ve IL-10 sitokininin E.coli-LPS kaynaklı sistemik enflamasyonu ve endotoksinin indüklediği mortaliteyi azalttığını belirlemişlerdir.(45-57,60,67-77,88-95,100-107,125-128)



Aynı şekilde, farelerde, Leon ve ark.(2000), düşük ve septik doza yakın iki farklı LPS dozu uygulayarak yaptıkları araştırmada IL-10 tedavisinin sepsiste antipiretik etkisini açıklamışlardır. Lally ve ark. (1999), ise neonatal dönemdeki E. coli kaynaklı sepsiste ki farelere, fare başı 50 ng IL-10 uygulaması ile sağ kalım süresini arttırdığını rapor etmişlerdir.(24,83)

Napolitan ve ark.nın yaptıkları çalışmada hem femur frakturu ile travma yapılan hem de E.coli verilen farelerde, IL-10 tedavisinin sağ kalım süresini arttırdığı ve tedavinin erken döneminde Th2 sitokini olan IL-4 düzeyini yükselttiği söylenmektedir. Weighardt ve ark.ise travmanın geç döneminde özellikle IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 gibi Yardımcı T-lenfosit-2 (T-Helper-2= Th2) tip sitokinlerin baskın duruma geçtiğini, buna karşın Yardımcı T-lenfosit-1 (T-Helper-1= Th1) tip interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ve IL-12 gibi sitokin sekresyonunun azaldığını ve bu sitokin profilinin sepsise bağlı mortaliteyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.(42,68)

Bu konuda, Dormant, Faist, Stephan, Wichmann, Xu ve arkadaşları tarafından, immün fonksiyonun sitokin kaskadına bağlı değişiminde farklı çalışmalar ile benzer immünopatolojik sonuçların elde edildiğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar sepsise bağlı mortalitede, T-lenfosit-2 (T-Helper-2= Th2) tipi sitokinlerin (IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 gibi) baskın, buna karşın yardımcı T-lenfosit-1 (T-Helper-1= Th1) tip IFN- $\gamma$  ve IL-12 sekresyonunun azlığı şeklinde bir sitokin profili ile ilişkili olabileceği görüşünü ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada çekum ligasyonu yapılmış grupta bazı farelerin bazılarında Th1 grubunun, bazılarında ise Th2 grubunun intrasitoplazmik sitokinleri değerleri daha yüksek olduğu açıklanmıştır.(44,52,123)

Sonuç olarak, splenosit proliferasyonlarında, T lenfositlerinden (interlökin-2) IL-2, (interferon-gamma) IFN- $\gamma$  ve interlökin-3 (IL-3) salgılanmasında ve makrofajlardan (tümör nekroz faktörü-alfa) TNF- $\alpha$ , interlökin-1(IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) sekresyonunda diğer gruplara göre önemli oranlarda azalma saptanmıştır. Makrofajların antijen presentasyonu bozulmakla beraber; fagositoz oranı, süperoksit formasyonu ve prostaglandin E<sub>2</sub> miktarları artmaktadır.(15-19,31-38,55,68-71,77,89,108,117,128)

Bunun yanında T-Helper-1 (Th1) sitokinlerinden olan IL-12'nin , gram (-) ve (+) mikroorganizmalara karşı gelişen immün cevapta IFN- $\gamma$  sekresyonunun, ve dolayısıyla sitotoksik T lenfositlerinin ve natural killer (NK) sitotoksitesinin artırılmasında önemli sorumluluklar yüklendiği gösterilmiştir. Ancak aşırı IL-12 uygulanması deney hayvanlarında ölümcül etkilere yol açabilmektedir. Andreas ve ark.nın yaptıkları çekum ligasyonu-ponksiyonuyla oluşturulan sepsis modelinde ve neonatal septik kemirgenlerde IL-12 nötralizasyonu hayvanlardaki mortaliteyi artırırken; diğer sepsis modellerinde azaltabileceği ileri sürülmüştür.(81,123)

Ono ve ark. nın farelerde yaptıkları septik peritonit modelinde yer alan ağır sepsisli hayvanlarda serum IFN-gamma düzeylerinin düşük olduğunu, IL-12 tedavisi ile bu değerlerin anlamlı derecede yükseldiğini ve sağ kalım sürelerinin arttığını gözlemişlerdir. Steinhauser ve ark. nın yaptıkları bir diğer fare çalışmasında IL-12 'nin LPS ile oluşturulmuş akut septik peritonitte ki rolü incelenmiş ve IL-12 uygulamasının IFN-gamma düzeyini yükselterek sağ kalım süresini arttırdığı belirtilmiştir.(54,63,69,70)

Ağır travmalı hastalarda görülen "T hücre anerjisi" antijene duyarsızlık ve deri testi antijenlerine karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabının olmaması durumudur.(7,46)

Puyana ve ark. tarafından yapılan çalışmada, anejik hastalarda mortalitenin daha fazla; T hücre proliferasyon değerlerinin ise multiorgan failure (MOF) ve Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE III) skorlarıyla ters orantılı olduğu bildirilmiştir . Bu hastaların in vitro T hücre kültürlerinde IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN- $\gamma$  olmak üzere gerek  $T_H1$  gerekse  $T_H2$  tip sitokin sekresyonları düşük bulunmuş; baskın olarak  $T_H2$  tip T lenfosit klonlarına sahip hastalarda daha sonradan anerji gelişme oranının çok daha düşük olduğu belirtilmiştir.(46)

Ashında gerek insanlarda yapılan çalışmalarda, gerekse hayvan modellerinde septik uyarı sonucu hem IL-12 gibi proinflamatuvar  $T_H1$  tip , hem de bunların aşırı zararlı etkilerini modüle etmek için buna paralel olarak antiproinflamatuvar IL-10 gibi  $T_H2$  tip sitokinlerin salgılanmasının indüklendiği; anerji gibi her iki tip sitokinin salgılanmaması veya bu dengenin biri lehine bozulması durumunda ise multiorgan yetmezlikleriyle mortalitenin arttığı düşünülmektedir.(46,62,63,72)

Bu proinflamatuvar sitokinlerin periferik sirkülasyonda yarılanma ömürlerinin son derece kısa olması ve kanda çözünür TNF reseptörleri , IL-1 antagonisti gibi doğal inhibitörlerin bulunması nedeniyle sadece kan düzeylerinin araştırılması, yanıtıcı sonuçlara yol açtığı bilinmektedir. Bu yüzden, son yıllarda sepsisli hastalarda yapılan çalışmalarda özellikle periferik kan lenfositlerindeki (=PKL) intrasitoplasmik sitokin düzeyleri araştırılmış ve yüksek düzeylerde IL-8 sitokini tespit edilmiştir. İmmün sistemde  $T_H1$  mi yoksa  $T_H2$  mi reaksiyonların geçerli olduğu en geçerli olarak T lenfositlerindeki intrasitoplasmik IL-4 ve IFN- $\gamma$  tayiniyle saptanmaktadır. (47,51,53,55,88,106)

Sepsiste gerek IL-12'nin gerekse IL-10'nun ayrı ayrı önemli rolleri bulunmaktadır. IL-12 genelde hücresel immünyetede bir aktivasyon oluşturup mikroorganizmalara karşı gelişen immün cevabı artırırken, IL-10 sekresyonunu da artırmakta ve bu da aşırı gelişen ve zararlı olabilecek

immünolojik reaksiyonları baskılamaktadır. Ayrıca IL-10'nun immünolojik anejyiy önlemede rolü olduğu düşünölmektedir. IL-12'nin %25 yanık/ÇLP modelinde mortaliteyi azaltıcı etkisi IL-12'nin direkt IFN-γ sekresyonunu fazlalaştırarak hücresele immüniteyi arttırmasının yanısıra, IL-10 düzeylerini yükseltmesinden de kaynaklanabilir.(7,57,62,63,70-72,78,126)

Bu arada yukarıda sayılan sitokinlerin etkilerinin incelenebileceği modeli öncelikle ortaya koymak gerekir. Bir çok araştırmacı değişik LPS dozları kullanmışlardır. Farelere uygulanan ve 2.5 mg/kg i.p.'den 80 mg/kg i.p. ile 30µg/kg i.v.'den 3 mg/kg i.v.'ye kadar farklılık gösteren bu miktarlar, araştırmacılar tarafından çalıştıkları laboratuvar koşuluunun ve deney hayvanı üretim yerinin özellikleri gözönüne alınarak belirlenmiştir. Ayrıca oluşturacağı sepsis veya endotoksemi modelinin şiddetinin derecesine göre de uygulama yolu ve miktarı saptanmıştır.(44,46,52,54,63,69,70,81,123)

Bu genel bilgilerden yararlanarak çalışmamızda kullandığımız Balb/c soyu farelere dört ayrı dozda uyguladığımız LPS miktarlarından 15 mg/kg i.p. dozu, ön deney sonuçları ışığı altında belirlenmiştir. Saptanan LPS dozu, Laubach ve ark., Mac Micking ve ark. , Wei ve ark. 'nın çalışmalarında ki doz ile aynı iken, Quan ve ark. (40 mg/kg i.p.) Kristoff ve ark. (25 mg/kg i.p.), Leon ve ark. (2.5 mg/kg i.p.)' nın yaptıkları çalışmalardaki dozdan farklı olmasına karşın görölen fizyolojik özellikler (ateş, lökosit değerleri, kabarık tüyler, gözlerde yaşarma, hareketsizlik, takipeni, taşikardi...) ve sağ kalım süreleri açısından benzerlik taşımaktadır.(83,119,130)

Deney hayvanı türü ve soyu seçildikten ve sepsis modeli ortaya konduktan sonra, çalışmamızda, T<sub>H</sub>1 ve T<sub>H</sub>2 oranlarında kilit rol oynayan IL-10 ve IL-12 sitokinlerinin etkileşimi, "E.coli-LPS" ile oluşturulmuş sepsis modelinde birlikte araştırılıp, sağ kalım sürelerine paralel olarak intrasitoplasmik IL-4 ve IFN-γ tayiniyle T<sub>H</sub>1 ve T<sub>H</sub>2 oran kinetiği saptanmaya çalışılmıştır.

Özellikle  $T_H1$  ve  $T_H2$  olmak üzere her iki tip sitokin profilinin gelişmediği septik anerjik hastalarda gelecekte uygulanacak immünoterapötik girişimlerde terapötik açısından yol gösterici olacağı düşünülmüştür .

Çalışmamızı IFN- $\gamma$  düzeyleri açısından değerlendirdiğimizde, IL-10 verilen grup ile sadece LPS enjeksiyonu yapılan grup arasında anlamlı olmayan ( $p=0.52$ ) bir farklılık söz konusu iken IL-12 verilen grup ile LPS grubu arasında ki farklılık anlamlı düzeydedir ( $p=0.03$ ).

Diğer yandan IL-12 verilen gruba ait IFN- $\gamma$  seviyesi IL-10 verilen gruba göre yüksek ve anlamlılık taşımaktadır ( $p=0.006$ ). IL-12'nin immün sistemi  $Th1$  (IFN- $\gamma$ ) sekresyonu, tarafına yönlendirmekte olduğu ve Ono, Nemeth ve Dormant'ın yaptıkları çalışmalar ile paralellik taşıdığı görülmektedir. (69,70,127)

Bunun yanında IL-10 grubunda gözlenen IFN- $\gamma$  sekresyon azalışı, immün sistemin  $Th2$  lenfositleri üzerinden yönlendiğini işaret etmektedir. IL-10 verilen gruba ait IFN- $\gamma$  değerlerinde ki düşüklük o derece etkilidir ki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir düzeyde farklılık ortaya çıkmaktadır ( $p=0.106$ ).

Ayrıca gerek sadece LPS verilen grubun gerekse LPS+IL-12 verilen grubun IFN- $\gamma$  sonuçları kontrol grubu sonuçlarına göre oldukça yüksektir ve hayli anlamlı bir farklılık gözlenmektedir. ( $p < 0.05$ ).

Bu verilere göre, LPS' nin kısmen uyardığı IFN- $\gamma$ ' yı, IL-12 uygulanmasının daha çok arttırdığı, buna karşılık IL-10 verilmesinin söz konusu bu artışı engellemeye yönelik bir etki gösterdiği görülmektedir.

IFN- $\gamma$  düzeyini arttıran ve anti-enflamatuar sitokin olan IL-12, immün yönelimi  $Th1$  tarafına çekmeye çalışmakta ve sepsisin SIRS'e ilerlemesini engelleyerek sağ kalım süresini uzatmaktadır. Bu sonuç, Zisman, O'Sullivan, Jansen ve Steinhäuser'in yaptıkları araştırmalarla uyumludur.(48,54,63,125)

Diğer yandan Th2 sitokini olan IL-4 seviyeleri açısından bir değerlendirme yapacak olursak, IL-12 verilen grupta, LPS grubuna göre anlamlı olmayan bir yükseklik ( $p=0.126$ ) mevcut iken IL-10 verilen ile IL-12 verilen gruplar karşılaştırıldığında fark anlamlı olmaktadır ( $p<0.05$ ). Bu sonuç Poll'un çalışması ile yakınlık göstermektedir.(60,72,84,86,125)

Sadece LPS uygulanan grup ile IL-10 verilen gruba ait sonuçlar kıyaslandığında, IL-4 düzeyi, IL-10 grubunda hayli anlamlı bir seviyeye yükseldiği( $p=0.04$ ) ve Napolitan ve Pajkrt'in çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ancak Song'un çalışması ile uyumlu değildir.(68,77,84)

Bununla birlikte LPS uygulanan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir yükseklik vardır ( $p=0.050$ ). Borrisova'nın çalışması ile paralellik göstermektedir.(81.123)

IL-10 grubunda bu seviye farkı korunmuş ama anlamlı bir düzeye inmiştir ( $p< 0.05$ ).

IL-12 verilen grupta ise IL-4 değerleri daha fazla düşmüş ve kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir düzeye gerilemiştir ( $p= 0.064$ ).

IL-10 verilmesi Th2 yönünde bir cevap gelişimini indüklemektedir ve bu şekildeki LPS-fare modeli sepsis insan sepsisindeki SIRS tablosuna yakındır. Bu açıdan Jansen, Steinhauser, Poll, Klava, Mack, Samuel Ann ve Kavanagh'in çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.(23,43,54,63,74,87,125)

Bu sonuçlar, IL-10 uygulaması ile Th2 lenfositleri üzerinden IL-4 değerlerinin anlamlı bir şekilde etkilenecek arttığını ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak,

1- LPS'nin uyardığı IFN-gammayı IL-12 uygulamasının daha çok arttırdığı buna karşılık IL-10 verilmesinin LPS ile indüklenen intrasitoplazmik IFN- $\gamma$  ekspresyonunu engellemeye yönelik anlamlı bir etki gösterdiği, LPS'nin uyardığı IL-4 'ün IL-12 uygulamasıyla inhibe edildiği fakat IL-10 ile ise aynı sitokinin anlamlı ( $p=0.001$ ) düzeyde uyarıldığı çalışmamızda elde ettiğimiz en önemli bulgudur.

2- Sepsiste intrasitoplazmik sitokin tayini, Th1 veya Th2 cevabın gelişim yönüne göre monitörizasyon açısından pratik olarak uygulanabilir. Bu şekilde hızla sonuca götüren bir metod karşımıza çıkmaktadır.

3- LPS-sepsis modeli severe immunologic response sendromu (SIRS) ile uyuşmaktadır. Aşırı Th1 cevabı söz konusudur ve mortaliteye götürür, böyle bir durumda IL-10 verilmesinin deney hayvanı çalışmalarında olduğu gibi tedavi açısından yararlı olabileceği belirtilebilir.

Çalışmamızın verilerinin, hem prognozu takip hem de sepsis tipini belirlemede ve buna yönelik sitokin tedavisi uygulamasında yol gösterici olacağı kanısındayız.

## 6. ÖZET:

Sepsis sendromu; hastanede tedavi gören hastalarda ölüm ve hastalığa yakalanma nedeni olarak, yaklaşık % 40'lık ölüm oranıyla önemli bir yer tutmaktadır. Sepsise, streptokoklar, stafilokoklar, pnömokok, E.coli ve pseudomonas gibi bakterilerin neden olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu bakterilerden E.coli, gram (-) bakteriyemilerin en sık karşılaşılan etkenidir ve çeşitli tedavilerin (sitokinler) denendiği deneysel sepsis modeli uygulamalarında tercih edilmektedir .

Çalışmada amacımız, E.coli hücre duvarı komponenti olan LPS ile oluşturulmuş endotoksik şok sendromu modelinde, intrasitoplasmik IFN- $\gamma$  ve IL-4 tayiniyle  $T_{H1}$  ve  $T_{H2}$  oran kinetiğinin belirlenmesi,  $T_{H1}$  ve  $T_{H2}$  oranlarında anahtar rol oynayan IL-12 veya IL-10 sitokinlerinin tedavi amaçlı uygulanmasıyla bu oranların ne oranda değişeceğinin saptanmasıdır.

Araştırma için  $25.0 \pm 1.0$  g. ağırlığında Balb/c soyu, 40 adet erkek fare seçildi. 15 mg/kg LPS dozu i.p. yolla hayvanlara enjekte edildi.

**1.Grup:**Kontrol grubu; sadece i.p. serum fizyolojik (%0.9 NaCl) uygulandı.

**2.Grup:**LPS grubu; 1. gün 15 mg/kg LPS dozu i.p. uygulandı.

**3.Grup:**LPS+ IL-12 grubu;15 mg/kg LPS uygulanmasını takiben enjeksiyondan 30 dak. sonra başlamak üzere gün aşırı 25 ng, toplam 10 gün, IL-12 i.p. uygulandı.

**4.Grup:**LPS+IL-10 grubu; 15 mg/kg LPS verilmesini takiben enjeksiyondan 30 dak. sonra sadece 1.gün 0,5  $\mu$ g IL-10 i.p. verildi.

İntrasitoplasmik sitokin (IL-4 ve IFN- $\gamma$ ) tayini, Facs Calibur Flow Sitometri cihazı ile yapıldı.

İstatistiksel analizde SPSS 10.0 ile One Way Anova testi kullanıldı.

Analiz sonuçlarına IFN- $\gamma$  değerleri açısından bakıldığında, IL-10 verilen grup ile sadece LPS enjeksiyonu yapılan grup arasında anlamlı olmayan ( $p=0.52$ ) bir farklılık söz konusu iken IL-12 verilen grup ile LPS grubu arasında ki farklılık anlamlı düzeyde olduğu saptanmıştır ( $p=0.03$ ). Diğer



yandan IL-12 verilen gruba ait IFN- $\gamma$  seviyesinin IL-10 verilen gruba göre yüksek ve anlamlılık taşıdığı gözlenmiştir ( $p=0.006$ ).

IL-10 verilen gruba ait IFN- $\gamma$  değerlerinde ki düşüklük o derece etkilidir ki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir düzeyde farklılık ortaya çıkmaktadır( $p=0.106$ ). Ayrıca gerek sadece LPS verilen grubun gerekse LPS+IL-12 verilen grubun IFN- $\gamma$  sonuçları kontrol grubu sonuçlarına göre oldukça yükseklik ve hayli anlamlı bir farklılık gözlenmektedir ( $p< 0.05$ ).

Bununla birlikte IL-4 düzeyleri değerlendirildiğinde, IL-12 verilen grupta, LPS grubuna göre anlamlı olmayan bir yükseklik ( $p=0.126$ ) mevcut iken IL-10 verilen ile IL-12 verilen gruplar karşılaştırıldığında fark anlamlı olduğu görülmektedir ( $p<0.05$ ).

Diğer yandan sadece LPS uygulanan grup ile IL-10 verilen gruba ait sonuçlar kıyaslandığında, IL-4 düzeyi IL-10 grubunda hayli anlamlı bir seviyeye yükseldiği saptanmıştır ( $p=0.04$ ). LPS uygulanan grup ile kontrol grubu arasında ise anlamlı bir yükseklik belirlenmiştir ( $p=0.050$ ). IL-10 grubunda bu seviye farkının korunduğu ama anlamlı bir düzeye indiği ( $p<0.05$ ), IL-12 verilen grupta ise IL-4 değerlerinin daha fazla düştüğü ve kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir düzeye gerilediği gözlenmiştir. ( $p= 0.064$ )

Sonuç olarak, LPS'nin uyardığı IFN-gamma'yı IL-12 uygulamasının daha çok arttırdığı buna karşılık IL-10 verilmesinin LPS ile indüklenen intrasitoplazmik IFN-gamma ekspresyonunu engellemeye yönelik anlamlı bir etki gösterdiği, LPS'nin aktive ettiği IL-4 'ün IL-12 uygulamasıyla inhibe edildiği fakat IL-10 ile ise aynı sitokinin anlamlı ( $p=0.001$ ) düzeyde stimüle edildiği gözlenmiştir.

Bu veriler ışığında, sepsiste, intrasitoplazmik sitokin tayini ile Th1 veya Th2 cevabın, gelişim yönüne göre monitörizasyon açısından pratik olarak uygulanabileceği, bu şekilde hızla sonuca götüren bir metod olarak kullanılabileceği, hem prognozu takip hem de sepsis tipini belirlemede ve buna yönelik sitokin tedavisi uygulamasında yol gösterici olacağı düşünülebilir.

## **7. SUMMARY :**

The incidence of sepsis induced death is %40 in hospitalized patients. The most common organisms are Streptococcus, Staphylococcus, Pneumococcus, E.coli and Pseudomonas. Among them E.coli is the most common gram negative organism and has been used widely in experimental studies.

The aim of our study is to determine the effect of IL-12 or IL-10 cytokine treatment on  $T_{H1}$  and  $T_{H2}$  ratios in endotoxemic shock caused by LPS cell wall of E.coli.

Male Balb/c mice weighed 25 g were used in the study. 15 mg/kg LPS was injected by i.p., group 1 used as control group received %0.9 NaCl i.p., group 2 received 15 mg/kg LPS just once, group 3 received LPS and IL-12 15mg/kg LPS was injected followed by 25ng IL-12 i.p. once in every 2 days. In group 4 LPS 15mg/kg was injected followed by 0,5  $\mu$ g IL-10 i.p 30 min. after just once.

Then determination of intracytoplasmic cytokines (IL-4 and IFN- $\gamma$ ) was done by Facs Calibur Flow Cytometry device. Statistical analysis were done by SPSS 10.0 and One Way Annova test was used.

IFN- $\gamma$  levels were not significant in IL-10 and LPS group. ( $p=0.52$ ) However there was a significant difference in IL-12 and LPS group. ( $p=0.03$ ) On the other hand IFN- $\gamma$  levels were higher in IL-12 group compared to IL\_10 group and the difference was significant. ( $p=0.006$ )

The effect of IL-10 on IFN- $\gamma$  levels were highly effective and when compared to control group the difference was not significant. ( $p=0.106$ )

Also results of IFN- $\gamma$  were higher and statistically significant in both LPS and LPS-IL-12 groups.

IL-4 levels were higher in IL-12 group compared to LPS group. However the difference was not statistically significant. (p=0.126) On the other hand the difference was significant in IL-10 and IL-12 groups (p<0.05)

IL-4 levels were higher in LPS group compared to IL-10. (p=0.04) There was also a significant difference between IL-10 and control groups (p=0.05). The difference was similar but reduced to significant levels in IL-10 group (p<0.05) In IL-12 group IL-4 level were reduced more significantly and were in normal levels compared to control.(p=0.064)

In conclusion IFN- $\gamma$  induced by LPS was augmented by IL-12. However IL-10 prevented the expression of LPS induced intracytoplasmic IFN- $\gamma$ . IL-4 activated by LPS was inhibited by IL-12 but has been stimulated by IL-10 (p=0.001)

Thus  $T_{H1}$  or  $T_{H2}$  can be used practically to monitor the intracytoplasmic cytokines in sepsis. This is an effective and fast method to determine both the type and prognosis of sepsis. It is also an effective way to determine the effect of cytokine treatment.

## **8. ÖZGEÇMİŞ :**

1967 İstanbul doğumluyum. Arnavutköy ilkokulu ve Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi'ni bitirdim. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji'den sonra İ.Ü. DETAE Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dal'nda Yüksek Lisans yaptım. 1997 yılında İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime başladım. Halen İ.Ü. DETAE Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve 2 kız çocuğum var.

## 9. KAYNAKLAR :

- 1.Unat EK. Temel Mikrobiyoloji, İstanbul, Bölüm 3, sayfa 141-150, 1985.
- 2.Bone RC. Mechanisms of Sepsis. Definitions and Therapy of Sepsis, 229-237, 1993.
- 3.Cain BS, Meldrum DR, Harken AH, Mc Intyre RC. The Physiologic Basis for Anticytokine Clinical Trials in the Treatment of Sepsis. J Am Coll Surg, 186(3), 337-350, 1998.
- 4.Spapen HD, Diltoer M, Huygens LP. Passive Immunotherapy of Gram-Negative Bacteremia, Sepsis and Septic Shock. Acta Clin Belg, 48(1), 20-29, 1993.
- 5.Darville T, Giroir B, Jacobs R. The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Immunology and Potential Immunotherapy. Infection 21, Medizin Verlag GmbH, München. 5, 279-290, 1993.
- 6.Baker DG. Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats and Rabbits and Their Effects on Research. Clinical Microbiology Reviews,11(2), 231-266, 1998.
- 7.Cabıoğlu N. Travmalı hastalarda immunolojik fonksiyonların değerlendirilmesi. I. Travma ve Acil Cerrahi Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu Kitabı, 115-128, 1999.
- 8.Unat EK. Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi, 542-552, 1986.
- 9.Çetin ET. İnfeksiyon Hastalıkları, İst. Tıp Fak.Klinik Ders Kitapları, 120-187, 1987.
- 10.Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS. Principles of Internal Medicine, Part 3, 474-478, 1987.
- 11.Büyüköztürk K. İç Hastalıkları, İst.Tıp Fak, 1992; (11): 875-995.

12. David SA, Silverstein R, Amura CR, Kielian T, Morrison DC. Lipopolyamines : Novel Antiendotoxin Compounds That Reduce Mortality in Experimental Sepsis Caused by Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 912-919.
13. Dhainaut JP, Thijs LG, Park G. Septic Shock. *The New England Journal of Medicine*, 343(6), 447-448, 2000.
14. Polgreen PM. Infectious Disease: Sepsis. *University of Iowa Family Practice Handbook, Fourth Edition*, Chapter 10.
15. Cunha BA. Sepsis; Bacterial. *Instant Access To The Minds Of Medicine*, Section 10, 2001.
16. Opal SM, Cohen J. Clinical Gram-positive sepsis, Does it fundamentally differ from Gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med*, 27, 1608-1616, 1999.
17. Baron S. *Medical Microbiology*. Section 1, 1996.
18. Baron S. *Medical Microbiology*. Section 5, 1996.
19. Bone RC. Sir Isaac Newton. Sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med*. 7, 1125-1128, 1996.
20. Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med*, 27, 10- 32, 2001.
21. Helmann J, Warren S. Antiendotoxin Strategies. *Bacterial Sepsis and Septic Shock* , 13(2), 371-386, 1999.
22. Ertel W, Keel M, Steckholzer U, Ungethum U, Trentz O. Interleukin-10 Attenuates the Release of Proinflammatory Cytokines but Depresses Splenocyte Functions in Murine Endotoxemia. *Arch. Surg*. 131, 51-56, 1996.
23. Mc Carter MD, Mack VE, Daly JM, Naama AH, Calvano SE. Trauma-induced alterations in macrophage function. *Surgery*, 123, 96-101, 1998.
24. Lally KP, Cruz E, Xue H. The Role of Anti-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-10 in Protecting Murine Neonates From *Escherichia coli* Sepsis. *Journal of Ped. Surg*, 25, 852-855, 1999.

25. Zhang H, Peterson JW, Niesel DW, Klimpel GR. Bacterial Lipoprotein and Lipopolysaccharide Act Synergistically to Induce Lethal Shock and Proinflammatory Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 159, 4868-4878, 1997.
26. Kohler J, Heumann D, Garotta G, Leroy D, Bailat S, Barras C, Baumgaertner JD, Glauser MP. IFN- $\gamma$  Involvement in the Severity of Gram-Negative Infections in Mice. *The Journal of Immunology*, 151, 916-920, 1993.
27. Norimatsu M, Morrison DC. Correlation of Antibiotic Induced Endotoxin Release and Cytokine Production in Escherichia coli- Inoculated Mouse Whole Blood Ex Vivo. *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 1302-1307.
28. Iwagaki A, Porro M, Pollack M. Influence of Synthetic Antiendotoxin Peptides on Lipopolysaccharide(LPS) Recognition and LPS-Induced Proinflammatory Cytokine Responses by Cells Expressing Membrane-Bound CD14. *Infection and Immunity*, 68, 1665-1663, 2000.
29. Wyckoff TJO, Raetz CHR, Jackman JE. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. *Trends in Microbiology*, 6, 154-159, 1998.
30. Norton JA. Biological Therapy of Sepsis. *Annals of Surgery*, 220, 599-606, 1994.
31. Tobias PS, Tapping RI, Gegner JA. Endotoxin Interactions with Lipopolysaccharide- Responsive Cells. *Clinical Infectious Diseases*, 28, 476-481, 1999.
32. Fijen JW, Kobold ACM, de Boer P, Jones CR, van der Werf TS, Cohen JW, Zijlstra JG, Tulleken JE. Leukocyte activation and cytokine production during experimental human endotoxemia. *European J of Internal Medicine*, 11(2), 89-95, 2000.
33. Delude RL, Savedra R, Zhao H, Thieringer R, Tamamoto S, Fenton MJ, Golenbock DT. CD14 enhances cellular responses to endotoxin without imparting ligand-specific recognition. *Cell Biology*, 92(9), 9288-9292, 1995.

34. Cofran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. Pathologic Basis of Disease, Chapter 4, 117-121, 5.Edition.
35. Cofran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. Pathologic Basis of Disease, Chapter 13, 623-627, 5.Edition.
36. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, Chapter 12; Cytokines pp 267.
37. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomcick M. Immunobiology, Chapter 8, 2001.
38. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomcick M. Immunobiology, Chapter 8, 2001.
39. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomcick M. Immunobiology, Chapter 10, 2001.
40. Stanley A, Nasraway Jr. Sepsis research, We must change course. Crit Care Med, 27, 427-430, 1999.
41. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines. Current status. British J of Anesthesia, 77, 110-117, 1996.
42. Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, Maier S, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B. Sepsis After Major Visceral Surgery is Associated with Sustained and Interferon- $\gamma$ -Resistant Defects of Monocyte Cytokine Production. Surgery, Mosby Inc. 127, 309-15, 2000.
43. Mack VE, Mc Carter MD, Naama AH, Calvano SE, Daly JM, Dominance of T-Helper 2- Type Cytokines After Severe Injury. Arch Surg, 131, 1303-1309, 1996.
44. Xu YX, Ayala A, Chaudry I. Prolonged immuno-depression after trauma and hemorrhagic shock. J. Trauma. 2, 335-341, 1998.
45. Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, Barclay GR, Jackson RE, Grant IS, Ramsay G, Blyth AS, Howie JC. : Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. JAMA, July 2, 1995, Vol 274 No:2, 172-177.



46. Puyana JC, Pellegrini JD, Kumar De A, Kodys K, Silva WE, Miller CL. Both T-helper-1 and T-helper-2 type lymphokines are depressed in posttrauma anergy. *J. Trauma*, 44(6), 1037-1046, 1998.
47. Pinsky MR, Vincen JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E.: Serum cytokine levels in human septic shock. *Chest*. 1993; 103,pp565-575.
48. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DHL, Mannick JA, Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann. Surg.* 4, 482-492, 1995.
49. Klein J. (Ed). Complement System. In. *Immunology*. Chapter 8, Blackwell Scientific Publication, England. 188-227, 1990.
50. Takeshita S, Nakatani K, Tsujimoto H. Detection of Circulating Lipopolysaccharide-Bound Monocytes in Children with Gram-Negative Sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*. 182, 1549-1552, 2000.
51. Karanikas V, Lodding J, Mainon VC, Mc Kenzie IFC. Flow Cytometric Measurement of Intracellular Cytokines Detects Immune Responses in MUC1 Immunotherapy. *Cinical Cancer Research*, 6, 829-837, 2000.
52. Zedler S, Faist E, Ostermeier B, Donnersmarck GH, Schildberg FW. Postburn Constitutional Changes in Changes in T-Cell Reactivity Occur in CD8+ Rather Than in CD4+ Cells. *The Journal of Trauma*, 42(5), 872-380, 1997.
53. Yılmaz T. *Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı*, 2001.
54. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol*. 162, 392-399, 1999.
55. Marie C, Fitting C, Cheval C, Losser MR, Carlet J, Payen D, Foster K, Cavaillon JM. Presence of high levels of leukocyte-associated interleukin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome. *Infect. Immun.* 1997; 3: 865-71.

56. Ertel W, Keel M, Neidhart R, Stekholzer U, Kremer JP, Ungethüm U, Trentz O. Inhibition of the Defense System Stimulating Interleukin-12 Interferon- $\gamma$  Pathway During Critical Illness. *Blood*, 89(5), 1612-1620, 1997.
57. Haraguichi S, Day KN, Nelson RP, Patricia E, Duplantier EJ, Christodoulou CS, Good RA. Interleukin-12 deficiency associated with recurrent infections. *Immunology*, 95, 13125-13129, 1998.
58. Echtenacher B, Freudenberg MA, Jack RS, Mannel ND. Differences in Innate Defense Mechanisms in Endotoxemia Polymicrobial Septic Peritonitis. *Inf. And Immunity*. 7271-7276, 2001.
59. Masihi KN. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *Int J of Antimicrobial Agents*, 14, 181-191, 2000.
60. Van der Poll T, Van Deventer SJH. Cytokines and Anticytokines in the Pathogenesis of Sepsis. *Bacterial Sepsis and Septic Shock*, 13(2), 413-425, 1999.
61. Roy S, Charboneau RG, Barke AR. Morphine synergizes with lipopolysaccharide in a chronic endotoxemia model. *Journal of Neuroimmunology*, 95, 107-114, 1999.
62. Lauw NF, Deckers EP. Interleukin-12 Induces Sustained Activation of Multiple Host Inflammatory Mediator Systems in Chimpanzees. *The Journal of Infectious Diseases*, 179, 646-652, 1999.
63. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, Strieter RM and Kunkel SL. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *The Journal of Immunology*, 162, 5437-5443, 1999.
64. Göebel A, Kavanagh E, Lyons A Saporoschetz IB, Soberg C, Lederer JA, Mannick JA, Rodrick ML. Injury Induces Deficient IL-12 Production, But IL-12 Therapy After Injury Restores Resistance to Infection. *Ann Surg*, 231(2), 253-261, 2000.

65. Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M.: Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med* 1997 Vol.25, No.3: pp405-412.
66. Sfeir S, Saha DC, Astiz M, Rackow EC. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit Care Med*, 29(1), 129-133, 2001.
67. Lyons A, Göebel A, Mannick JA, Leierer JA. Protective Effects of Early Interleukin-10 Antagonism on Injury-Induced Immune Dysfunction. *Arch Surg*. 134, 1317-1324, 1999.
68. Napolitano LM, Campbell CC, Bass B. Kinetics of splenocyte interleukin-4 production after injury and lethal endotoxin challenge. *J. Surg. Res.* 67, 33-39, 1997.
69. Seki S, Osada SI, Ono S, Aosasa S, Habu Y, Nichikage T, Mochizuki H, Hiraide. Role of Liver NK Cells and Peritoneal Macrophages in Gamma Interferon and Interleukin-10 Production in Experimental Bacterial Peritonitis in Mice. *Infection and Immunity*, 66, 5286-5294, 1998.
70. Ono S, Ueno C, Aosasa S, Tsujimoto H, Seki S, Mochizuki H. Severe sepsis induces deficient interferon-gamma and interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy improves survival in peritonitis. *Excerpta Medica Inc., The American Journal of Surgery*. 182, 491-497, 2001.
71. Montravers P, Maulin L, Mohler J, Carbon C. Microbiological and Inflammatory Effects of Murine Recombinant Interleukin-10 in Two Models of Polymicrobial Peritonitis in Rats. *Infection and Immunity*, 67, 1579-1584, 1999.
72. Sewnath ME, Olszyna DP, Birjmohun R, Kate FJW, Gouma DJ, Van der Poll T. IL-10 Deficient Mice Demonstrate Multiple Organ Failure and Increased Mortality During *Escherichia coli* Peritonitis Despite an Accelerated Bacterial Clearance. *The Journal of Immunology*, 166, 6323-6331, 2001.

73. Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos J, Newcomb D, Remick D. Immunopathologic Alterations in Murine Models of Sepsis of Increasing Severity. *Infection and Immunity*, 67(12), 6603-6610, 1999.
74. Kavanagh EK, Kell MR, Goebel A, Soberg CC, Mannick A, Lederer JA. Interleukin 10 is not Essential for Survival or for Modulating T-cell Function After Injury. *Surgery*, Mosby Inc. 126, 456-62, 1999.
75. Kopydlowski KM, Salkowski AC, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. Regulation of Macrophage Chemokine Expression by Lipopolysaccharide In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 163, 1537-1544, 1999.
76. Murray PJ, Young RA. Increased Antimycobacterial Immunity in Interleukin-10-Deficient Mice. *Infection and Immunity*, 67(6), 3087-3095, 1999.
77. Song GY, Chung CS, Chaudry IH, Ayala A. What is the role of interleukin10 in polymicrobial sepsis. Anti-inflammatory agent or immunosuppressant? *Surgery*. 126, 378-83, 1999.
78. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, 13(2), 110-116, 2000.
79. Dhainaut JP, Thijs LG, Park G. Septic Shock. *The New England Journal of Medicine*, 343(6), 447-448, 2000.
80. Contrepois A, Moulin AM. Early History of Animal Models of Infection. In *Handbook of Animal Model of Infection*, Academic Press, Chapter 1, 3-8, 1999.
81. Frimodt-Moller N, Knudsen JD and Espersen F. The Mouse Peritonitis/Sepsis Model. In *Handbook of Animal Model of Infection*, Academic Press, Chapter 14, 127-136, 1999.

82. Gudmundsson S, Erlendsdottir H. Murine Thigh Infection Model In Handbook of Animal Model of Infection, Academic Press. Chapter 15, 147-139, 1999.
83. Leon LR, Kozak W, Rudolph K, Kluger MJ. An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. *Am.J. Physiol.*, 276, 81-89, 1999.
84. Pajkrt D, Van der Poll T, Levi M, Cutler DL, Affrime MB, Van den Ende A, Cante JW, van Deventer JH. Interleukin-10 Inhibits Activation of Coagulation and Fibrinolysis During Human Endotoxemia. *Blood*, 8, 2701-2705, 1997.
85. Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10 : Potential Benefits and Possible Risks in Clinical Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 27, 1497-1507, 1998.
86. Van der Poll T, Malefyt RW, Coyle SM, Lowry SF. Anti-inflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia. Sequential measurements of plasma soluble IL-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *The Journal of Infectious Diseases*. 175, 118-122, 1997.
87. Klava A, Windsor ACJ, Farmery SM, Woodhouse LF, Reynolds JV, Ramsden CW, Boylston AW, Guillou PJ. Interleukin-10: A role in the development of postoperative immuno-suppression. *Arch. Surg.* 132, 425-429, 1997.
88. Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, Peres C, Durand D, Preval C, Ohayon E, Abbal M. Kinetics of Intracytoplasmic Th1 and Th2 Cytokine Production Assessed by Flow Cytometry Following In Vitro Activation of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Cytometry*, 35, 318-328, 1999.
89. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of Interleukin 10 in Specific Immunotherapy. *J Clin Invest* 102(1), 98-106, 1998.
90. Raeder RH, Merrill LB, Lester TA. Pivotal Role for Interferon- $\gamma$  in Protection against Group A Streptococcal Skin Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 639-645, 2000.

91. Carlet J. Immunological therapy in sepsis : currently available. *Intensive Care Med*, 27, 93-103, 2001.
92. Arndt P, Abraham E. Immunological therapy of sepsis : experimental therapies. *Intensive Care Med*, 27, 104-115, 2001.
93. Opal SM, Cross AS, Bhattacharjee AK, Visvanathan K, Zabriskie JB. Immunoprophylaxis Against Bacterial Sepsis. *Sepsis*, 3, 225-234, 1999.
94. Grioir BP, Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Critical Care Medicine*, 21, 78-789, 1993.
95. Matthay MA. Severe Sepsis - A New Treatment With Both Anticoagulant and Antiinflammatory Properties. *The New England Journal of Medicine*, 344(10), 759-762, 2001.
96. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *The New England Journal of Medicine*, 348(2), 138-150, 2003.
97. Wheeler AP, Bernard GR. Treating Patients with Severe Sepsis. *The New England Journal of Medicine*, 340(3), 207-214, 1999.
98. Bloos F, Reinhart K. Anti-inflammatory treatment in sepsis. *Chirurg*, 73(11), 1087-1092, 2002.
99. Hotchkiss SR, Karl IE. Cytokine blockade in sepsis. Are two better than one ? *Crit. Care Med*, 29(3), 2001.
100. Teplick R, Rubin R. Therapy of sepsis, Why we made such little progress? *Crit Care Med*, 27, 1682-1683, 1999.
101. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling-regulation of the immun response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*, 28: N3-N12, 2000.
102. Öner M. Genel Mikrobiyoloji, E.Ü.Fen Fak.Kitapları Servisi, 15-16, 1986.
103. Ayala A, Lomas JL, Grutkoski PS, Chung CS. Pathologic aspects of apoptosis in severe sepsis and shock? *The Int J of Biochemistry and Cell Biology*, 1352, 1-9, 2002.

104. Glauser MP. Pathophysiologic basis of sepsis: Considerations for future strategies of intervention. *Crit Care Med*, 28, 4-8, 2000.
105. Bossink AW, Groeneveld J, Hack CE, Thijs LG. The Clinical Host Response to Microbial Infection in Medical Patients with Fever. *Chest*, 116, 380-390, 1999.
106. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH. Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *The Journal of Infectious Diseases*, 180, 1584-1589, 1999.
107. Haziot A, Hijiya N, Gangloff SC, Silver Goyert SN. Induction of a Novel Mechanism of Accelerated Bacterial Clearance by Lipopolysaccharide in CD14-Deficient and Toll-Like Receptor 4-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 166, 1075-1078, 2001.
108. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR-4 distribution. *Nature Immunology*, 3(7), 667-672, 2002.
109. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature Immunology*, 3(4), 354-359, 2002.
110. Kılıçturgay K. İmmünolojiye Giriş, 291-301, 2002.
111. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Immunology*, 12, 20-26, 2000.
112. Mathiak L, Szewczyk D, Abdullah F, Ovadia P, Feuerstein L, Rabinovci R. Improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. *Crit Care Med*, 28(6), 1947-1952, 2000.

13. Dorman T, Breslow MJ. Altered immune function after trauma and hemorrhage: What does it all mean? *Crit Care Med*, 22(7), 1069-1070, 1994.
14. Barak V, Schwartz A, Kalickman I, Nisman B, Gurman G, Shoenfeld Y. Prevalence of Hypophosphatemia in Sepsis and Infection: The Role of Cytokines. *Am J Med*. 104, 40-47, 1998.
15. Carlett J. Rapid Diagnostic Methods in the Detection of Sepsis. *Bacterial Sepsis and Septic Shock*, 13(2), 483-493, 1999.
16. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro-versus Anti-inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: a Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 176-180, 2000.
17. Masihi KN. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *Int Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 181-191, 2000.
18. Kampmann B, Gaora Po, Snewin VA, Gares MP, Young DB, Levin M. Evaluation of Human Antimycobacterial Immunity Using Recombinant Reporter Mycobacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 182, 895-901, 2000.
19. Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SA. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 1883-1889, 1998.
20. Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacology and Therapeutics*, 91, 179-213, 2001.
21. Warren SH. Strategies for the Treatment of Sepsis. *The New England Journal of Medicine*, 336(13), 952-953, 1997.
22. Proctor RA. Bacterial sepsis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Crit Care Med*, 29(3), 683-690, 2001.
23. Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AS, Chaudry IH. Hemorrhage without tissue trauma produces immuno-suppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch. Surg*. 122, 62-66, 1987.



124. Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet*;351:1501-1505,1998.
125. Levi M, van Der Poll T, ten CATE H, Kuipers B, Biemond BJ, Jansen HM, ten CATE JW. Differential effects of anti-cytokine treatment on bronchoalveolar hemostasis in endotoxemic chimpanzees. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jul;158(1):92-8.
126. Frimodt-Moller N, Knudsen JD and Espersen F. The Mouse Peritonitis Model Using Cecal Ligation and Puncture, In *Handbook of Animal Model of Infection*, Academic Press, 14, p173-183, 1999.
127. Nemeth ZH, Hasko G, Szabo C, Salzman AL, Vizi S. Calcium channel blockers and dantrolene differentially regulate the production of interleukin-12 and interferon- $\gamma$  in endotoxemic mice. *Brain Research Bulletin*, 46(3), 257-261,1998.
128. Türkoğlu UM, Toptanı TS, Öztezcan S, Uysal M, Toker G. The Effects of N-Acetyl Cysteine Treatment and Nitric Oxide Synthase Inhibition on Oxidative Stress Induced by E.coli Endotoxine. *Biochemical Archives*,14, 33-41, 1998.
129. Türkoğlu UM, Öztezcan S, Toptanı TS, Uysal M, Toker G. The Effects of N-Acetyl Cysteine and N- $\omega$ - Nitro- L- Arginine Methyl Ester Treatment on Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress in Lung of Rats. *Biochemical Archives*, 14, 139-146, 1998.
130. Quan N, Avitsur R, Stark JL, He L, Shah M, Caliguiri M, Padgett DA, Marucha PT, Sheridan JF. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. *Journal of Neuroimmunology*, 115, 36-45, 2001.
131. Dreau D, Sonnenfeld S, Fowler N, Morton DS, Lyte M. Effects of Social Conflict on Immune responses and E.coli Growth Within Closed Chambers in Mice. *Physiology and Behaviour*, 67(1), 133-140, 1999.
132. Gessani S, Belardelli F. IFN- $\gamma$  Expression in Macrophages and Its Possible Biological Significance. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 9(2), 117-123, 1998.
133. Kaempfer R. Cytokine and Interferon Research in Israel. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 9(2), 99-108, 1998.