

86962

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ANESTEZİYOLOJİ ve REANİMASYON

ANABİLİM DALI

**RATLARDA İNTRA-ABDOMİNAL SEPSİS MODELİNDE
UYGULANAN GRANÜLOSİT KOLONİ-STİMÜLAN
FAKTÖRÜN AKCİĞERLER ÜZERİNE ETKİSİ**

T 86962

Uzmanlık Tezi

Dr. Aysun Afife KAR

İZMİR - 1999

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**



**Bu tez çalışması Prof. Dr. Zahide ELAR denetiminde
gerçekleştirilmiştir.**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ.....	1-3
GENEL BİLGİLER.....	4-19
GEREÇ VE YÖNTEM.....	20-25
BULGULAR.....	26-34
TARTIŞMA.....	35-46
SONUÇ.....	47
ÖZET.....	48-49
KAYNAKLAR.....	50-56

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince hastaya yaklaşım ve hasta hekim ilişkilerinde örnek aldığım, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimliğin ve anesteziyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim hocalarım Sayın Prof. Dr. Zahide Elar'a, Sayın Prof. Dr. Emel Sağıroğlu'na, Sayın Prof. Dr. Ali Günerli'ye, Sayın Prof. Dr. Atalay Arkan'a, Sayın Prof. Dr. Erol Gökeli'e;

Tez araştırmamı birlikte yürüttüğüm, tezimin her aşamasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Zahide Elar'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sermin Öztekin'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz Özzeybek'e, Sayın Uz. Dr. Uğur Koca'ya;

Tezimin hazırlanmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Hakkı Bahar'a, Sayın Prof. Dr. Gazanfer Aksakođlu'na, Sayın Prof. Dr. Ataman Güre'ye, Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar Tuncel'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdener Özer'e, Sayın Uz. Dr. Murat Sayan'a, Sayın Uz. Dr. Murat Örmeli'e, Sayın Uz. Dr. Hülya Ellidokuz'a;

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım, eğitimime katkıda bulunan bölümümüz öğretim üyeleri, uzmanları ve asistanlarına;

Anestezi teknikerleri; ameliyathane, yoğun bakım, ağrı ünitesi hemşire ve personeli ile bölüm sekreterlerine;

Sevgili eşim Op. Dr. Haldun Kar'a ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Aysun Afife Kar

GİRİŞ

İntra-abdominal sepsis, mikroorganizma ve toksinlerine karşı oluşan inflamatuvar bir yanıt sonucunda, abdominal kavitede pürülan eksüda gelişmesiyle karakterli polimikrobiyal bir enfeksiyondur (1). Son birkaç dekatda antibiyoterapi, sıvı resüsitasyonu, yoğun bakım desteği ve cerrahi girişim konusunda yaşanan gelişmelerin, mortalite oranını etkilemediği; önceleri erken dönemde enfeksiyon, günümüzde ise daha geç dönemde ve çoğunlukla enfekte olmayan uzak organlarda ortaya çıkan yetmezlik nedeniyle kaybedilen bu olgularda sadece ölüm nedeninin değiştirilebildiği belirlenmiştir (2).

Mikroorganizmaların ve endotoksin gibi ürünlerinin, konakçı organizmanın sellüler defans mekanizmalarını tetikleyerek tümör nekrozis faktör (TNF), İnterlökin-1 (IL-1), İnterlökin-6 (IL-6) gibi “Erken Yanıt Sitokinleri”yle birlikte, çok sayıda inflamatuvar mediyatörü aktive ettikleri saptanmıştır (3). TNF gibi sitokinlerin ve nötrofillerin sepsis ve multipl organ disfonksiyon sendromu (MODS) fizyopatolojisindeki rollerinin belirlenmiş olması; sepsiste klasik sağaltımın yanı sıra sistemik inflamatuvar yanıtın modüle edilmesine yönelik yaklaşımların popülarite kazanmasına yol açmıştır (4).

Başlangıçta kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonuna bağlı nötropenin önlenmesi ve sağaltılması amacıyla kullanılan granülosit koloni-stimülan faktör (G-CSF), kemik iliğinde nötrofil proliferasyonuna ve diferansiyasyonuna neden olan; matür nötrofillerin kemotaksi, fagositoz ve bakterisidal aktivite gibi fonksiyonlarını artıran hematopoetik bir büyüme faktörüdür (5). Nötrofil fonksiyonları üzerindeki etkilerinin yanı sıra inflamatuvar yanıtta yer alan sitokinleri modüle edici bir özelliğe sahip olduğunun belirlenmesi (6-10), G-CSF’ün sepsiste kullanılabileceğini düşündürmüştü; öncelikle deneysel sepsis modellerinde profilaktik ve terapötik etkinliğinin sınanmasına yol açmıştır (11-17).

Sepsiste nötrofillerin sayı ve fonksiyonlarını modüle etmek amacıyla uygulanan G-CSF'ün, aktive olmuş nötrofillerden serbestleşen reaktif oksijen metabolitleri ve veya proteazlar yoluyla endotel-epitel hasarına neden olabileceğini; akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) ile sonuçlanabilen bir akciğer hasarlanmasına yol açabileceğini telkin eden veriler elde edilmiştir (18-25). 5 gün süreyle 100 µg/kg dozda gerçekleştirilen G-CSF enjeksiyonlarının ardından intratrakeal endotoksin uygulanan kobaylarda, G-CSF ile sağlanan ön tedavinin akciğerlerdeki nötrofil sekestrasyonunu artırdığı; intratrakeal endotoksinle oluşan akciğer hasarlanmasını ağırlaştırdığı saptanmıştır (19).

Ratlarda çekal ligasyon-perforasyon (ÇLP) yöntemi ile oluşturdukları intra-abdominal sepsis modelinde profilaktik veya terapötik amaçlı G-CSF uygulamalarının, konakçı savunma mekanizmaları ve yaşam süresi üzerine etkilerini araştıran bir grup çalışmacı ise, G-CSF'ün, sepsisin neden olduğu pulmoner nötrofil akümülyasyonunu artırmadığı; nötrofil kökenli bir akciğer hasarlanmasına yol açmadığı sonucuna varmışlardır (26-27).

Sepsiste nötrofil davranışlarının manipüle edilmesinin ARDS fizyopatolojisini anlamlı boyutta etkileyebileceği hipotezini destekleyen veya reddeden çalışmalara ait çelişkili sonuçlar, klinikte sık karşılaşılan intra-abdominal sepsiste ilk etkilenen organlardan biri olan akciğerler üzerine odaklanmamıza neden olmuştur.

Intra-abdominal sepsis modelinde profilaktik veya terapötik amaçlı G-CSF uygulamalarının akciğer üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda akciğerlerin kalitatif histopatolojik yöntemle değerlendirildiği ve farklı sonuçlar elde edildiği saptanmış (26,27); bu nedenle, akciğerlerdeki nötrofil infiltrasyonunun kantitatif bir yöntemle araştırılması amaçlanmıştır. Allan ve arkadaşları (28)'nin kalp kasında, Krawisz ve arkadaşları (29)'nin bağırsakta, Fink ve arkadaşları (30)'nin ise akciğer dokusundaki nötrofil infiltrasyonunun kantitatif olarak belirlenmesinde güvenilir bir yöntem olduğunu saptadıkları miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinden yararlanılması kararlaştırılmıştır.

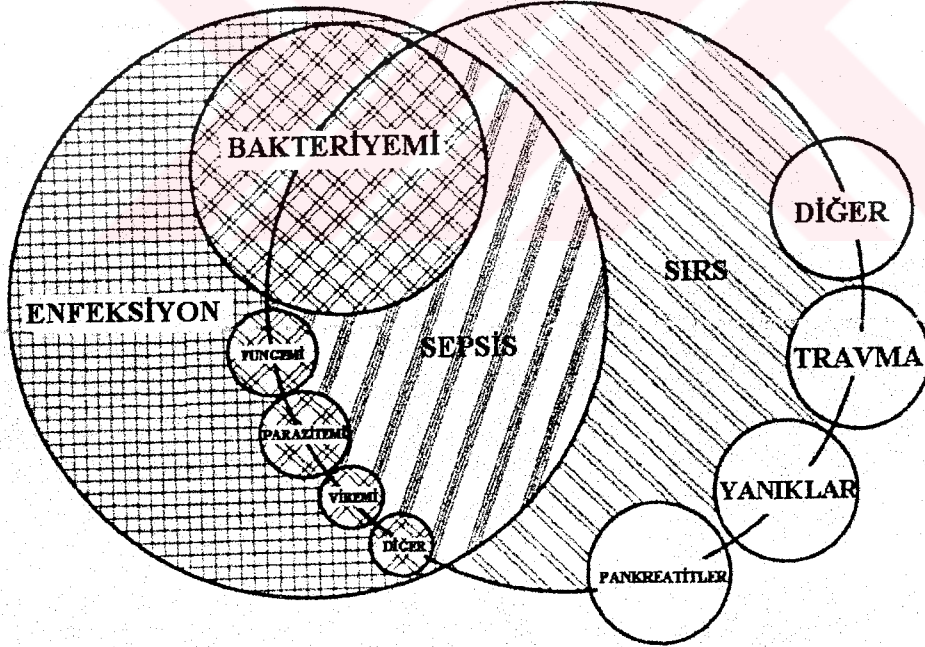
Ratlarda ÇLP yöntemiyle oluşturulan intra-abdominal sepsis modelinde sepsis indüksiyonundan 1 saat sonra uygulanan G-CSF'ün serum TNF düzeyi ve akciğerdeki nötrofil infiltrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda, akciğerlerin hem

semi-kantitatif histopatolojik inceleme hem de akciğer dokusu MPO aktivitesi ölçümü gibi kantitatif bir yöntemle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

Sepsise eşlik eden klinik tabloyu ilk kez MÖ 400 yılında tanımlayan Hippocrates, “akut bir hastalıkta ekstremitelelerin soğuması kötü bir belirtidir” ifadesini kullanmıştır (31). Bu tanımlamadan yaklaşık 24 asır sonra günümüzde, sepsis fizyopatolojisindeki gelişmelere karşın, terminolojideki karmaşanın sürdüğü gözlenmektedir. 1991 yılında *Society of Critical Care Medicine* ve *American College of Chest Physicians*'in konsensus toplantısında enfeksiyon, bakteriyemi, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (*Systemic Inflammatory Response Syndrome* “SIRS”), sepsis, ciddi sepsis, septik şok ve MODS'na ilişkin evrensel tanımlamalar geliştirilmiştir (Şekil 1) (Tablo 1) (32).



ŞEKİL 1. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), sepsis ve enfeksiyon arasındaki ilişki.

TABLO 1. Enfeksiyon, Bakteriemi, Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu, Sepsis, Ciddi Sepsis, Septik Şok ve Multipl Organ Disfonksiyon Sendromuna İlişkin Kriterler

Enfeksiyon	Mikroorganizma varlığına veya normalde steril olan konakçı dokunun bu organizmalarla invazyonuna karşı gelişen inflamatuvar yanıtla karakterli mikrobiyal fenomen.
Bakteriyemi	Kanda canlı bakterilerin varlığı.
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt, aşağıdakilerden iki veya daha fazlası ile karakterize olan klinik bir yanıtıdır: Rektal vücut ısısı > 38°C veya < 36°C Kalp atım hızı > 90 atım / dk Solunum hızı > 20 sol / dk veya PaCO ₂ < 32 mmHg Lökosit sayısı > 12000 hücre / mm ³ , < 4000 hücre / mm ³ veya % 10'u immatür (band) formda
Sepsis	Dokümente edilmiş enfeksiyonla birlikte olan SIRS.
Ciddi Sepsis	Organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun eşlik ettiği sepsis. Hipoperfüzyon veya perfüzyon bozuklukları laktik asidoz, oligüri veya mental durumda akut bir değişikliği içerebilir, fakat bunlarla sınırlı değildir.
Septik Şok	Bilinen başka bir neden söz konusu olmaksızın sepsiste yeterli sıvı resüsitasyonuna karşın hipotansiyon (SAB < 90 mmHg veya SAB'da başlangıç değerine kıyasla 40 mmHg'lık bir düşüş) ile birlikte organ disfonksiyonu ve perfüzyon bozukluklarının (laktik asidoz, oligüri veya mental durumda akut bir değişiklik) varlığı.
MODS	Organ fonksiyonlarının, homeostazisi sürdüremediği fizyolojik düzensizlik durumu.

SIRS, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu; **PaCO₂**, arteriyel karbondioksit parsiyel basıncı; **SAB**, sistolik arter basıncı; **MODS**, multipl organ disfonksiyon sendromu.

Vücutun kendini savunabilmesi;

-İnvazyon ve doku hasarına karşı eksternal bariyerleri,

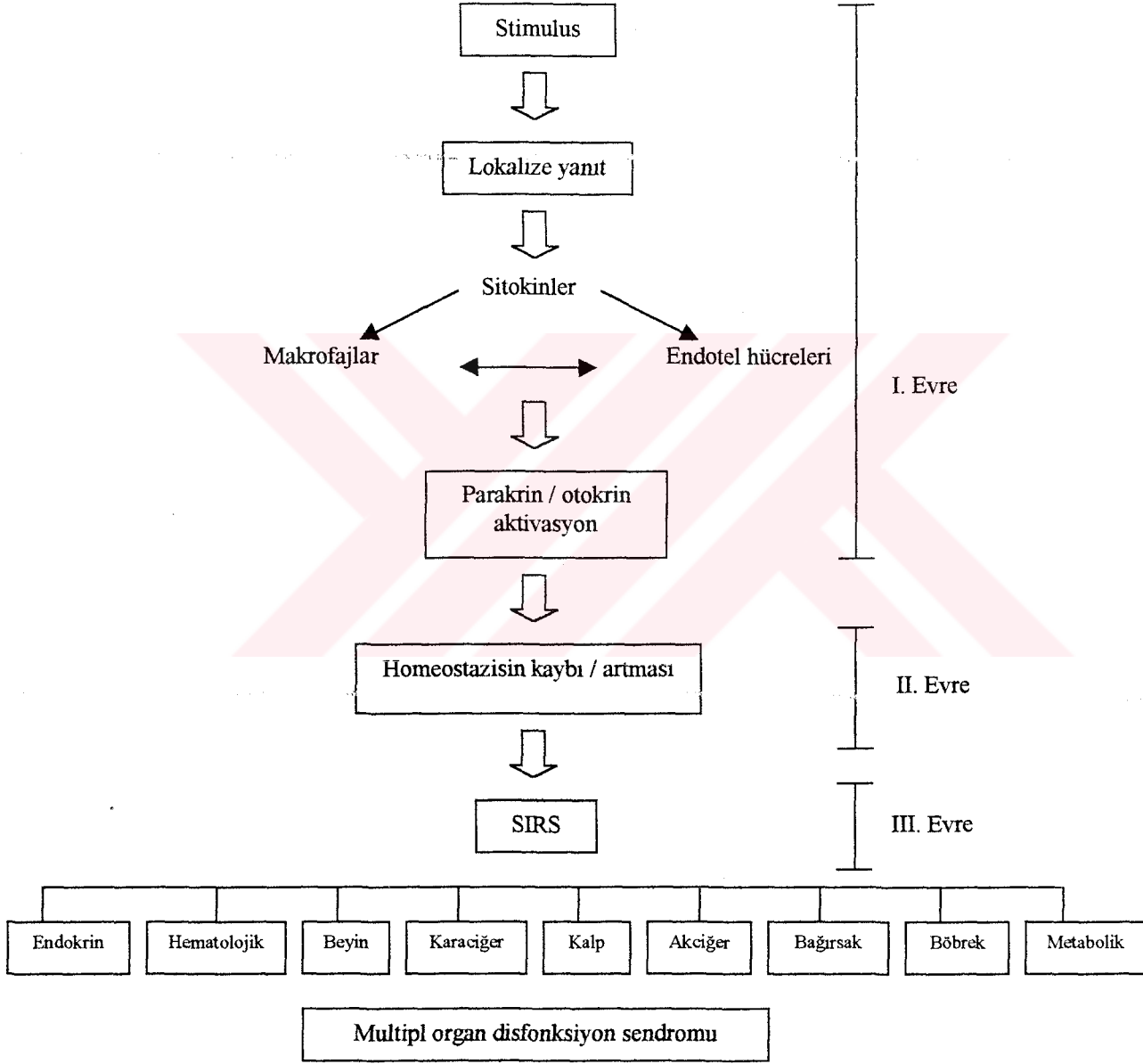
-Yabancı patojenler ve doku artıklarına karşı nonspesifik sistemleri,

-Ajan patojenlere karşı antijen-spesifik yanıtları içeren 3 temel mekanizma ile sağlanmaktadır (33).

Organizmanın yabancı patojenler veya doku artıklarına karşı nonspesifik bir defans mekanizmasını oluşturan inflamasyon: mekanik, kimyasal ve mikrobiyal stimuluslarla oluşan doku hasarlanmasına başlangıçta verdiği, hızla artan, hümmoral ve sellüler bir yanittir (34). Söz konusu uyarılara karşı başlangıçta ortaya çıkan ve koruyucu bir fizyolojik yanıt olan lokal inflamasyon, bu lokal kontrolün kaybı veya aşırı bir aktivite oluşması sonucunda, klinikte SIRS olarak tanımlanan abarmış bir sistemik yanıtı açmaktadır. SIRS, enfeksiyon (virüs, bakteri, protozoa, fungus) sonrasında gelişebildiği gibi; travma, otoimmün reaksiyonlar, siroz ve pankreatit benzeri nonenfeksiyöz etmenlerden de kaynaklanabilir (Şekil 1) (31,32). Bone (35), SIRS gelişiminde 3 evre tanımlamıştır (Şekil 2): I.Evre'de hasar bölgesinde, stimulusa yanıt olarak, başlıca etkileri inflamatuvar yanıtı uyarmak, yara onarımını artırmak ve retikuloendotelial hücre rekrütmanını sağlamak olan sitokinler üretilir. II.Evre'de lokal yanıtı artırmak amacıyla, sitokinlerin küçük bir miktarı dolaşıma girer. Makrofajlar ve trombositler rekrüte olurken, büyüme faktörlerinin üretimi stimüle edilir ve bir akut faz yanıtı başlayabilir.

Bu evrede, sitokin yanıtının patolojik veya anormal olduğu düşünölmeyebilir. Aksine, vücudun ana savunma hattının bir bölümü olarak kabul edilmelidir. Akut faz reaksiyonu proinflamatuvar mediyatörlerde azalma ve interlökin-1 reseptör antagonistleri (IL-1ra) gibi endojen antagonistlerde eşzamanlı bir artma ile kontrol edilir. Bu sitokin yanıtı, normal koşullarda diğer sitokinleri, reseptör antagonistlerini ve antikorları içeren karmaşık bir mediyatör ağı ile regüle edilmektedir. Bu mediyatörler sitokin üretimini azaltarak ve daha önce serbestleşen sitokinlere karşıt bir etki oluşturarak, başlamış olan inflamatuvar yanıtı kontrol altında tutarlar. Bu yolla yara iyileşmesi, enfeksiyonun kontrol altına alınması ve homeostazisin restore edilmesi sağlanabilir. Homeostazisin yeniden sağlanmasının

başarılmadığı durumlarda, masif bir sistemik reaksiyon oluşmasıyla III.Evre (SIRS) gelişir. Bu evrede sitokinlerin hakim olan etkileri koruyucu olmaktan çok yıkıcı olmaya başlar. İnflamatuvar mediyatör seli, çok sayıda hümmoral kaskadı tetikleyerek mikrosirkülatuvar bütünlüğün kaybı ile retiküloendotelial sistemde inatçı bir aktivasyona yol açar ve uzak son organ hasarları ile sonuçlanır.



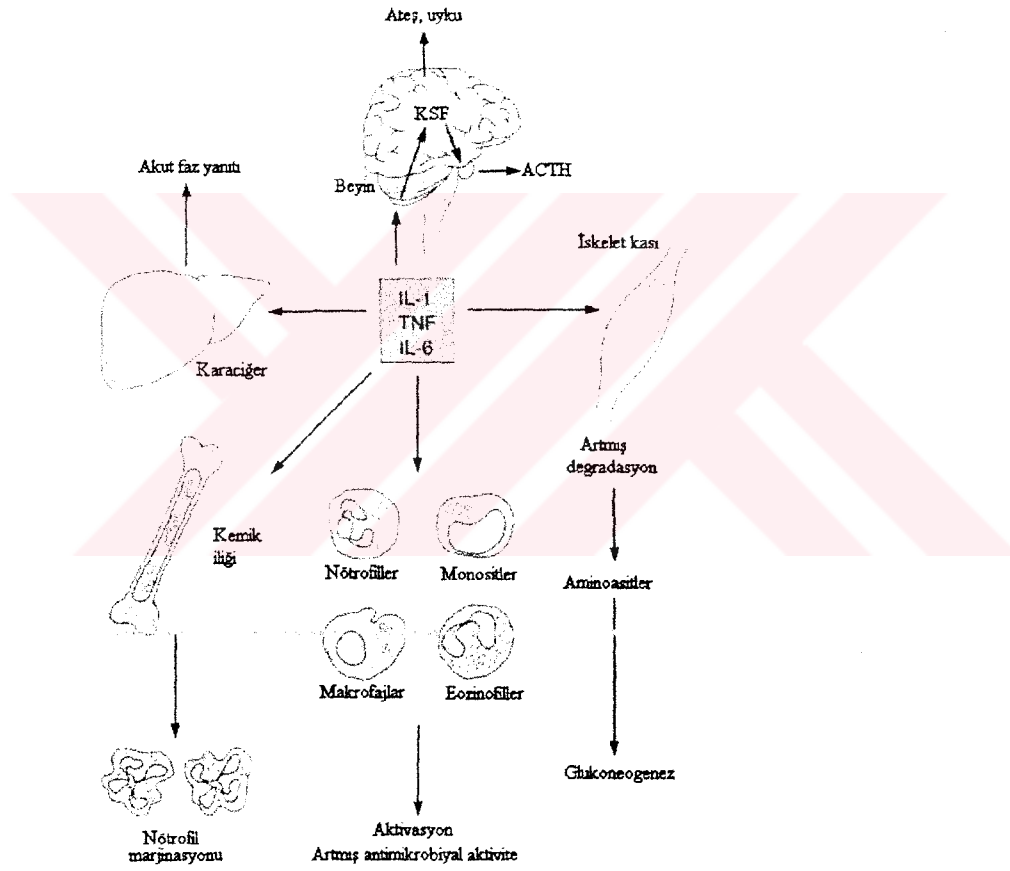
ŞEKİL 2. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromunun gelişmesi

Bir hücreden sekrete edilip bir başka hücreyi, dokuyu ve organı otokrin, parakrin veya endokrin yolla etkileyen protein yapısında solübl mediyatörler olan sitokinler, immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar ve çeşitli yollarla T hücrelerine, B hücrelerine, monosit-makrofaj dizgisindeki hücrelere, nötrofillere, fibroblastlara, düz kas hücrelerine ve endotel hücrelerine etki ederler. Bu polipeptidlerden etkilenen immünolojik fonksiyonlar: akut ve kronik bakteriyel, viral, fungal ve paraziter enfeksiyonlara karşı konakçı yanıtını; sepsis, MODS, allogreft rejeksiyonu ve otoimmün hastalık gelişmesini içerir. Sitokinlerin ayrıca tümör biyolojisinde tümöre yanıtta, tümör büyümesinde ve metastaz oluşumunda da önemli bir rol üstlendikleri belirlenmiştir. Özetlenerek sunulmaya çalışılan özellikleri dışında anjiyogenez, sellüler büyüme ve hücre diferansiyasyonu gibi birçok etki ve aktiviteye sahip olan sitokinlerin, konumuzla ilişkili olan doku hasarı, inflamasyon ve yara iyileşmesindeki rollerine odaklanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür (3,36-39).

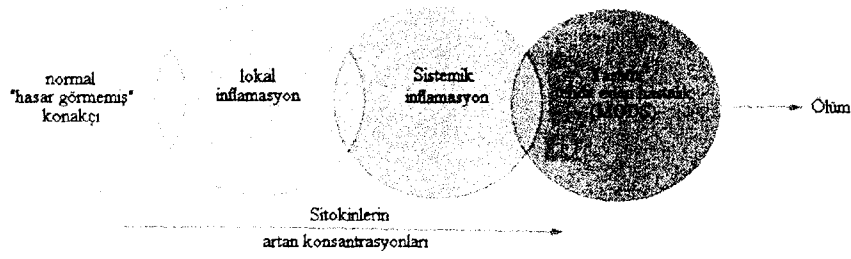
Çeşitli doku alanlarındaki sitokin prodüksiyonu, söz konusu alanların, hasar oluşturan stimulusa yakınlığına bağlıdır. Sitokin konsantrasyonlarının, hasarın büyüklüğü ile paralel bir artış sergilediği öne sürülmektedir. Ancak, klinik uygulamada doku hasarının genişliği ile plazma sitokin konsantrasyonları arasında bir korrelasyon kurulması her zaman mümkün olmayabilir. Klinik bulgularla laboratuvar verileri arasındaki bu uyumsuzluğun, sitokinlerin tipik olarak otokrin ve parakrin şekilde fonksiyon göstermesinden ve sistemik olmaktan çok lokal inflamasyon varlığının bir göstergesi olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (39,40).

Akut inflamasyonu presipite eden olaylar kaskadını başlatmada aktif rol oynayan “Erken Yanıt Sitokinleri” TNF, IL-1 ve IL-6’dır (3,35,39-41). Bu üç sitokinin inflamatuvar yanıtın başlamasında: glukoneogenez için amino asit sağlamak üzere iskelet kasında degradasyonu artırma; nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofil aktivasyonu ile birlikte nötrofil marjinasyonunda ve lökosit antimikrobiyal aktivitesinde artış oluşturma; akut faz yanıtını tetikleme gibi çok yönlü işlevleri olduğu kanıtlanmıştır. Söz konusu erken yanıt sitokinlerinin ayrıca ateş ve uykuya yol açan serebral etkiler oluşturdıkları; adrenokortikotropik hormon (ACTH) prodüksiyonunu stimüle eden kortikotropin-

serbestleştirici faktörü artırdıkları belirlenmiştir (Şekil 3) (39). Aynı moleküllerin, yara onarımı sırasında vasküler proliferasyonun, fibroblast ve osteoklast aktivitesinin ve kollajen sentezinin regülasyonunda önemli bir rol üstlendikleri gösterilmiştir. Colletti ve arkadaşları (39), sitokinlerin düşük lokal konsantrasyonlarının normal bir fizyolojik etki oluşturduklarını, hasara veya enfeksiyona karşı gelişen normal inisiyal yanıtta rol oynadıklarını; artan konsantrasyonlarının ise MODS ve konakçının ölümü ile sonuçlanabilen ciddi fizyolojik değişikliklere yol açtığını ifade etmişlerdir (Şekil 4).

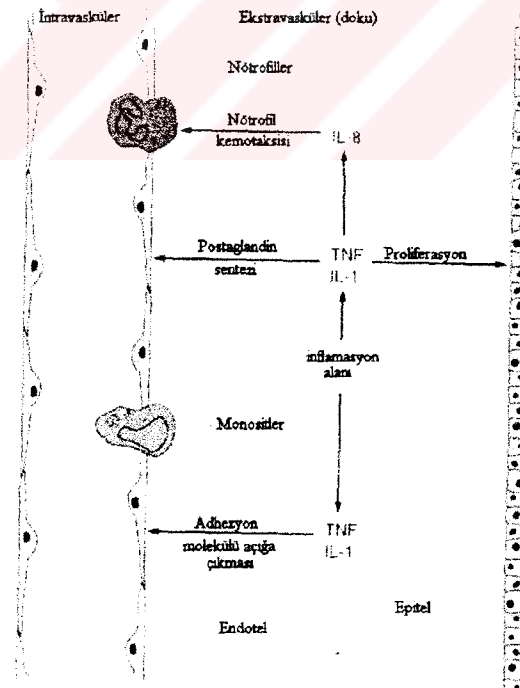


ŞEKİL 3. "Erken Yanıt Sitokinleri" ve inflamasyonun başlaması (KSF, kortikotropin serbestleştirici faktör; ACTH, adrenokortikotropik hormon; TNF, tümör nekrozis faktör; IL-1, interlökin-1; IL-6, interlökin-6).



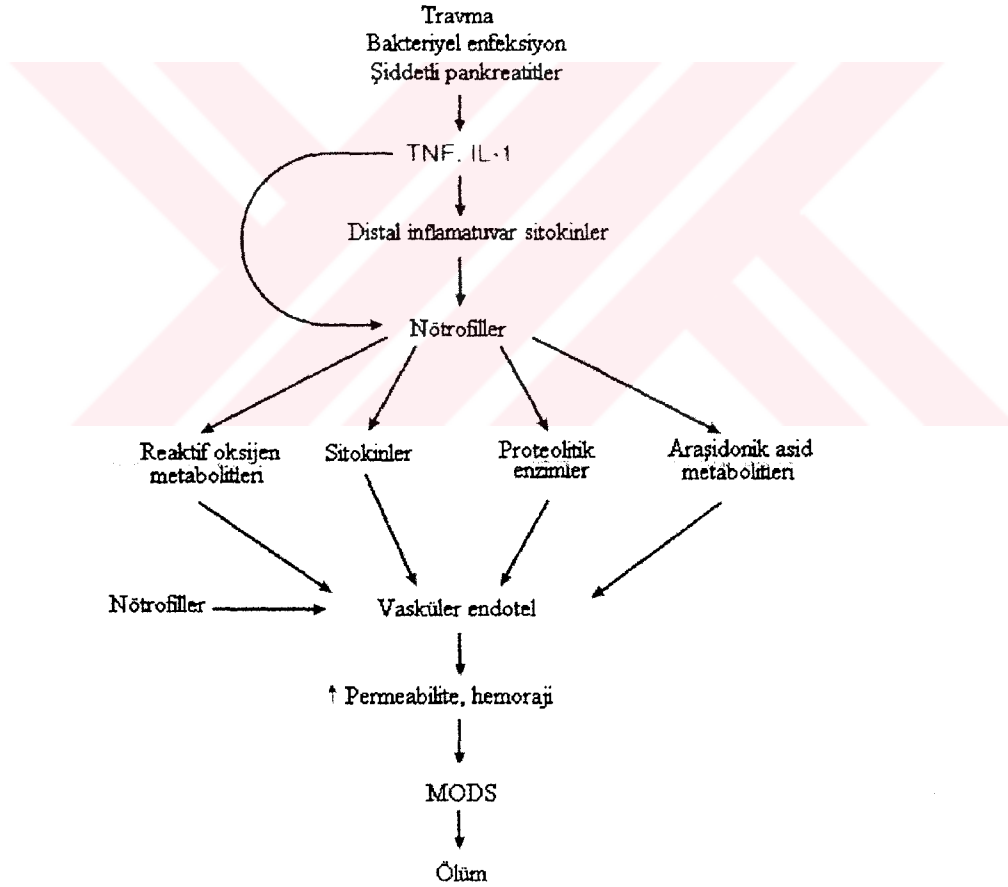
ŞEKİL 4. Artan konsantrasyonlarına dayalı olarak sitokinlerin etki spektrumunda gözlenen değişim.

Akut inflamasyonu presipite eden olaylar kaskadını başlatmada aktif bir rol oynayan TNF ve IL-1 gibi polipeptid mediyatörlerin, özetlenerek sunulan etki ve aktiviteleri yanı sıra inflamatuvar hücrelerin endotele adhezyonunu artırmak gibi bir rol oynadıkları kanıtlanmıştır (3,36-39,41). Endotel ve lökosit arasındaki etkileşimi başlatan TNF ve IL-1'in, immünolojik olarak aktif hücrelerin hasar veya enfeksiyon bölgesine gidişlerini artırdıkları ve bu hücrelerin hasar bölgesinde lokalize edilmelerinden sorumlu oldukları belirlenmiştir (Şekil 5) (39).



ŞEKİL 5. Lökosit ve endotel arasındaki inisiyal etkileşime .

Hem lökosit hem de endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerini artırarak hasar bölgesine hücre göçünü başlatan TNF ve IL-1, nötrofiller için kemotaktik ve aktive edici ajanlar olan “daha distal inflamatuvar sitokinler”in tetiklenmesinden de sorumludurlar (3,36-39,41). Aktive edilmiş nötrofillerin hasar veya enfeksiyon bölgesine rekrütmanı ile: reaktif oksijen metabolitleri, diğer sitokinler, proteolitik enzimler ve araşidonik asit metabolitleri açığa çıkar; mikrovasküler permeabilite artar; hemoraji ve hızlanmış lökosit göçü oluşur. Etiyolojide rol oynayan faktöre bakılmaksızın, MODS’deki doku hasarında en önemli efektör hücrelerden birinin, aktive edilmiş nötrofiller olduğunun belirlenmesi, nötrofil rekrütmanı ve aktivasyonunu bu kaskadın kilit olayı durumuna getirmektedir (Şekil 6) (20-25,39).



ŞEKİL 6. Multipl organ disfonksiyon sendromu (MODS)'na yol açan kaskat.

TNF'ün ana sellüler kaynağı monosit-makrofaj dizisinde yer alan hücrelerdir. Ancak, söz konusu sitokin ayrıca beyindeki gliyal hücrelerde, karaciğerdeki Kupffer hücrelerinde, ciltteki keratinositlerde, mast hücrelerinde, T ve B hücrelerinde de açığa çıkabilir (37,39,40). TNF'ün, aynı sellüler reseptörlere bağlanan ve benzer fizyolojik yanıtlar oluşturan iki komponentinden lenfositokin olarak da adlandırılan TNF- β , lenfosit; TNF- α ise, makrofaj kökenlidir. TNF- α 'nın popülaritesi, klonlanmış olan bu komponentle daha fazla araştırma yapılmış olmasından kaynaklanmaktadır (39). TNF'ün birçok sellüler fonksiyon üzerinde pleiotropik etkiye sahip olması ilginç bir özellik oluşturmaktadır. Bu özelliği, lokal inflamasyon alanlarında doku hasarının başlamasını, sürmesini ve düzelmesini regüle eden bu sitokinin, abarmış sistemik düzeylere ulaşması halinde MODS'a yol açarak konakçının mortalite ve morbiditesini artırıyor olmasına açıklık getirmektedir. Bakteriler, virüsler, parazitler ve tümörlerden oluşan birçok endojen ve ekzojen faktörle artan TNF üretiminde ve serbestleşmesinde rol oynayan en potent stimulus endotoksindir. Gram (-) bakterilerin dolaşıma girmesiyle, bakteriyel hücre duvarında yer alan lipopolisakkaridin (LPS), inflamatuvar kaskadı başlatacak şekilde lökositler ve parenkim hücreleri ile doğrudan etkileştiği bilinmektedir. Eksperimental endotoksemi modellerinde endotoksin uygulanmasının ardından 1 saat gibi erken bir dönem içinde TNF düzeylerinin yükseldiği ve 3 saat içinde kontrol değerine döndüğü gösterilmiştir. Elde edilen veriler, endotoksin uygulamasının ardından kısa sürede zirveye ulaşan ve hızla kontrol değerine dönen TNF düzeylerine karşın, bu molekülün güçlü bir inflamatuvar kaskadı presipite edebildiği ve daha sonra saptanabilir TNF düzeyleri söz konusu olmadığında bile yanıtın sürdüğü şeklinde yorumlanmıştır (37-40).

IL-1, TNF'le birçok biyolojik özelliği paylaşan multifonksiyonel bir moleküldür. Septik şokun başlamasında TNF'den daha zayıf bir etki sergileyen IL-1'in, birlikte uygulanmaları halinde TNF'ün letal etkilerini potansiyalize ettiği gösterilmiştir. Hepatik akut faz protein sentezinin güçlü bir uyarıcısı olan IL-1'in aşırı miktarda serbestleşmesinin, aktive olmuş nötrofillerin damar duvarına marjinasyonuna neden olduğu; endotel hücresinin prokoagülan aktivitesini stimüle ettiği; endotel-lökosit adhezyonunu artırdığı belirlenmiştir (37-40).

İnflamasyona karşı oluşan akut hepatik yanıtın regülasyonunda üstlendiği görev nedeniyle başlangıçta hepatik stimulan faktör olarak da adlandırılan IL-6'nın, monosit ve makrofajlardaki prodüksiyonu için en potent stimulusu LPS'lerin oluşturduğu; fibroblast kökenli IL-6 üretiminden ise IL-1 ve TNF'ün sorumlu olduğu saptanmıştır (37-40).

Lökosit ekstrasvazasyonu, inflamatuvar ve immünolojik yanıtların önemli bir belirleyicisidir. Akut inflamasyon sırasında dokulara nötrofil göçünde rol oynayan özel mekanizmaların birçoğunun bilinmiyor olmasına karşın nötrofil rekrütmanının başlaması ve artmasının:

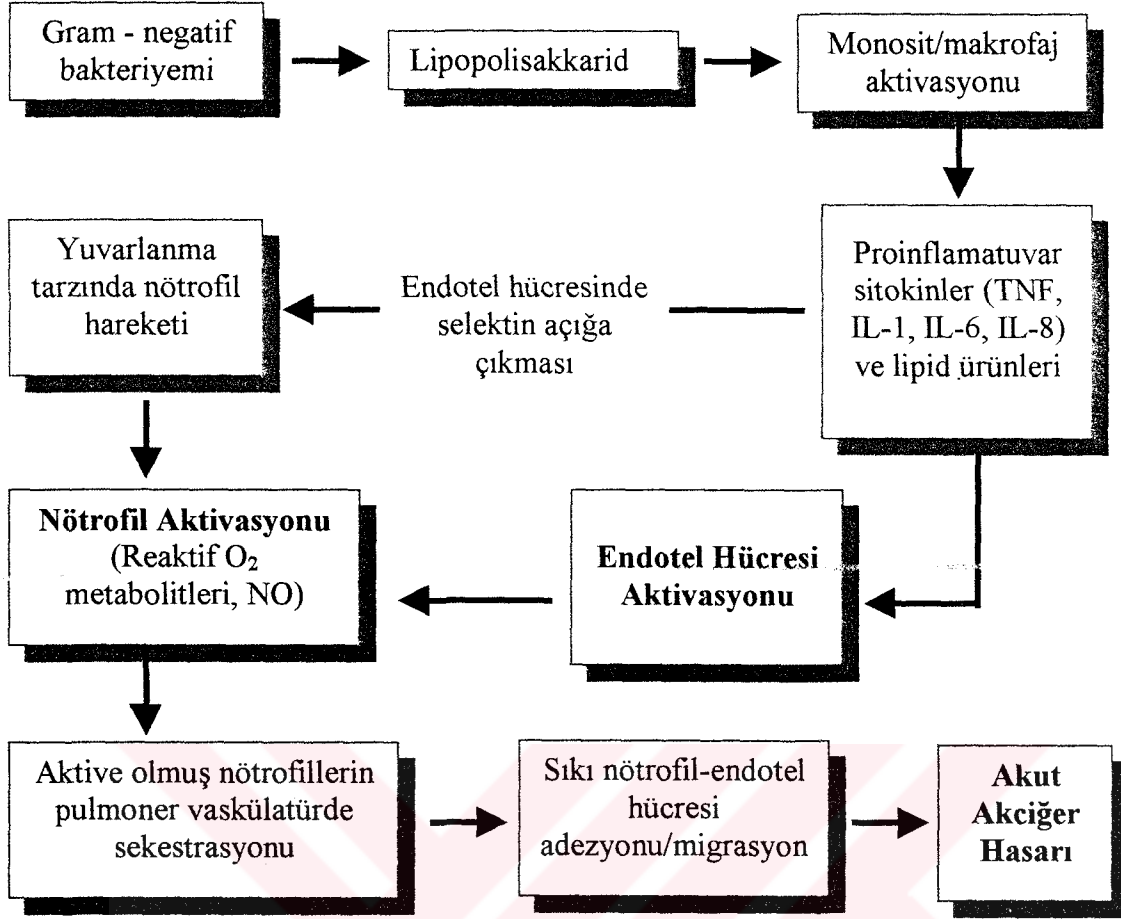
-Endotel hücresi aktivasyonu ile endotel kökenli "nötrofil adhezyon molekülleri"nin açığa çıkmasını,

-Nötrofil aktivasyonu ile nötrofil kökenli adhezyon moleküllerinin oluşmasını,

-Nötrofil-endotel hücresi adhezyonunu ve

-Nötrofil kemotaktik gradiyenti ile sağlanan transendotelial nötrofil göçünü içerdiği belirlenmiştir (21,22,42,43).

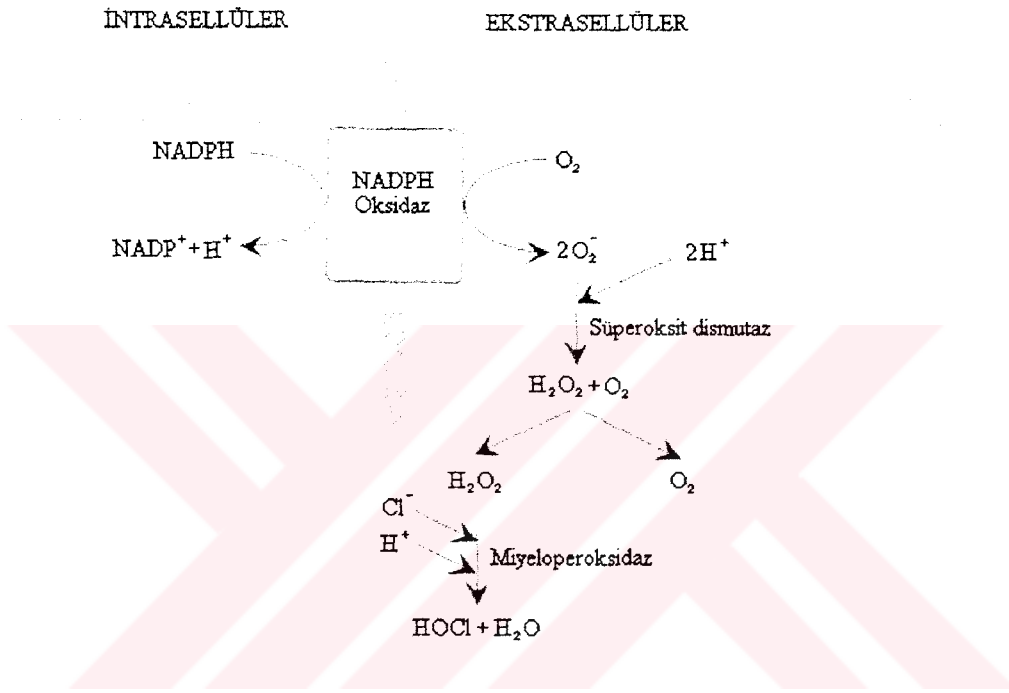
Söz konusu nötrofil rekrütmanının herhangi bir organa özgü olmadığı; ancak, akciğer gibi belirli dokuların lökosit birikimine ve bunu izleyen inflamatuvar hasara karşı özel bir duyarlılık sergiledikleri bilinmektedir. Sepsisin neden olduğu akciğer hasarının karakteristik özelliği, aktive olmuş nötrofillerin pulmoner mikrovaskülatür içinde sekestrasyonu ve endotel hasarındır (44). Gram (-) bakteriler, inflamatuvar yanıtı başlatan faktörler arasında, üzerinde en fazla çalışılmış grubu oluştururlar. Klinikte, özellikle Gram (-) organizmaların proliferasyonu ile sonuçlanan bakteriyel enfeksiyonlara yüksek bir insidanda akut akciğer hasarının eşlik ettiği bildirilmiştir (45). Gram (-) bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu güçlü sistemik inflamasyonda ve sonuçta ortaya çıkan vasküler hasarda rol oynadığı kabul edilen olaylar zinciri Sessler ve arkadaşları (44) tarafından şematize edilmiştir (Şekil 7). Bakteriyemiye izleyen biyolojik olaylar zincirinin sunulduğu bu şemada, kimyasal mediyatörleri ve bir seri kompleks "hücre yüzeyi adhezyon reseptörleri"ni içeren ardışık basamakların sonunda, aktive olmuş nötrofillerin endotel ile sıkı adhezyonunun pulmoner mikrovasküler hasara yol açtığı ifade edilmiştir.



ŞEKİL 7. Bakteriyemiye izleyen ve akut akciğer hasarı ile sonuçlanan biyolojik olaylar zinciri.

Normal koşullar altında nötrofiller, sellüler defansın ilk adımı olarak, istilacıya ve çevresine uyarlanmış mekanizmaları kullanarak mikroorganizmaları uzaklaştırır ve tahrip ederler. Nötrofilin savunma sistemleri, hücre içindeki lokalizasyonlarına dayanılarak iki başlık altında toplanabilir: Bunların ilki reaktif oksijen metabolitlerini oluşturan membran kökenli sistem; diğeri ise, proteinaz ve diğere enzimleri içeren intrasellüler granüllerin oluşturduğu sitozolik sistemdir. İtrasellüler nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'dan ekstrasellüler moleküler oksijene elektron transferini sağlayan membran kökenli NADPH oksidaz enzimi, süperoksit metabolitlerinin sentezinde rol oynamaktadır. Açığa çıkan süperoksit metabolitlerinden, süperoksit dismutaz enzimi aracılığı ile hidrojen peroksit; hidrojen peroksitten de MPO enzimi aracılığı ile uzun ömürlü bir oksidan olan

hipoklorik asit sentez edilmektedir (Şekil 8). Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan aşırı reaktif anstabil oksijen metabolitlerinin, peroksidasyon yoluyla komşu hücrelerin lipid membranlarını parçalayabildikleri gösterilmiştir. Sellüler adenozin 5'-trifosfat (ATP) ve kalsiyum düzeylerini değiştirerek hücre sitoplazmasında normal aktin metabolizmasını önleyen oksijen metabolitlerinin, endotel hücresinin formunda değişikliğe yol açarak ARDS için karakteristik olan kapiller kaçaklara neden oldukları belirlenmiştir (20,24,25,44,46).



ŞEKİL 8. Aktive olmuş nötrofillerde reaktif oksijen metabolitlerinin açığa çıkmasına neden olan reaksiyonlar (**NADPH**, nikotin amid adenin dinükleotid fosfat, **O₂**, superoksit radikali; **H₂O₂**, hidrojen peroksit; **HOCl**, hipoklorik asit).

Nötrofilik granüllerden oluşan sitozolik sistemin ise proteolitik enzimler, bakterisidal proteinler, lizozim ve laktoferrinden oluşan geniş bir enzim ailesini kapsadığı gösterilmiştir. Başta elastaz, jelatinaz ve kollajenaz olmak üzere birçok proteolitik enzimin kollajen, elastin ve bazal membrandan oluşan konakçı dokusunda harabiyet oluşturduğu; bu bağ dokusu elemanlarının bir kısmının veya tümünün destrüksiyonu yoluyla ARDS'deki

ilerlemiş akciğer hasarı için karakteristik olan histopatolojik bulgulara yol açtığı kanıtlanmıştır (20,23-25,44).

Sepsisin neden olduğu akciğer hasarından sorumlu olduğu belirlenen nötrofil sekestrasyonu: histopatolojik değerlendirme, radyonüklid hücre işaretleme yöntemi veya MPO aktivitesinin belirlenmesi yoluyla saptanabilir (28,47). Çok çeşitli substratların peroksidasyonunu katalize eden MPO'nun nötrofillerin azürofil granüllerinde bulunduğu; diğer inflamatuvar hücrelerin MPO üretmedikleri veya çok az içerdikleri belirlenmiştir (20,30,46). Bu nedenle, nötrofil sekestrasyonunun kantitatif olarak ölçülmesinde kullanılan ve duyarlı bir gösterge oluşturan MPO aktivitesi, giderek artan bir popülarite kazanmaktadır.

İnsanlardaki sepsis çalışmalarında ve eksperimental modellerde, hasarlanan dokularda hakim hücrenin nötrofiller olduğu; organ disfonksiyonunun derecesi ile nötrofil sayısı ve nötrofil ürünlerinin konsantrasyonu arasında bir korrelasyon bulunduğu saptanmıştır (25). Ayrıca, bazı eksperimental sepsis modellerinde nötrofil azalmasının yararlı olabileceği belirlenmiştir (48,49). Oysa, sepsis sırasında ajan patojenin ve mikrobiyal toksinlerin fagositozu ve klirensindeki rolleri nedeniyle nötrofillerin konakçının yanıtında önemli oldukları kesinlik kazanmıştır. Ayrıca, nötrofil sayısındaki düşümlere ve fonksiyonundaki anormalliklere artmış bir enfeksiyon riskinin eşlik ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle sepsisli hastalarda konakçının savunma mekanizmalarının güçlendirilmesi amacıyla fagositik hücrelerin üretimi ve fonksiyonlarının modüle edilmesinin yararlı olabileceği savı ileri sürülmüştür (12,47).

Nötrofil ve makrofajların proliferasyon ve diferansiyasyonu, koloni stimulan faktör (CSF) olarak adlandırılan bir glikoprotein grubu tarafından kontrol edilmektedir. Hematopoetik büyüme faktörleri olarak da adlandırılan bu grubun, özellikleri en iyi bilinen temsilcisi, anti-inflamatuvar etkili bir sitokin olan G-CSF'dür (5,12,50).

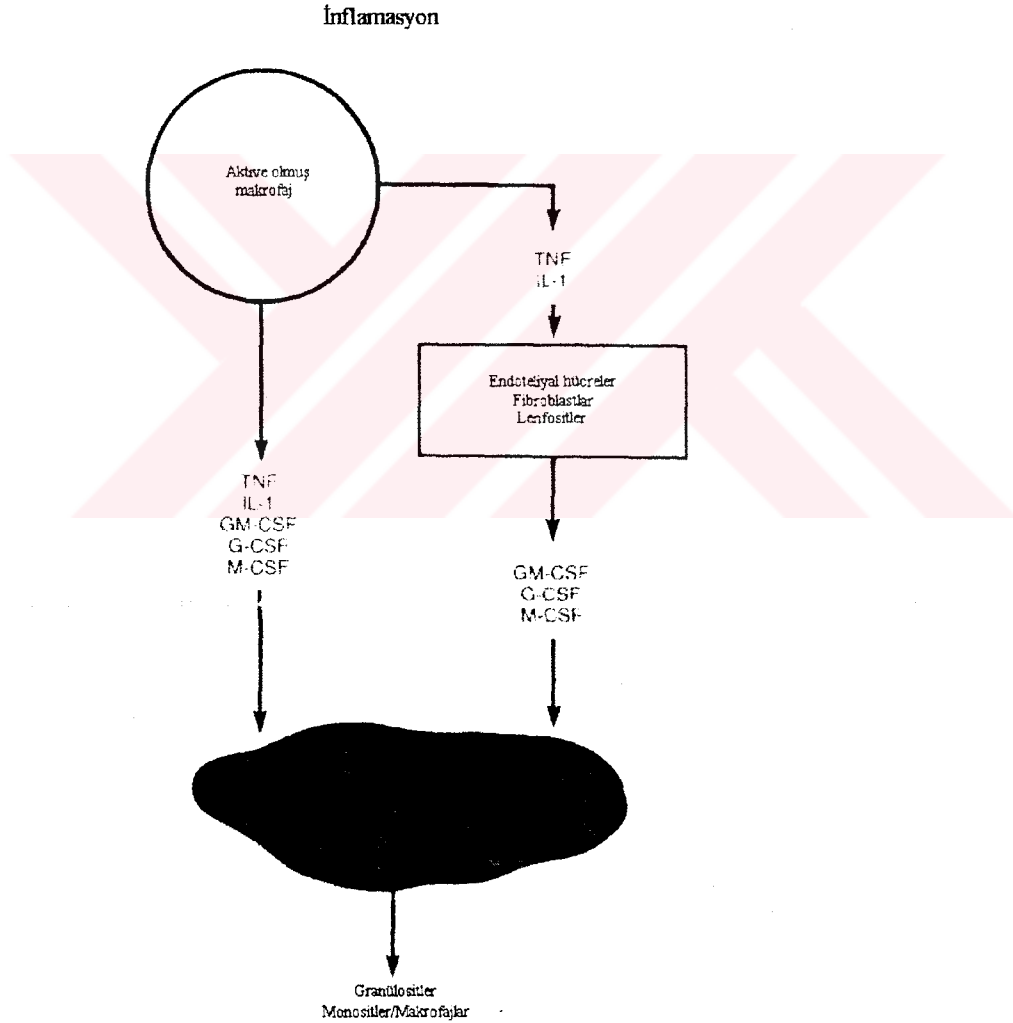
Stroma hücrelerinden ve ekstrasellüler matriksten izole edilen nonglikozile bir protein olan G-CSF, bir yandan fagositozu, oksidan serbestleşmesini, antikora bağımlı sellüler

toksisiteyi, matür granülosit ve makrofajların migrasyon ve kemotaksisini artırırken, diğer yandan primitif kök hücrelerin mitozunu ve diferansiyasyonunu güçlendirip ömürlerini uzatmaktadır (51-56).

Endojen G-CSF, insanda 17. kromozomun kısa kolunda lokalize glikoprotein yapısında bir polipeptiddir (5,12). Rekombinan G-CSF'ün mevcut iki formundan biri insanlardan elde edilmekte (*recombinant human* G-CSF = rhG-CSF); diğeri ise gen teknolojisi kullanılarak *Escherichia coli* bakterilerinden sağlanmaktadır (rG-CSF). Endojen G-CSF, rhG-CSF ve rG-CSF'ün benzer biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. rhG-CSF'ün klinik kullanımına ilişkin ilk verilerin 1990 yılında yayınlanmasının ardından, bu büyüme faktörü 1992 yılından itibaren tüm dünyada kanser hastalarında kullanılmaya başlamıştır. Kemoterapötik ajan uygulanan malignite olgularında ciddi nötropenin süresini kısalttığı, febril nötropenik epizod sayısını azalttığı için, kemoterapinin optimal koşullarda uygulanmasına olanak sağlayan rhG-CSF'ün ayrıca; kemik iliği transplantasyonunun ardından primer ve edinsel nötropeni formlarını düzelttiği, nötrofil derlenmesini hızlandırdığı ve kök hücrelerini periferik kana doğru mobilize ettiği belirlenmiştir (50).

Nötrofilinin eşlik ettiği çok sayıda enfeksiyonda G-CSF düzeyinin yükseldiğinin; nötropenik olgularda ise düştüğünün belirlenmiş olması, söz konusu hematopoetik büyüme faktörünün konakçı savunmasında homeostatik bir rol üstlendiğini telkin etmektedir. G-CSF konsantrasyonlarının pnömoni, kolesistit, üriner enfeksiyon ve sepsis gibi aktif enfeksiyon tablolarının ardından hızla arttığı, enfeksiyonun kontrol altına alınmasından sonra normal düzeylere döndüğü belirlenmiştir (57-60). Bakteriye endotoksinin makrofajları stimüle ederek TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerin oluşmasına yol açtığı; bu sitokinlerin de endotel hücrelerini, fibroblast ve lenfositleri uyararak G-CSF sentezini tetiklediği gösterilmiştir (Şekil 9) (12,61). Erken yanıt sitokinlerinden TNF- α 'nın düşük konsantrasyonda, G-CSF sentezini artırdığı; ancak, konsantrasyon artışıyla miyelopoezise aracılık eden G-CSF reseptörlerinde oluşturduğu *downregülasyon* yoluyla miyelopoezisi süprese ettiği saptanmıştır (57,62). Yüksek plazma G-CSF düzeylerine karşın lökosit sayısı artmayan bazı olgulardaki kötü prognoza dikkati çeken Dale ve arkadaşları (58), "Yüksek G-CSF-Süprese Miyelopoezis" paradoksunu; miyeloid hücrelerdeki G-CSF reseptörlerinin

down regülasyonu ile açıklamaya çalışmışlar; yeterli hücre proliferasyonu sağlamak amacıyla farmakolojik G-CSF dozları uygulanmasını önermişlerdir. Süprese miyelopoezisin bir diğer deyişle nütropenin söz konusu olduğu durumlarda rhG-CSF uygulamasını öneren bu çalışmacıların yanı sıra Weiss ve arkadaşları (6) da söz konusu ajanın endotoksin eliminasyonunu stimüle ettiğini; adhezyon moleküllerinin modülasyonu yoluyla IL-1ra' ni artırarak hiperinflamatuvar durumu hafiflettiğini ve bu mekanizmayla sepsisin MODS'a progresyonunu engellediğini ifade etmişler ve nütropenik sepsiste, güçlü bir anti-inflamatuvar etki profiline sahip olan G-CSF kullanımının yarar sağlayabileceği görüşünü savunmuşlardır.



ŞEKİL 9. İnflamasyon, sitokinler ve koloni stimulan faktörler arasındaki ilişki.

Nötropenin eşlik ettiği sepsis olgularında rhG-CSF kullanımının yarar sağlayabileceğine ilişkin görüş birliğine (11-16) karşın; çok sayıdaki araştırmacı, aktive edilmiş nötrofillerin doku hasarlanmasına ilişkin bilinen etkilerine dikkati çekmişlerdir (20-25).



GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınarak başlatılan bu araştırma Fakültemiz Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Denekler

Çalışmada vücut ağırlığı 200-220 gr olan 32 adet dişi Wistar ratı kullanıldı. Fakültemiz Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan denekler, araştırma öncesinde rat kafeslerinde standart diyetle beslendiler ve 12'şer saatlik gündüz/gece siklusu uygulanarak ortama adapte edildiler.

Anestezi

Çalışma öncesinde su içmelerine izin verilmek koşulu ile 8-10 saat aç bırakılan deneklerin tümünde cerrahi girişim, enjeksiyonlar, kan ve doku örneklerinin alınması işlemleri eter anestezisi altında gerçekleştirildi.

İntra-Abdominal Sepsis

Septik peritonit oluşturmak amacıyla Wichterman ve arkadaşları (63) tarafından tanımlanan ÇLP yöntemi uygulandı. Bu amaçla, eter anestezisi altında 2 cm'lik bir orta hat insizyonunun ardından, tüm vasküler dokular korunarak çekuma ulaşıldı. Çıkan kolonun manipülasyonu ile feçesle dolması sağlanan çekum, antimezenterik yüzden, iliyoçekal valvin hemen distalinden, intestinal obstrüksiyondan kaçınılarak 2-0 ipek ile ligatüre edildi. Ligatüre edilen bu bölüm 18 Gauge kateter ile 2 kez perfore edildi (Resim 1 ve 2). Kanama kontrolünün ardından çekum abdominal kaviteye yerleştirildi ve insizyon iki kat halinde kapatıldı. Subkutan uygulanan % 0.9 sodyum klorür (5 ml/100gr) enjeksiyonu ile

resüsitate edilen denekler çalışma protokolünde bulunan diğer uygulamalara kadar, beslenmelerine izin verilerek kafeslerinde izlendiler.

rhG-CSF

G-CSF uygulanan gruplarda bir rekombinan-metiyonin insan granülosit koloni stimulan faktörü (r-metHuG-CSF) olan filgrastim (Neupogen®-ROCHE)'in 300 µg/ml'lik flakonları kullanıldı. % 5 Dekstroz-Sudaki Solüsyonu ile 30 µg/ml olacak şekilde dilüe edilen preparat, 25µg/kg dozda SC yolla uygulandı.

Kontrol Değerlerinin Belirlenmesi

Ratlarda kan nötrofil sayısı, serum TNF-α düzeyi, akciğer dokusu MPO aktivitesi ve histopatolojisinin kontrol olarak kabul edilecek değer ve görüntülerinin belirlenmesi amacıyla 6 denekte çalışıldı. Bu amaçla kullanılan 6 ratta eter anestezisi altında gerçekleştirilen sternotomi aracılığı ile kan ve doku örnekleri alınıp, elde edilen veriler kontrol değeri (t₀) olarak kabul edildi.



RESİM 1. Çekumun antimezenterik yüzünden ligatüre edilmesi.



RESİM 2. Ligatüre edilmiş çekumun 18 Gauge kateter ile 2 kez perfore edilmesi.

Deney Grupları

SHAM (TAKLİT) GRUBU: Cerrahi girişimin araştırılan parametreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, intra-abdominal sepsis modelinden farklı olarak ÇLP'un uygulanmadığı 6 deneği içeren bu grupta laparotomiye izleyen 12. saatte kan ve doku örnekleri alındı.

G-CSF GRUBU: Normal ratlarda cerrahi girişim ve sepsis söz konusu olmaksızın uygulanan rhG-CSF'ün araştırılan parametreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan ve 6 deneği içeren bu grupta enjeksiyonu izleyen 11. saatte (t_{12}) kan ve doku örnekleri alındı.

SEPSİS GRUBU: ÇLP yöntemi ile oluşturulan intra-abdominal sepsisin etkilerinin araştırıldığı 6 deneği içeren bu grupta, ÇLP'u izleyen 12. saatte (t_{12}) kan ve doku örnekleri alındı.

SEPSİS + G-CSF GRUBU: İntra-abdominal sepsis modelinde rhG-CSF'ün etkilerinin belirlenmesi amacıyla tüm deneklere ÇLP'dan 1 saat sonra rhG-CSF enjekte edildi. 6 deneği içeren bu grupta rhG-CSF enjeksiyonundan 11 saat (ÇLP'dan 12 saat) (t_{12}) sonra kan ve doku örnekleri alındı.

Üzerinde çalışılan 32 rattan 30'una ait veriler araştırma kapsamına alındı. Sepsis modelinde G-CSF uygulamasını izleyen ilk 12 saat içinde kaybedilen 2 rat ise çalışma dışı bırakıldı.

Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Tüm deneklerde eter anestezisi altında gerçekleştirilen sternotomi ile sağ ventrikülden TNF- α ölçümü için düz tüpe 1 ml, nötrofil sayısını belirlemek için etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'lı tüpe 1.5 ml kan örneği alındı. Hazırlanan kalp-akciğer preparatındaki (Resim 3) sol akciğer histopatolojik inceleme için formol içinde tespit edildi. Sağ akciğer ise % 0,9 sodyum klorür ile yüzeysel yıkama ve kurutma işlemlerinin ardından, MPO aktivitesi ölçümü için kullanıldı.



RESİM 3. Kalp-akciğer preparatı.

ÖLÇÜMLER

Kan Nötrofil Sayısı:

Coulter GENS Analyzer (COULTER CORPORATION, Miami, USA) kan hücresi analizörü ile belirlendi.

Serum TNF- α Düzeyi:

Tumour necrosis factor-alpha [(r) TNF α], rat, ELISA system (code RPN 2734, BIOTRAK™, Amersham Life Science, ENGLAND) kiti kullanılarak *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yöntemi ile gerçekleştirilen serum TNF- α düzeyi ölçümleri için, kan örnekleri 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüje edilip, ölçüm anına dek -70°C'de saklandı.

Bir ELISA spektrofotometresi (Sorine Biomedica, Biotek™, ITALY) ile 450 nm dalga boyunda değerlendirilen mikrotitrasyon plağından elde edilen veriler, standart eğri aracılığı ile sayısal değerlere çevrildi.

Akciğer Dokusu MPO Aktivitesi:

Krawisz ve arkadaşları (29) tarafından tanımlanan yöntemle göre gerçekleştirilen bu ölçüm için tartılarak belirlenen 300mg'lık doku örneği kullanıldı. Sonuçlar internasyonal ünite (IU)/yaş doku (gr) olarak ifade edildi. 1 IU MPO aktivitesi 25°C'de 1 µmol hidrojen peroksiti 1 dk'da parçalayan enzim aktivitesi olarak tanımlandı.

AKCİĞERLERİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Kalp-akciğer preparatından sağlanan ve formol içinde tespit edilen sol akciğer doku işleminin ardından parafine gömüldü. Parafin bloklardan akciğerin orta zonuna uyacak şekilde elde edilen 4 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanıp, ×10 objektif kullanılarak mikroskop altında, doku örneklerinin ait oldukları grubu bilmeyen bir patolog tarafından incelendi. Kapiller ve alveollerdeki nötrofil sayısı, alveoler ve interstisiyel ödem ile alveoler hemorajinin derecelendirilmesinde, 0 = patolojik bulgu yok; 1 = hafif; 2 = orta derecede; 3 = ciddi derecede bulgu şeklindeki skorum sistemi kullanıldı (18).

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Araştırmadan elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (ort ± ss) olarak verildi. t₀-t₁₂ değerlerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U, gruplararası karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis testinin ardından Mann-Whitney-U testi kullanıldı. p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

“Sham”, “G-CSF”, “Sepsis” ve “Sepsis + G-CSF” Gruplarında elde edilen ve 6 ratta saptanan kontrol değerleri ile kıyaslanan kan nötrofil sayısı, serum TNF- α düzeyleri ve akciğer dokusu MPO aktivitesine ait sayısal veriler ile istatistiksel anlamlılıkları Tablo 2’de sunulmuştur.

Kan Nötrofil Sayısı

Normal ratlarda cerrahi girişim veya sepsis söz konusu olmaksızın rhG-CSF’ün uygulanması ile oluşturulan G-CSF Grubu’nda, kan nötrofil sayısının t_{12} ölçüm anında hem kontrol değerlerine (t_0), hem de Sham, Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları’na kıyasla anlamlı düzeyde artmış olması, G-CSF’ün nötrofili şeklinde beliren fizyolojik etkisinin bir sonucu olarak yorumlandı (Şekil 10).

Serum TNF- α Düzeyi

Serum TNF- α Düzeyi yönünden Sham, Sepsis ve Sepsis + G-CSF gruplarına kıyasla anlamlı bir farklılık ($p < 0.01$) sergileyen G-CSF grubunda t_{12} ölçüm anında saptanan düşüşün G-CSF’ün TNF- α üzerinde oluşturduğu direkt süpresyondan kaynaklandığı kanısına varıldı (Şekil 11).

Akciğer Dokusu MPO Aktivitesi

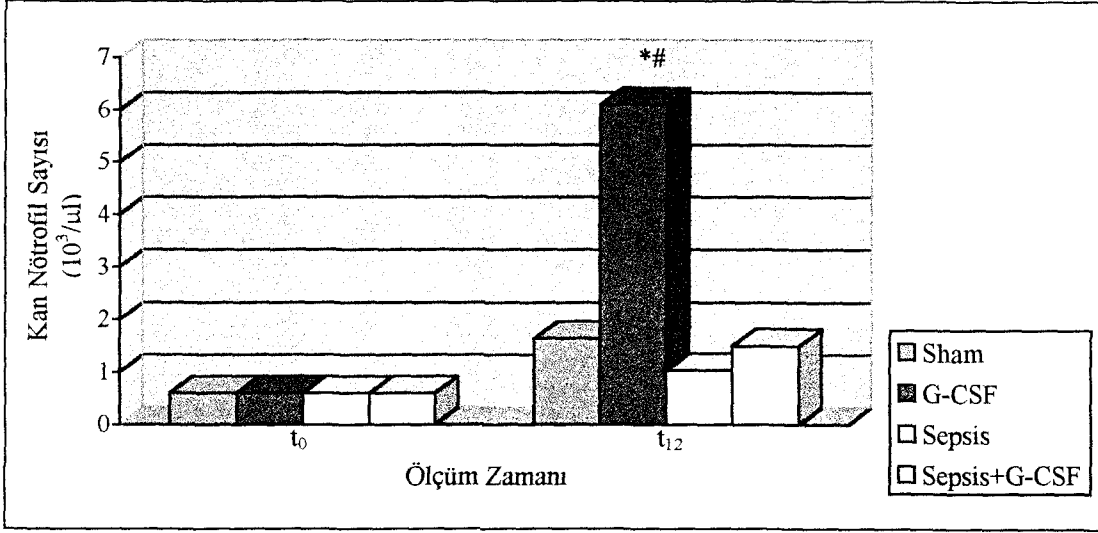
Sham, G-CSF, Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları’nın tümünde akciğer dokusu MPO aktivitesinin, kontrol değerine (t_0) kıyasla anlamlı olarak arttığı ($p < 0.01$) belirlendi (Şekil 12). Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları’nda, Sham Grubu’na kıyasla anlamlı bir farklılık ($p < 0.05$) sergileyen bu artış, akciğer hasarlanmasında rol oynadığı belirtilen nötrofil sekestrasyonu ve aktivasyonunun bir yansıması olarak yorumlandı.

TABLO 2. Deney Gruplarında Saptanan Kan Nötrofil Sayısı, Serum TNF- α Düzeyleri ve Akciğer Dokusu MPO Aktivitesi

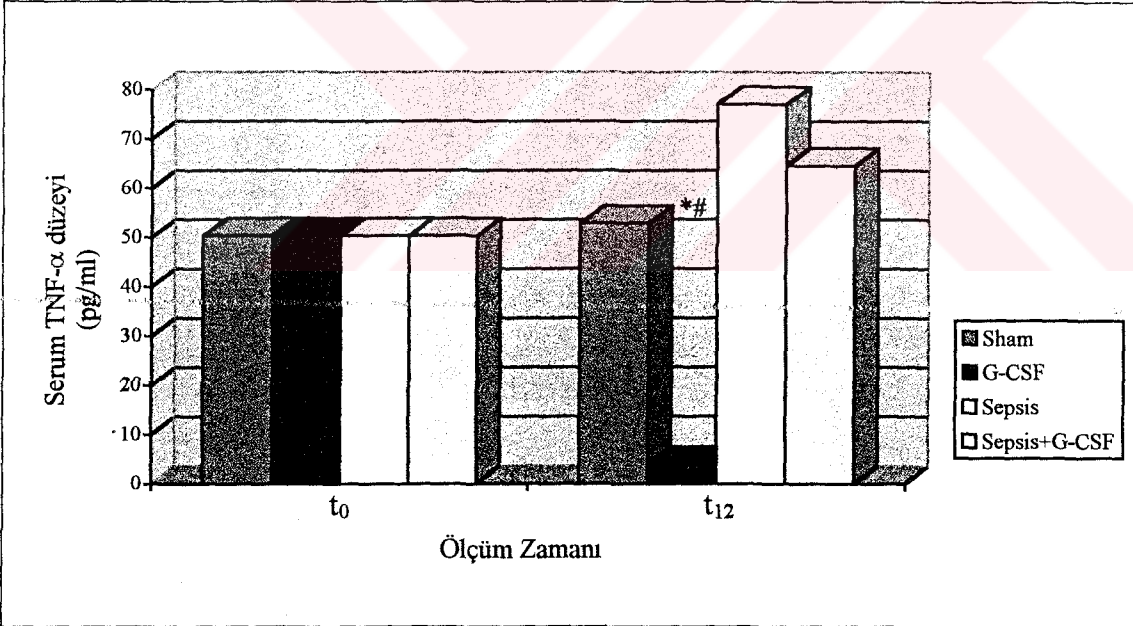
	Kan Nötrofil Sayısı ($10^3 / \mu\text{l}$)	Serum TNF- α Düzeyi (pg / ml)	MPO Aktivitesi [IU / yaş doku (gr)]
Sham (n = 6)	1.64 \pm 1.58	52.86 \pm 19.19	50.67 \pm 36.47*
G-CSF (n = 6)	6.09 \pm 3.61*	3.79 \pm 9.27*	120.00 \pm 69.46*
Sepsis (n = 6)	1.03 \pm 0.97	77.06 \pm 44.00	127.33 \pm 82.75*
Sepsis + G-CSF (n = 6)	1.50 \pm 1.70	64.62 \pm 18.97	166.17 \pm 60.47*

Ort \pm SS, Kontrol değerleri (t_0) (Ort \pm SS): Kan nötrofil sayısı, 0.60 \pm 0.45; serum TNF- α düzeyi, 50.35 \pm 48.16; akciğer dokusu MPO aktivitesi, 10.50 \pm 3.08

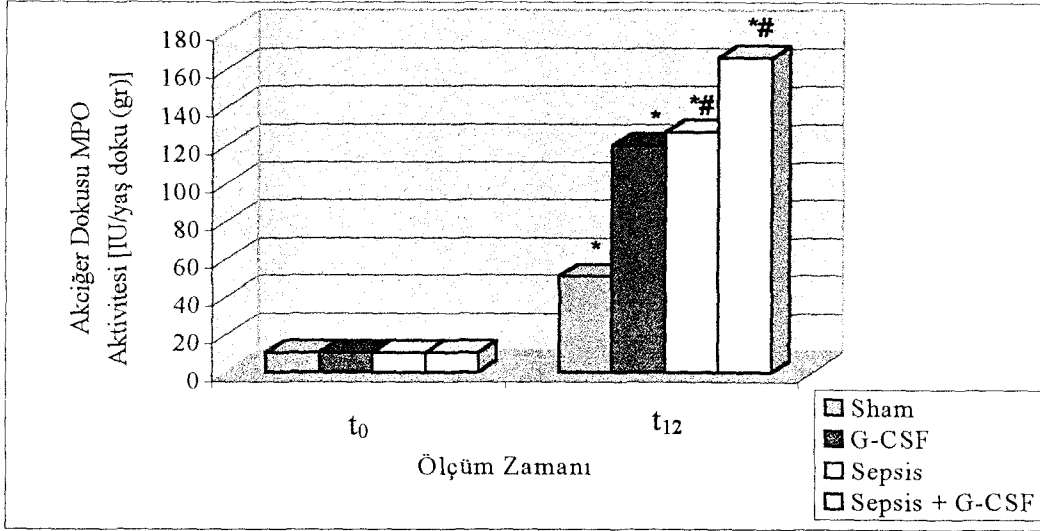
* p < 0.05 Kontrol değerlerine kıyasla



ŞEKİL 10. Kan nötrofil sayılarına ait ortalama değerler. * t₀'a kıyasla anlamlı fark (p < 0.05). # Sham, Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları'na kıyasla gruplararası anlamlı fark (p < 0.05).



ŞEKİL 11. Serum TNF-α düzeylerine ait ortalama değerler. * t₀'a kıyasla anlamlı fark (p < 0.05). # Sham, Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları'na kıyasla gruplararası anlamlı fark (p < 0.01).



ŞEKİL 12. Akciğer dokusu MPO aktivitesine ait ortalama değerler. * t₀'a kıyasla anlamlı fark (p < 0.01). # Sham Grubu'na kıyasla gruplararası anlamlı fark (p < 0.05).

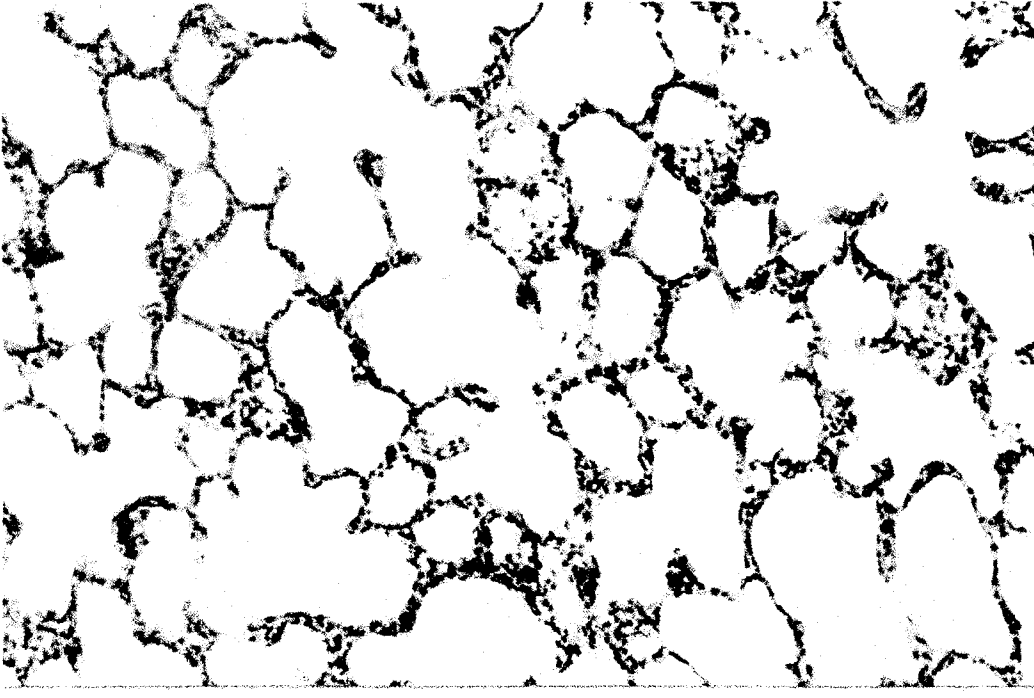
Akciğerlerin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Histopatolojik parametrelerin en belirgin olduğu alanlardaki bulgular Gereç ve Yöntem bölümünde açıklandığı şekilde skorlandı (Resim 4-9).

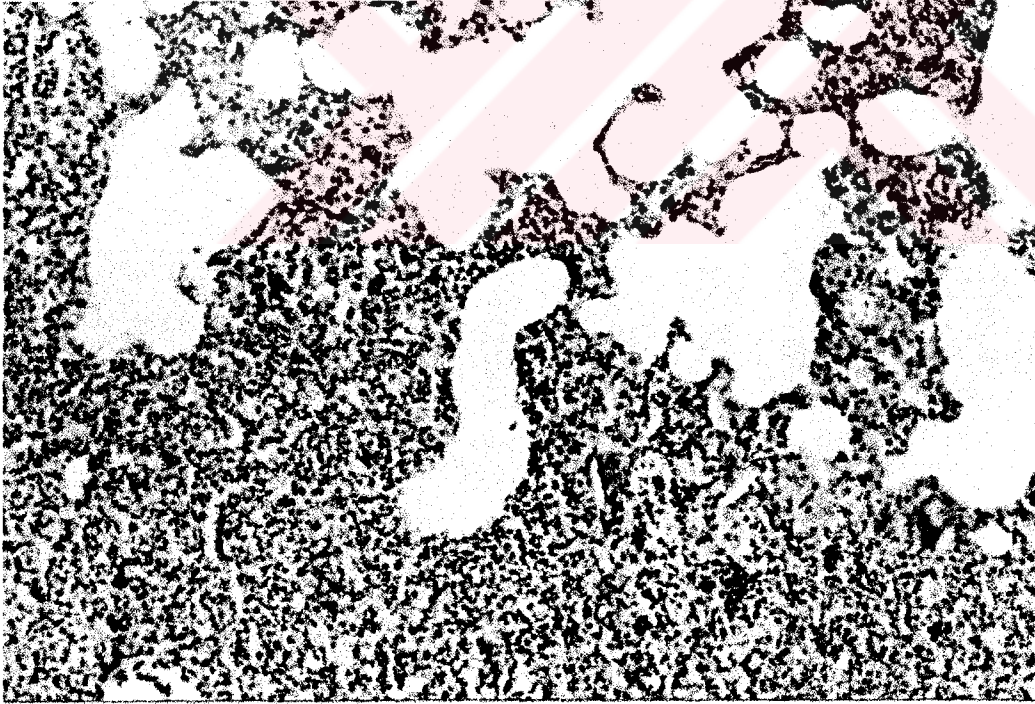
“Sham”, G-CSF”, “Sepsis” ve “Sepsis + G-CSF” Gruplarında elde edilen ve 6 ratta saptanan kontrol değerleri (t₀) ile kıyaslanan kapiller ve alveollerdeki nötrofil sayısına, alveoler interstisiyel ödeme ve alveoler hemorajiye ilişkin skorlar ile istatistiksel anlamlılıkları Tablo 3'de sunulmuştur.

Nötrofil sayısı skoru yönünden Sham ve Sepsis Grupları arasında ortaya çıkan ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan farkın (p<0.05) Sepsis Grubu'nda nötrofillerin enfekte odakta akümüle olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü (Şekil 13).

Deney Grupları'nın hiçbirinde alveoler-interstisiyel ödem ve alveoler hemoraji yönünden kontrol değerlerine (t₀) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.



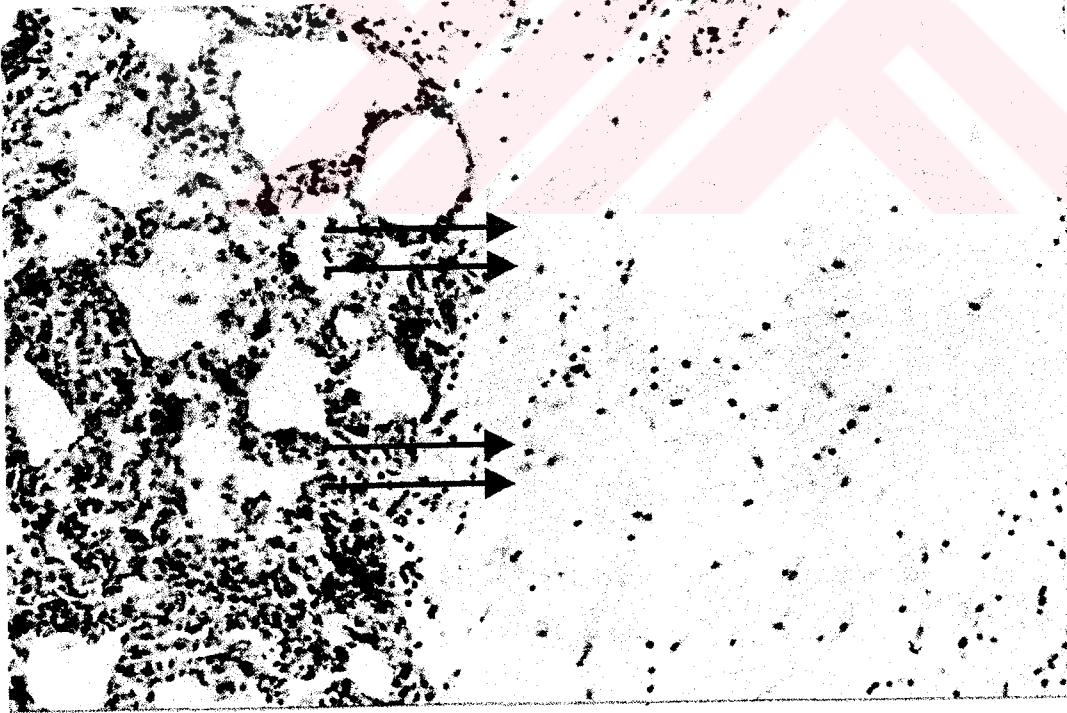
RESİM 4. Akciğerdeki nötrofil infiltrasyonunun skorlama sistemine göre "1" olarak değerlendirildiği preparat örneği (H-E; x 100; Denek No: 2).



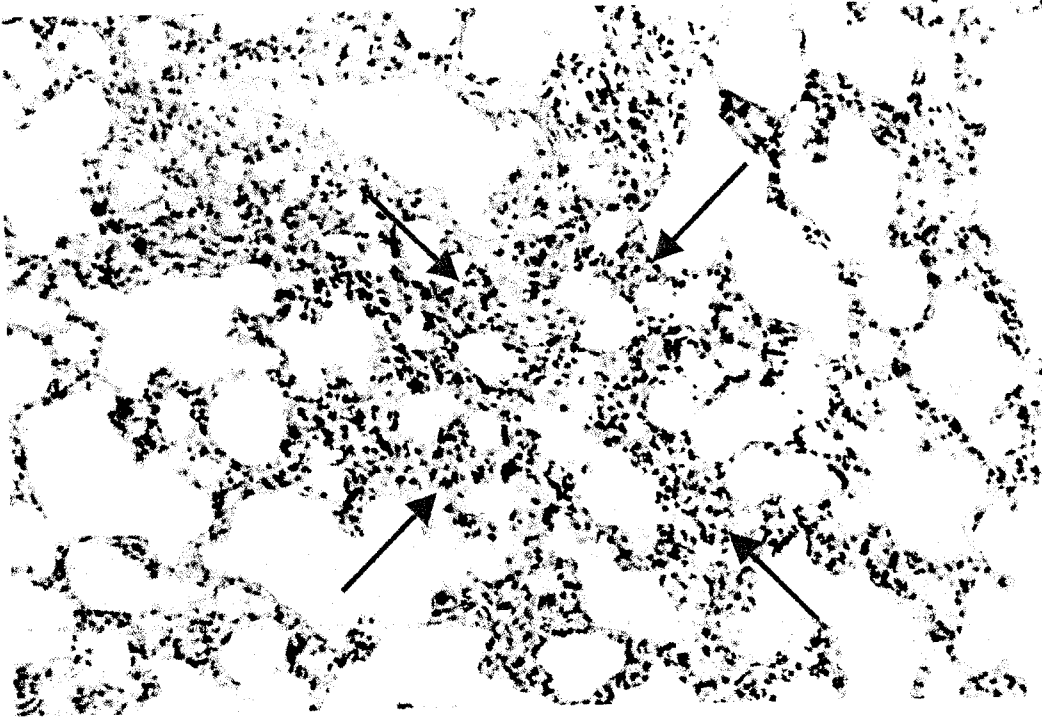
RESİM 5. Akciğerdeki nötrofil infiltrasyonunun skorlama sistemine göre "3" olarak değerlendirildiği preparat örneği (H-E; x 100; Denek No: 10).



RESİM 6. Akciğerdeki alveoler-interstisiyel ödemin skarlama sistemine göre "1" olarak değerlendirildiği preparat örneği (H-E; x 100; Denek No: 1).



RESİM 7. Akciğerdeki alveoler-interstisiyel ödemin skarlama sistemine göre "3" olarak değerlendirildiği preparat örneği (H-E; x 100; Denek No: 14).



RESİM 8. Akciğerdeki alveoler hemorajinin skorlama sistemine göre "1" olarak değerlendirildiği preparat örneği (H-E; x 100; Denek No: 8).



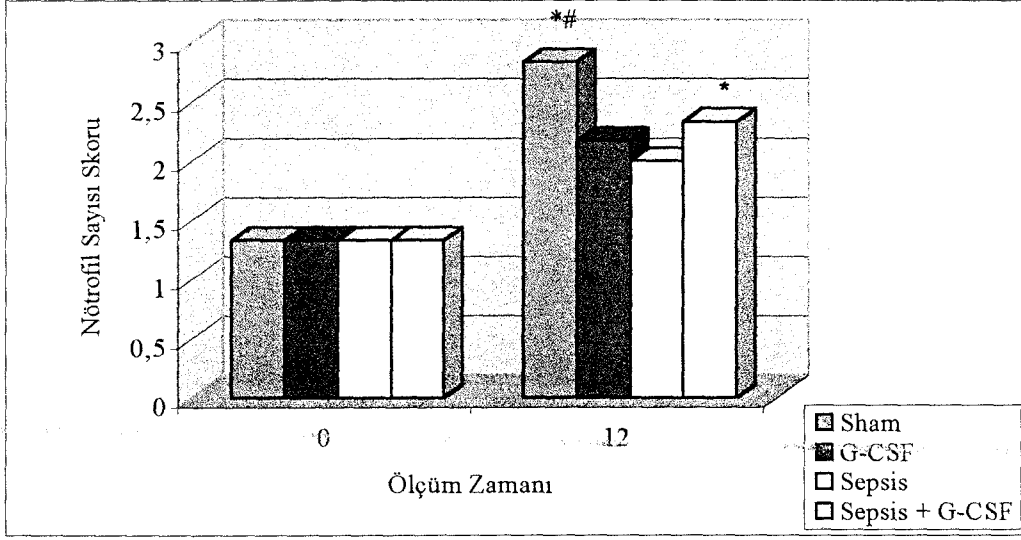
RESİM 9. Akciğerdeki alveoler hemorajinin skorlama sistemine göre "3" olarak değerlendirildiği preparat örneği (H-E; x 100; Denek No: 9).

TABLO 3. DeneY Grupları'nda Saptanan Kapiller ve Alveol lerdeki Nötrofil Sayısı, Aveoler- İnterstisiyel Ödem ve Alveoler Hemoraji

	Nötrofil Sayısı	Alveoler – İnterstisiyel Ödem	Alveoler Hemoraji
Sham (n = 6)	2.83 ± 0.41*	1.17 ± 0.75	1.33 ± 1.03
G-CSF (n = 6)	2.17 ± 0.75	1.33 ± 0.82	2.00 ± 1.26
Sepsis (n = 6)	2.00 ± 0.63	0.50 ± 0.55	1.67 ± 1.21
Sepsis + G-CSF (n = 6)	2.33 ± 0.52*	0.67 ± 0.52	1.67 ± 1.03

Ort ± SS, Kontrol değerleri (t₀) (Ort ± SS): Kapiller ve alveoler nötrofil sayısı skoru, 1.33 ± 0.52; alveoler - interstisiyel ödem skoru, 0.67 ± 0.82; alveoler hemoraji skoru, 1.17 ± 0.98

* p < 0.05 Kontrol değerlerine kıyasla



ŞEKİL 13. Akciğer nötrofil histopatolojik skorlamasına ait ortalama değerler. * t_0 'a kıyasla anlamlı fark ($p < 0.01$). # Sepsis Grubu'na kıyasla gruplararası anlamlı fark ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Sepsis, yoğun bakım ünitelerindeki spesifik antibiyoterapiye, dikkatli monitörizasyona, uygun destek tedavilerine ve agresif cerrahi girişimlere karşın yüksek bir mortalite ile seyretmektedir (64). Septik hastalarda klinik tablonun, etyolojik faktörlerin ve yandaş sorunların yarattığı farklılıklar, kontrollü çalışmaların yapılmasını güçleştirmekte ve klinik tabloların taklit edildiği hayvan çalışmalarının popülarite kazanmasına yol açmaktadır (63).

Laboratuvar hayvanlarında sepsis oluşturmak amacıyla kullanılabilir yöntemleri derleyen Wichtermann ve arkadaşları (63) kullanılan modelleri:

- Canlı mikroorganizmaların intravenöz infüzyonu,
- Peritoneal kaviteye fekal materyal veya canlı mikroorganizma uygulanması,
- Ekstremitelere, yumuşak dokulara enfekte materyal implantasyonu ile apse oluşturulması, ve
- Cerrahi girişim ile gastrointestinal traktüsteki normal bariyerlerin hasarlanması şeklinde gruplandırmışlardır.

Konsantre canlı *Escherichia coli*'nin İV infüzyonu yoluyla oluşturulan sepsisin, böylesine masif bakteri yüküyle karşılaşmayan, daha çok septik bir odaktan aralıklı fakat inatçı bakteri serbestleşmesi yaşayan septik hastalardaki durumu tam olarak yansıtmadığı gösterilmiştir (65). Peritoneal kaviteye fekal materyal veya ekstremiteler ve yumuşak dokulara enfekte materyal implantasyonunun da rat veya köpeklerde minimal boyutta lokal ya da sistemik bir yanıtı açma; her denekte tam olarak oluşturulamama gibi dezavantajlar içerdiği belirlenmiştir (66,67).

Cerrahi girişim ile gastrointestinal traktüsteki normal bariyerlerin hasarlanması yoluyla sepsis oluşturulmasında yaygın bir uygulama alanı bulan ÇLP modeli sepsiste görülen

doku ve organ değişikliklerinin fizyopatolojisi ile, yeni tedavi modellerinin araştırılmasına olanak sağlama; ayrıca, standardize rat popülasyonunda kullanılmaya elverişli, ucuz ve tekrarlanabilir bir yöntem olma avantajlarına sahiptir (63). Bağırsak perforasyonu veya anastomoz kaçağına bağlı polimikrobiyal peritoniti en iyi şekilde taklit ettiği saptanan ÇLP modelinin, klinikte gözlenen birçok inflamatuvar ve patolojik sekelin incelenmesine olanak sağladığı konusunda görüş birliğine varılmıştır (63,68).

MODS'a neden olan etmenler arasında ilk sırada yer alan ve % 40-50 oranında fatal seyreden sekonder bakteriyel peritonitin (69-71) incelendiği araştırmamızda Wichtermann ve arkadaşları (63)'nın önerileri doğrultusunda pahalı olmamaları, kolay sağlanabilmeleri, yaş, cinsiyet ve genetik kökenlerinin kontrol edilebilmesi, aynı diyetle beslenmeleri ve spesifik bir patojen içermemeleri nedeniyle ratlarda çalışılması yeğlenmiştir. Sıçanlarda ÇLP yöntemiyle oluşturdukları intra-abdominal sepsiste cinsiyetin anlamlı bir rol oynamadığını belirleyen Baker ve arkadaşları (72)'nin sonuçlarına dayanarak hormonal bir etmenin araştırılmadığı çalışmamızda, laboratuvarımızda bulunan dişi ratlar kullanılmıştır.

G-CSF'ün nötrofil kinetiğine etkisini araştırmak amacıyla Lewis tipi ratlarda çalışan Ulich ve arkadaşları (73), ratlarda rhG-CSF'ün aktif olduğunu kanıtlamışlardır. Wistar tipi ratlarda Toda ve arkadaşları (27)'nin da benzer veriler elde etmelerine dayanılarak, sepsiste G-CSF'ün etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada rhG-CSF kullanılması uygun görülmüştür.

rhG-CSF'ün ratlarda aktif olduğuna ilişkin bu fikir birliğine karşın, söz konusu ajanın uygulanma zamanı konusunda büyük farklılıklar bulunduğu dikkati çekmiştir (14,15,26,27). Ratlarda oluşturulan intra-abdominal sepsis modelinde rhG-CSF uygulayan araştırmacıların, bu uygulamayı sepsis indüksiyonundan 7 gün önce (26), 1 gün önce (26), sepsis indüksiyonu sırasında (15), sepsis indüksiyonundan 1 saat (14), 3 saat (27) veya 4 saat sonra (15) gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Ratlarda ÇLP yöntemiyle oluşturdukları intra-abdominal sepsis modelinde rhG-CSF'ü sepsis indüksiyonundan 7 gün önce, 1 gün önce veya 4 saat sonra uygulayan Lundblad ve arkadaşları (26), uygulama zamanı ile mortalite oranı arasında anlamlı bir ilişki saptamamışlardır. Lundblad ve arkadaşları (26)'nin verilerine dayanılarak ve kliniğe uyarlanabilirliği dikkate alınarak bu çalışmada rhG-CSF'ün sepsis indüksiyonundan sonra uygulanması yeğlenmiş; ÇLP yönteminde

sepsisin perforasyonu izleyen dakikalar içinde geliştiğini bildiren Wichterman ve arkadaşları (63)'nin verileri göz önünde bulundurularak, rhG-CSF'ün sepsis indüksiyonundan 1 saat sonra uygulanmasına karar verilmiştir.

rhG-CSF'ün uygulama zamanı konusunda gözlenen büyük farklılıkların enjeksiyon yolu için de geçerli olduğu; ajanın SC (14), İV (15) veya intraperitoneal (İP) (27) yolla uygulanabildiği belirlenmiştir. Bu çalışmada, söz konusu ajanın İV veya SC yolla uygulanmasının nötrofil kinetiği üzerinde benzer etkiler oluşturduğunu saptayan Ulich ve arkadaşları (73)'nin verilerine dayanılarak SC yaklaşım yeğlenmiştir.

Cerrahi girişimin araştırılan parametreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla oluşturduğumuz Sham Grubu'nda uygulanan laparotomiden 12 saat sonra kan nötrofil sayısında kontrol değerine kıyasla anlamlı bir değişiklik oluşmadığı belirlenmiştir. Bu sonucun, normal ratlarda laparotomiye izleyen 4, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerde kan nötrofil sayısında anlamlı bir değişiklik saptamadığını bildiren Lundblad ve arkadaşları (15)'nin verileri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

G-CSF Grubu'nda t_{12} ölçüm anında hem t_0 kontrol değerine hem de Sham, Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları'na kıyasla anlamlı düzeyde artmış bulunan kan nötrofil sayısının Ulich ve arkadaşları (73)'nin yorumu ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Normal ratlarda rhG-CSF'ün neden olduğu nötrofilinin kinetik ve mekanizmasını araştıran Ulich ve arkadaşları (73) İV yolla uygulanan 20-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rhG-CSF'ün dolaşımdaki nötrofil sayısını yaklaşık 4-6 kat artırdığını; enjeksiyondan 30 dakika sonra başlayan ve 12. saatte zirveye ulaşan bu artışın kademeli bir düşüşle 24-36. saatlerde normale döndüğünü; daha yüksek dozların daha inatçı bir nötrofiliye neden olduğunu göstermişlerdir. G-CSF'ün neden olduğu nötrofilinin, jeneralize bir miyeloid hiperplazinin sonucu olduğunu savunan Ulich ve arkadaşları (73) miyeloid diferansiyasyonda en az dört mekanizmanın etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. G-CSF'ün uygulanmasını izleyen ilk 4-12. saatlerde bir büyüme faktörü gibi etki ettiğini savunan çalışmacılar miyeloblast ve promiyelositlerde mitoz sayısını, hücre büyüklüğünü, bazofiliyi ve sitoplazmik granülasyonu artırdığını belirtmişlerdir. G-CSF'ün "kemik iliği serbestleştirici faktör" olarak rol oynadığı ikinci mekanizmada kemik iliğindeki matür nötrofillerin sistemik dolaşıma geçişini artırdığını

ifade etmişlerdir. Üçüncü mekanizmayı G-CSF'ün bir mediyatör gibi davranarak nötrofil adhezyon moleküllerini, endotel-nötrofil ilişkisini etkilediği ve bu yolla erken dönemde hızlı ve geçici bir periferik nötropeniye yol açtığı şeklinde özetleyen Ulich ve arkadaşları (73) sonuncu mekanizmada G-CSF'ün neden olduğu nükleer hipersegmentasyonun rol oynadığını belirtmişlerdir.

ÇLP yöntemiyle sepsis oluşturduğumuz 6 ratta kan nötrofil sayısında sepsis indüksiyonundan 12 saat sonra hem t_0 kontrol değerine, hem de diğer deney gruplarına kıyasla anlamlı bir değişiklik oluşmadığı saptanmıştır. Bu sonucun, ratlarda aynı yöntemle intra-abdominal sepsis oluşturan ve kan nötrofil sayısında sepsis indüksiyonunu izleyen 6., 12., 18. ve 24. saatlerde anlamlı bir değişiklik gözlenmediğini bildiren Toda ve arkadaşları (27)'nin sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. İnsanda endotel hücrelerini ve fibroblastları G-CSF sentezi için stimüle eden IL-1'in, ÇLP'un letalitesini azalttığına dikkati çeken bu çalışmacılar, intra-abdominal sepsisin lökositlerde IL-1 reseptörlerinin açığa çıkmasını azalttığını ve lökosit aktivitesini bozduğunu vurgulamışlardır. Toda ve arkadaşları (27) G-CSF'ün kemik iliği hücrelerinde IL-1 reseptörlerinin açığa çıkmasını stimüle edebildiğine; G-CSF ile IL-1 reseptörleri arasındaki bu pozitif *feed-back* mekanizmasının enfeksiyona karşı defans gelişimiyle yakından ilişkili olduğuna dayanarak peritonit gibi enfeksiyonlarda diğer proinflamatuvar sitokinlerle birlikte G-CSF üretildiğine dikkati çekmişlerdir. Sepsis grubunda anlamlı bir değişiklik saptamadıkları kan nötrofil sayısını ciddi enfeksiyonlarda endojen G-CSF'ün nötrofil fonksiyonlarını etkileme konusunda yetersiz kalması ile açıklamaya çalışan araştırmacılar, bu noktayı açıklığa kavuşturmak için sepsiste G-CSF'ü de içerecek şekilde dolaşımdaki sitokinlere ilişkin değişiklikleri konu alan ileri çalışmalara gereksinim duyulduğunu belirtmişlerdir.

Ratlarda ÇLP yöntemi ile oluşturdukları intra-abdominal sepsisi izleyen ilk 36 saatlik dönemde kan nötrofil sayısında anlamlı bir değişiklik gözlenmediğini belirten Zhang ve arkadaşları (14) sepsis indüksiyonundan 48 saat sonra dolaşımdaki nötrofillerde oluşan yaklaşık %40 oranındaki düşüşün sepsis sırasında konakçının kan nötrofil konsantrasyonunu sürdürme ve immün efektör hücrelerin artmış gereksinimi karşılama konusunda yetersiz kalmalarından kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

Ratlarda fulminan intra-abdominal sepsiste miyelopoezisi ve konakçı savunmasını artırmak amacıyla rhG-CSF uygulayan Lundblad ve arkadaşları (15), kan nötrofil sayısında sepsisi izleyen 4. saatten itibaren anlamlı bir düşüş gözlendiğini saptamışlardır. Sonuçlarını, sepsis sırasında nötrofillerin enfeksiyon odağında tüketilmesi; akciğer, dalak, karaciğer gibi uzak ve enfekte olmayan organlarda sekestre olmasıyla açıklayan Lundblad ve arkadaşları (15), sepsiste artmış nötrofil döngüsünü karşılayacak düzeyde bir miyelopoezisin gerçekleşmemesi halinde nötropeni görülebileceğini ifade etmişlerdir.

Enfeksiyon odağına nötrofil göçünün konu alındığı bir başka çalışmada Mercer-Jones ve arkadaşları (74) farelerde ÇLP sonrasında peritoneal makrofajların savunmanın birinci, nötropeni ile sonuçlanacak şekilde peritoneal kaviteye göç eden nötrofillerin ise ikinci basamağını oluşturduklarını; bir seri nötrofilin ise karaciğer ve akciğerde sekestre olduğunu saptamışlardır.

Sepsis Grubu'na benzer şekilde Sepsis+G-CSF Grubu'nda da kan nötrofil sayısının hem t_0 kontrol değerine, hem de diğer çalışma gruplarına kıyasla anlamlı bir değişiklik sergilemediği belirlenmiştir. G-CSF Grubu'ndaki normal ratlarda kan nötrofil sayısında anlamlı bir artışa neden olduğunu saptadığımız rhG-CSF'ün sepsis oluşturulmuş deneklerimizde nötrofiliye yol açmaması rhG-CSF'ün sepsiste enfekte odağa oluşan nötrofil göçünü daha da artırıyor olmasıyla açıklanabilir (27). Sepsis+G-CSF Grubu'nda elde ettiğimiz bu sonucun ratlarda ÇLP yöntemiyle oluşturdukları intra-abdominal sepsis modelinde sepsis indüksiyonundan üç saat sonra 15µg/kg dozda uyguladıkları rhG-CSF'ün terapötik etkinliğini araştıran Toda ve arkadaşları (27)'nin verileriyle uyumlu olduğu saptanmıştır. Sepsis tablosunda rhG-CSF enjeksiyonunun ardından mortalite oranının belirgin şekilde azaldığını, kan nötrofil sayısında ise anlamlı bir değişiklik gözlenmediğini ifade eden bu çalışmacılar peritoneal kavite nötrofil sayısında anlamlı bir artış olduğunu belirlemişlerdir. Toda ve arkadaşları (27) rhG-CSF uyguladıkları sepsis grubunda yaşam süresinde gözledikleri olumlu değişikliği rhG-CSF'ün etkisi ile aktive olmuş nötrofillerin enfeksiyon bölgesinde birikmesi ile açıklamışlar; G-CSF'ün nötrofillerin kemotaktik aktivitesini ve endotel hücrelerine adhezyon yeteneğini artırdığını dikkate alarak, periferik nötrofil sayısı artmasa da mevcut hücre göçünün efektif olabileceği sonucuna varmışlardır.

ÇLP yöntemini kullanan ve sepsis indüksiyonundan 1 saat sonra, peritoneal lökosit fonksiyonlarını güçlendirmek amacıyla SC yolla 50 µg/kg dozda rhG-CSF uygulayan Zhang ve arkadaşları (14), kan nötrofil sayısında 4. saatte başlayan ve 12. saatte zirveye ulaşan bir artış saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmacılar, erken dönemde ortaya çıkan nötrofilinin kemik iliğinden sistemik dolaşıma matür ve immatür nötrofil girişinin tetiklenmesi ile açıklanabileceğini; kan nötrofil sayısında geç dönemde de süren artışın ise kök hücrelerdeki proliferasyondan kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Sepsis modeli, rhG-CSF uygulama yolu ve zamanı yönünden aynı yöntemleri kullanmış olmamıza karşın, Zhang ve arkadaşları (14)'ninkinden farklı sonuçlar elde etmiş olmamız, söz konusu koşullarda kan nötrofil sayısında, kullanılan rhG-CSF dozunun etkili olabileceğini telkin etmektedir.

Akut inflamasyonu presipite eden olaylar kaskadını başlatmada aktif bir rol oynayan “Erken Yanıt Sitokinleri”nden olan TNF-α'nın serum düzeylerine ilişkin ölçümler, Sham Grubu'nda gerek t₀ kontrol değerine, gerekse diğer çalışma gruplarına kıyasla anlamlı bir değişiklik oluşmadığını göstermiştir. Bu sonucun, eksperimental endotoksemi modellerinde endotoksin uygulanmasının ardından 1 saat gibi erken bir dönem içinde TNF düzeylerinin yükseldiği ve 3 saat içinde kontrol değerine döndüğünü gösteren çalışmacılara ait verilerle uyumlu olduğu gözlenmiştir (37-40).

Serum TNF-α düzeylerine ilişkin en çarpıcı sonuçların elde edildiği G-CSF Grubu'nda hem t₀ kontrol, hem de Sham, Sepsis, Sepsis+G-CSF Grupları'na kıyasla anlamlı bulunan düşüşün G-CSF'ün TNF-α üzerinde oluşturduğu direkt süpresyondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (10). Normal deneklerde G-CSF uygulamasının TNF-α düzeyi üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir eksperimental çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak gönüllülerde G-CSF'ün kan sitokin yanıtına etkisinin *ex vivo* olarak araştırıldığı bir çalışmada nötrofillerden ve monositlerden IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra)'nin serbestleştiği ve bunun da IL-1 ve TNF salınmasını baskıladığı gösterilmiştir (7).

Çalışmamızın Sepsis Grubu'nda serum TNF-α düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bir artış saptanmıştır. Ratlarda oluşturdukları fulminan intra-abdominal sepsiste serum TNF konsantrasyonunda geçici bir artış gözlemlendiğini bildiren Lundblad ve

arkadaşları (26), 4.saatteki artışın 8.saatte saptanamadığını ifade etmişlerdir. Eichacker ve arkadaşları (16) da köpeklerdeki bir bakteriyel sepsis modelinde serum TNF düzeyinin sepsis indüksiyonundan 2 saat sonra zirveye ulaştığını, 4.saatten itibaren düşme gösterdiğini ve 8 saat sonra ise kontrol değerine döndüğünü belirlemişlerdir. Sepsis modellerinde serum TNF- α düzeylerine ilişkin bu çelişkili veriler; klinik sepsiste dalgalanan ve tekrarlanan TNF serbestleşmesinin günlerce sürebildiği şeklindeki sonuçlarla açıklanabilir (75-77).

Sepsiste uygulanan G-CSF'ün TNF- α düzeyine etkilerinin araştırıldığı eksperimental çalışmaların tümünde G-CSF enjeksiyonunun sepsis indüksiyonu öncesinde ya da sırasında gerçekleştirildiği; en erken 90.dakikaya, en geç 8.saate ait TNF- α düzeylerinin belirlendiği dikkati çekmektedir. Söz konusu çalışmaların tümünde sepsiste G-CSF uygulamasının TNF- α düzeyinde anlamlı bir düşüşe neden olduğunu belirleyen çalışmacılar bu sonucu, G-CSF'ün;

-direkt bir etki ile makrofajlarda TNF sentez ve serbestleşmesini süprese etmesine;

-indirekt bir etki ile, nötrofillerin fagositik aktivitelerini artırmasına ve bu yolla TNF sentezini stimüle eden faktörü ortadan kaldırmasına bağlamışlardır (10,16,26).

Literatürden elde edilen verilerden farklı olarak bu çalışmadaki Sepsis+G-CSF Grubu'nda TNF- α düzeyinde bir düşüş belirlenmemiş olmasının;

-G-CSF uygulamasının sepsis indüksiyonundan 1 saat sonra gerçekleştirilmesinden,

-TNF- α düzeyinin sepsis indüksiyonundan 12 saat sonra belirlenmesinden ve/veya,

-klinik sepsiste saptanan ve günlerce sürebilen "dalgalanan, tekrarlanan TNF serbestleşmesi"nden kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır.

Nötrofillerin azurofil granüllerinde bulunan, nötrofil sekestrasyonunun kantitatif olarak ölçülmesinde duyarlı bir göstere oluşturan ve çalışma gruplarının tümünde t_0 kontrol değerine kıyasla anlamlı bir değişiklik gösterdiği belirlenen MPO aktivitesinin Sepsis ve Sepsis+G-CSF Gruplarında Sham Grubu'na kıyasla anlamlı boyutta bir artış sergilediği gözlenmiştir.

Altı ratta laparotomi uygulayarak oluşturduğumuz Sham Grubu'na ait akciğer dokusu MPO aktivitesi sonuçlarını kıyaslayabileceğimiz eksperimental veya klinik bir araştırmaya rastlanamamış; bu çalışma grubunda t_0 kontrol ölçülerine kıyasla anlamlı bulunan MPO aktivitesi artışları;

-laparotominin oluşturduğu cerrahi stimulusun lokal ve/veya sistemik bir inflamatuvar yanıtı tetiklemiş olmasına;

-Erken Yanıt Sitokinleri'ne bağlı olarak kan nötrofil sayısında anlamlı bulunmasa da bir artış gözlenmesine,

-sayıları ve büyük olasılıkla fonksiyonları değişime uğramış olan nötrofillerin, açılan intra-abdominal kavitede enfekte bir odak bulunmadığı için akciğer, karaciğer, dalak gibi uzak organlarda sekestre olmasına bağlanmıştır (78,79).

Çalışmamızın G-CSF Grubu'nda akciğer dokusu MPO aktivitesinde t_0 kontrol değerine kıyasla anlamlı bulunan artışın Allen ve arkadaşları (52)'nin klinik bir çalışmalarından elde ettikleri sonuçlarla açıklanabileceği düşünülmüştür. "Sağlıklı Gönüllülerde rhG-CSF'ün Nötrofilin Oksidatif Fonksiyonları Üzerine *In Vivo* Etkileri" başlıklı bu çalışmada 30-300 $\mu\text{g/gün}$ dozda uygulanan G-CSF'ün matür nötrofillerin daha fazla miktarda azürofilik granül ve MPO içermesine yol açtığı belirlenmiştir. Daha yüksek dozda G-CSF'ün nötrofil gelişmesinde sola kaymaya neden olarak daha az segmentasyonu olan daha büyük nötrofillere, azürofilik granülasyonda ve MPO içeriğinde artışa neden olacağı gösterilmiştir. rhG-CSF preparatı olarak kullanılan Filgrastim'in konu alındığı bir derlemede de ajanın sağlıklı gönüllülerde nötrofiliyi tetiklediği; dozla-orantılı bir şekilde immatür hücrelere doğru bir sola kaymaya neden olduğu ifade edilmiştir. Filgrastim'in 1 $\mu\text{g/kg}$ dozda uygulandığı gönüllülerde periferik kanda saptanamayan band şeklinde nötrofiller ve immatür nötrofillerin ajanın 10 $\mu\text{g/kg}$ dozda uygulandığı olgularda total lökositlerin %20'sini oluşturduğu ve bu oranın 60 $\mu\text{g/kg}$ 'lık enjeksiyonların ardından %35'e ulaştığı belirlenmiştir. Filgrastim ile tedavi edilen hastalarda ise nötrofillerde Döhle cisimleri, azürofilik granül artışı, hiper veya hiposegmentasyon gözlenebileceği ifade edilmiştir (50).

Literatür taraması ile sepsis modelinde akciğer dokusu MPO aktivitesi değişikliklerinin araştırıldığı iki eksperimental çalışmaya ulaşılmıştır. Domuzlarda endotoksine karşı oluşan sistemik ve pulmoner yanıtlar üzerine G-CSF'ün etkisini araştıran Fink ve arkadaşları (30), sepsis oluşturdukları 4 gruptaki denekleri, 1. Grupta serum fizyolojik ile, 2. Grupta Ringer Laktat solüsyonu ile resüsite etmişler, 3. Grupta herhangi bir sıvı tedavisi uygulamayan çalışmacılar 4. Grupta sepsisten 5 gün önce İV yolla uyguladıkları 5 µg/kg G-CSF ile gerçekleştirdikleri bir tedavinin etkisini araştırmışlardır. Normal domuzlarda akciğer dokusu MPO aktivitesine ait kontrol değerlerinin saptanmadığı bu çalışmada G-CSF uygulanan sepsis grubunda belirlenen MPO aktivitesinin, serum fizyolojik ile resüsite edilen sepsis grubuna kıyasla anlamlı derecede daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonucu sürpriz olarak karşılamadıklarını belirten Fink ve arkadaşları (30), G-CSF tedavisinin neden olduğu nötrofilinin akciğerde daha fazla lökosit sekestrasyonu ile sonuçlandığı görüşünü savunmuşlardır.

Sepsis modelinde akciğer dokusu MPO aktivitesi değişikliklerinin araştırıldığı ikinci çalışma domuzlarda polimikrobiyal sepsis ve hemorajik şok modelinde G-CSF'ün konakçı savunma mekanizmalarına etkilerini çalışan Patton ve arkadaşları (13)'na aittir. Sepsis oluşturdukları deneklerden elde ettikleri akciğer dokusu MPO aktivitesi değerlerini sepsis+hemorajik şok oluşturarak 5 µg/kg dozda G-CSF enjekte ettikleri deneklerden ve "sepsis + hemorajik şok + plasebo" uyguladıkları gruptan elde ettikleri sonuçlarla karşılaştıran Patton ve arkadaşları (13), gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmadığını saptamışlardır. Akciğer dokusu MPO aktivitesi değerlerini hemodinamik veriler, bronkoalveoler lavaj sıvısına ait protein-lökosit içeriği ve abdominal otopsi bulguları ile birlikte değerlendiren çalışmacılar, sonuçlarını resüsitasyon aşamasında uygulanan G-CSF'ün nötrofil proliferasyonunda ve fonksiyonundaki artış nedeniyle travma sonrasında gelişen sekeli azalttığı, nötrofil kaynaklı akciğer reperfüzyon hasarına yol açmadığı şeklinde yorumlamışlardır.

Çalışmamızın Sepsis ve Sepsis+G-CSF Gruplarında akciğer dokusu MPO aktivitesinde gözlenen, hem t_0 kontrol değerine, hem de Sham Grubu'na kıyasla anlamlı bulunan artışın, Fink ve arkadaşları (30) ile Patton ve arkadaşları (13)'nin yorumlarıyla açıklanabileceği kanısına varılmıştır.

Ratlarda intra-abdominal sepsis modelinde uygulanan G-CSF'ün akciğer üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızda tüm gruplara ait akciğer dokusu MPO aktivitesi değişikliklerinin hem literatür ile direkt veya indirekt bir uyum sergiledikleri hem de klasik bilgilerle açıklanıp yorumlanabildikleri gözlenmiştir. Nötrofil akümülyasyonunun kantitaze edilmesinde güvenilir bir gösterge oluşturduğu belirlenen MPO aktivitesi ile dokudaki hücre sayısı arasında lineer bir ilişki bulunduğunu kanıtlayan çalışmacıların verilerine dayanarak MPO aktivitesine paralel veriler sağlayacağımızı öngördüğümüz akciğer nötrofil histopatolojik skorlamasının farklı bir dağılım sergilediği gözlenmiştir. Akciğer dokusu MPO aktivitesi yönünden sadece t₀ kontrol değerine kıyasla anlamlı bir değişikliğin saptandığı Sham Grubu'nda histopatolojik değerlendirme sonuçlarının Sepsis Grubu'na kıyasla anlamlı derecede fazla nötrofil akümülyasyonunu işaret ediyor olması, bu uyumsuzluğun en çarpıcı örneğini oluşturmaktadır.

Sham Grubu'nda akciğer dokusu MPO aktivitesi ile histopatolojik skorlamanın çelişkili veriler sergiliyor olmaları yanı sıra " akciğer nötrofil histopatolojik skoru" na ait t₀ kontrol değerinin de "1" in üzerinde bulunması histopatolojik verilerimizin yorumlanmasını güçleştirmiştir.

Akciğer nötrofil histopatolojik skorlamasına ait verilerimizin yorumlanması ve kıyaslanması amacıyla yapılan literatür taramasında, ratlarda ÇLP yöntemiyle oluşturulan intra-abdominal sepsis modelinde rhG-CSF'ün terapötik etkinliğinin araştırıldığı iki kaynağa ulaşılmıştır. Sepsis grubunda sepsis indüksiyonundan 12 saat sonra akciğerlerde anlamlı boyutta nötrofil infiltrasyonu saptadığını bildiren Toda ve arkadaşları (27), sepsis indüksiyonundan 3 saat sonra İP yolla 15µg/kg dozda rhG-CSF uyguladıkları sepsis+G-CSF grubunda nötrofil infiltrasyonunda belirgin düşüş gözlediklerini belirtmişlerdir. Deneklerinde akciğer histopatolojisi dışında yaşam süresi; peritoneal nötrofil sayısı; karaciğer, dalak, çekum ve böbrek histopatolojisini de araştıran çalışmacılar sonuçlarını rhG-CSF'ün nötrofil fonksiyonunu konakçı savunması lehine regüle edebildiği; tedaviye enfeksiyon indüksiyonundan sonra başlansa bile ciddi bakteriyemi ve sepsisten ölümü engelleyebildiği şeklinde yorumlamışlardır.

“rhG-CSF” ve “Sepsis” olarak adlandırdıkları 2 grup denekten elde ettikleri sonuçları, sepsis indüksiyonu sırasında İV yolla 10 µg/kg dozda rhG-CSF uyguladıkları “Sepsis+G-CSF” grubundan sağladıkları verilerle kıyaslayan Lundblad ve arkadaşları (26) ise, sepsisin akciğerde anlamlı bir histopatolojik değişikliğe neden olmadığını; rhG-CSF’ün de hem sağlıklı hem de septik ratlarda akciğer histopatolojisini etkilemediğini ifade etmişlerdir. Çalışmalarında akciğer histopatolojisi dışında kan bakteri sayısını; kan endotoksin, TNF-α, endotelin-1 ve laktat düzeyini; hematokrit değerini; mortalite oranını; karaciğer, dalak ve böbrek histopatolojisini araştıran Lundblad ve arkadaşları (26), sonuçlarını rhG-CSF’ün bakteri ve endotoksin klirensini olumlu yönde etkilediği, TNF ve endotelin-1 konsantrasyonlarını süprese ettiği, konakçı savunma mekanizması ve yaşam süresini iyileştirdiği şeklinde yorumlamışlar ve nötrofil kaynaklı doku hasarlanmasına yol açmadığı görüşünü savunmuşlardır. “Sepsis + G-CSF” gruplarında sepsis gruplarına kıyasla akciğerdeki nötrofil infiltrasyonunda belirgin bir düşüş saptayan Toda ve arkadaşları (27)’na karşın, Lundblad ve arkadaşları (26)’nın “Sepsis + G-CSF” gruplarında akciğer histopatolojisinin etkilenmediğini belirlemiş olmalarının, rhG-CSF’ün uygulama yolu, dozu ve zamanına ilişkin farklılıkla açıklanabileceği kanısına varılmıştır.

Söz konusu çalışmalarda aynı yöntem ile oluşturulan sepsis gruplarında sepsis indüksiyonunun 12. saatinde belirlenen histopatolojik veriler yönünden ortaya çıkan farkın, kullanılan değerlendirme yönteminin kalitatif olması ile açıklanabileceği düşünülmüştür.

Benzer şekilde, bu çalışmaya ait akciğer nötrofil histopatolojik skorlamasına ait değerlerin kendi içlerindeki tutarsızlıkları ve aynı dokularda belirlenen MPO aktivitesi ile uyumsuzluklarının da kullanılan histopatolojik değerlendirmenin semi-kantitatif bir yöntem olmasından kaynaklanabileceği; bu nedenle, akciğerlerde oluşan değişikliklere ilişkin yorumlarımızın histopatolojik değerlendirmeden çok akciğer dokusu MPO aktivitesine dayandırılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır. Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları arasında akciğer dokusu MPO aktivitesi yönünden anlamlı bir fark saptanmamış olması, rhG-CSF’ün sepsisin neden olduğu pulmoner nötrofil infiltrasyonunu anlamlı boyutta etkilemediği şeklinde yorumlanmıştır. Akciğerin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde anlamlı derecede ödem ve hemoraji saptanmamış, nekrotik doku

alanlarının gözlenmemiş olmasının da bu yorumu güçlendirip doğruladığı sonucuna varılmıştır.



SONUÇ

Ratlarda ÇLP yöntemi ile oluşturulan intra-abdominal sepsis modelinde, sepsis indüksiyonundan 1 saat sonra SC yolla uygulanan 25 µg/kg dozdaki rhG-CSF'ün oluşturduğu etkiler sepsis indüksiyonundan 12 saat sonra değerlendirilmiş; uygulanan rhG-CSF'ün

- kan nötrofil sayısı, serum TNF-α düzeyi ve akciğer dokusu MPO aktivitesinde sepsise bağlı olarak gözlenen değişiklikleri anlamlı boyutta etkilemediği;
- nötrofillerin akciğer üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi yönünden, kantitatif bir yöntem olan akciğer dokusu MPO aktivitesinin, histopatolojik değerlendirmeye kıyasla üstünlük taşıdığı;
- SC yolla uygulanan 25 µg/kg dozdaki rhG-CSF'ün sepsise bağlı akciğer değişikliklerini olumsuz yönde etkilemediğini telkin eden bu sonuçların kliniğe uyarlanmadan önce, sepsis indüksiyonunda, sırasında veya sonrasında uygulanan değişik dozların kullanıldığı ve daha geç dönemlere ait verilerin toplandığı çok sayıda deneysel çalışmaya gereksinim duyulduğu sonucuna varıldı.

ÖZET

Ratlarda çekal-ligasyon perforasyon (ÇLP) yöntemiyle oluşturulan intra-abdominal sepsis modelinde uygulanan *recombinant human* granülosit koloni-stimulan faktör (rhG-CSF)'ün serum tümör nekrozis faktör (TNF) düzeyi ve akciğerlerdeki nötrofil infiltrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınarak Fakültemiz Multidisipliner Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmamızda ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen 32 adet dişi Wistar ratı kullanıldı; 2 rat kan ve doku örnekleri alınamadan kaybedildiği için 30 rata ait veriler değerlendirildi.

Ratlarda kan nötrofil sayısı, serum TNF- α düzeyi, akciğer dokusu miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve histopatolojisinin kontrol olarak kabul edilebilecek değer ve görüntülerinin belirlenmesi amacıyla 6 denekte çalışıldı. Kan ve doku örnekleri eter anestezisi altında gerçekleştirilen sternotomi aracılığı ile elde edildi.

Cerrahi girişimin araştırılan parametreler üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan ve 6 denek içeren Sham (Taklit) Grubunda, sadece laparotomi uygulandı; laparotomi izleyen 12. saatte kan ve doku örnekleri alındı.

Subkütan (SC) yolla ve 25 μ g/kg dozda uygulanan rhG-CSF'ün sağlıklı ratlarda araştırılan parametreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan ve 6 denegi içeren G-CSF Grubu'nda kan ve doku örnekleri enjeksiyondan 11 saat sonra elde edildi.

ÇLP yöntemi ile oluşturulan intra-abdominal sepsisin etkilerinin araştırıldığı, 6 deneği içeren Sepsis Grubu'nda kan ve doku örnekleri sepsis indüksiyonundan 12 saat sonra alındı.

Sepsis + G-CSF Grubu olarak adlandırılan ve 6 denek içeren grupta, sepsis indüksiyonundan 1 saat sonra SC yolla 25 µg/kg dozda rhG-CSF uygulandı; 12 saat sonra kan ve doku örnekleri elde edildi.

Araştırmadan elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (ort ± ss) olarak sunuldu; p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

G-CSF Grubu'nda saptanan kan nötrofil sayısı artışı ve serum TNF-α düzeyi düşüşünün hem kontrol değerlerine hem de diğer gruplara kıyasla anlamlı olduğu belirlendi.

Tüm gruplarda kontrol değerine kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği belirlenen akciğer dokusu MPO aktivitesinin Sepsis ve Sepsis+G-CSF Grupları'nda Sham Grubu'na kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı.

Histopatolojik değerlendirme ile Sham ve Sepsis Grupları'nda kontrol değerine kıyasla anlamlı bir nötrofil infiltrasyonu olduğu; Sham Grubu'ndaki nötrofil akümülyasyonunun Sepsis Grubu'na kıyasla anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi.

Akciğer histopatolojik skorlamasına ait değerlerin tutarsız ve aynı dokularda belirlenen MPO aktiviteleri ile uyumsuz olmaları nedeniyle akciğerlerde oluşan değişikliklere ilişkin yorumlarımız histopatolojik değerlendirmeden çok MPO aktivitesine dayandırıldı.

Akciğer dokusu MPO aktivitesi yönünden Sepsis ve Sepsis + G-CSF Grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamış olması rhG-CSF'ün akciğerlerde sepsisin neden olduğu nötrofil infiltrasyonunu anlamlı boyutta etkilemediği şeklinde yorumlandı. Akciğerlerin histopatolojik olarak değerlendirilmesi ile anlamlı dercede ödem, hemoraji saptanmamış, nekrotik doku alanları gözlenmemiş olmasının da bu yorumu güçlendirip doğruladığı sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Wittmann DH, Schein M, Condon RE: Management of secondary peritonitis. **Ann Surg** 1996; 224: 10-18.
2. Wickel DJ, Cheadle WG, Mercer-Jones MA, et al: Poor outcome from peritonitis is caused by disease acuity and organ failure, not recurrent peritoneal infection. **Ann Surg** 1997; 225: 744-756.
3. Poll T, Deventer SJH: Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. **Inf Dis Clin North Am** 1999; 13: 413-427.
4. Vincent J-L: New therapies in sepsis. **Chest** 1997; 112: 330S-338S.
5. Hollingshead LM, Goa KL: Recombinant granulocyte colony stimulating factor (rG-CSF) – A review of its pharmacological properties and prospective role in neutropenic conditions. **Drugs** 1991; 42: 300-330
6. Weiss M, Moldawer LL, Schneider EM: Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Blood** 1999; 93: 425-439.
7. Hartung T, Döcke W-D, Gantner F, et al: Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. **Blood** 1995; 85: 2482-2489.
8. Nelson S: Role of granulocyte colony-stimulating factor in the immune response to acute bacterial infection in the nonneutropenic host: An overview. **Clin Infect Dis** 1994; 18 (suppl 2): 197-204.
9. Nelson S, Summer W, Bagby G, et al: Granulocyte colony-stimulating factor enhances pulmonary host defenses in normal and ethanol-treated rats. **J Infect Dis** 1991; 164: 901-906.

10. G6rger I, Hartung T, Leist M, et al: Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- α . **J Immunol** 1992; 149: 918-924.
11. Silver GM, Fink MP: Possible roles for anti- or pro-inflammatory therapies in the management of sepsis. **Surg Clin North Am** 1994; 74: 711-723
12. Nelson S, Bagby G: Granulocyte colony-stimulating factor and modulation of inflammatory cells in sepsis. **Clin Chest Med** 1996; 17: 319-332.
13. Patton JH, Lyden SP, Ragsdale DN, et al: Granulocyte colony-stimulating factor improves host defense to resuscitated shock and polymicrobial sepsis without provoking generalized neutrophil-mediated damage. **J Trauma** 1998; 44: 750-759.
14. Zhang P, Bagby GJ, Stoltz DA, et al: Enhancement of peritoneal leukocyte function by granulocyte colony-stimulating factor in rats with abdominal sepsis. **Crit Care Med** 1998; 26: 315-321.
15. Lundblad R, Wang MY, Kvaehheim G, et al: Granulocyte colony-stimulating factor improves myelopoiesis and host defense in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. **Shock** 1995; 4: 68-73.
16. Eichacker PQ, Waisman Y, Natanson C, et al: Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis. **J Appl Physiol** 1994; 77: 2366-2373.
17. O'Reilly M, Silver GM, Greenhalgh DG, et al: Treatment of intra-abdominal infection with granulocyte colony-stimulating factor. **J Trauma** 1992; 33: 679-682.
18. King J, Deboisblanc BP, Mason CM, et al: Effect of granulocyte colony-stimulating factor on acute lung injury in the rat. **Am J Respir Crit Care Med** 1995; 151: 302-309.
19. Terashima T, Kanazawa M, Sayama K, et al: Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates acute lung injury induced by intratracheal endotoxin in guinea pigs. **Am J Respir Crit Care Med** 1994; 149: 1295-1303.
20. Windsor ACJ, Mullen PG, Fowler HJ, et al: Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. **Br J Surg** 1993; 80: 10-17.
21. Fein AM, Grant MM, Niederman MS, et al: Neutrophil-endothelial cell interaction in critical illness. **Chest** 1991; 99: 1456-1462.

33. Baker CC, Huynh T: Sepsis in the critically ill patient. **Curr Probl Surg** 1995; 32: 1015-1092. In: Davies MG, Hagen PO: Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84: 920-935.
34. Collins FM: Cellular antimicrobial immunity. **CRC Critical Review in Microbiology** 1978; 7: 27-91. In: Davies MG, Hagen PO: Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84: 920-935.
35. Bone RC: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. **Crit Care Med** 1996; 24: 163-172.
36. Giroir BP: Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. **Crit Care Med** 1993; 21: 780-789.
37. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med** 1991; 115: 457-469.
38. Marsh CB, Wewers MD: The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection. **Clin Chest Med** 1996; 17: 183-197.
39. Colletti LM, Kunkel SL, Strieter RM: Cytokines. In: **Surgery Scientific Principles and Practice**. Second edition. Philadelphia: Lippincot-Raven, 108-129, 1997.
40. Casey LC, Balk RA, Bone RC: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. **Ann Intern Med** 1993; 119: 771-778.
41. Dinarello CA: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest** 1997; 112: 321S-329S.
42. Omann GM, Hinshaw DB: Inflammation. In: **Surgery Scientific Principles and Practice**. Second edition. Philadelphia: Lippincot-Raven, 130-159, 1997.
43. Parent C, Eichacker PQ: Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis: The role of adhesion molecules. **Inf Dis Clin North Am** 1999; 13: 427-449.
44. Sessler CN, Blommfield GL, Fowler AA: Current concepts of sepsis and acute lung injury. **Clin Chest Med** 1996; 17: 213-235.
45. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, et al: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med** 1995; 151: 293-302.
46. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC: Inside the neutrophil Phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood** 1998; 92: 3007-3017.
47. Cohen MS: Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. **Clin Infect Dis** 1994; 18 (Suppl 2): 170-179.

22. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, et al: Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. **J Clin Invest** 1986; 77: 1233-1243.
23. Idell S, Kucich U, Fein A, et al: Neutrophil elastase releasing factors in bronchoalveolar lavage from patients with adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1985; 132: 1098-1105.
24. Weiland JE, Davis WB, Holter JF, et al: Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1986; 133: 218-225.
25. Tate RM, Repine JE: Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1983; 128: 552-559.
26. Lundblad R, Nesland JM, Giercksky KE: Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. **Crit Care Med** 1996; 24: 820-826.
27. Toda H, Murata A, Matsuura N, et al: Therapeutic efficacy of granulocyte colony-stimulating factor against rat cecal ligation and puncture model. **Stem Cells** 1993; 11: 228-234.
28. Allan G, Bhattacharjee P, Brook CD, et al: Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct-The effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. **J Cardiovasc Pharmacol** 1985; 7: 1154-1160
29. Krawisz LE, Sharon P, Stenson WF: Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology** 1984; 87: 1344-1350.
30. Fink MP, O'Sullivan B, Menconi MJ, et al: Effect of granulocyte colony-stimulating factor on systemic and pulmonary responses to endotoxin in pigs. **J Trauma** 1993; 34: 571-578.
31. Davies MG, Hagen PO: Systemic inflammatory response syndrome. **Br J Surg** 1997; 84: 920-935.
32. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al: ACCP/SCCM Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest** 1992; 101: 1644-1655.

48. Heflin AC, Brigham KL: Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. **J Clin Invest** 1981; 68: 1253-1260.
49. Flick MR, Perel A, Staub NC: Leukocytes are required for increased lung microvascular permeability after microembolization in sheep. **Circ Res** 1981; 48: 344-351. In: Terashima T, Kanazawa M, Sayama K, et al: Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates acute lung injury induced by intratracheal endotoxin in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1295-1303.
50. Frampton JE, Lee CR, Faulds D: Filgrastim- A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. **Drugs** 1994; 48: 731-760.
51. Leavey PJ, Sellins KS, Thurman G, et al: In vivo treatment with granulocyte colony-stimulating factor results in divergent effects on neutrophil functions measured in vitro. **Blood** 1998; 92: 4366-4374.
52. Allen RC, Stevens PR, Price TH, et al: In vivo effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil oxidative functions in normal human volunteers. **J Infect Dis** 1997; 175: 1184-1192.
53. Adachi S, Kubota M, Wakazano Y, et al: Mechanism of enhancement of neutrophil survival by granulocyte colony-stimulating factor and adenine. **Exp Hematol** 1993; 21: 1213-1218.
54. Lang CH, Bagby GJ, Dobrescu C, et al: Effect of granulocyte colony-stimulating factor on sepsis induced changes in neutrophil accumulation and organ glucose uptake. **J Infect Dis** 1992; 166: 336-343.
55. Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, et al: Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. **J Infect Dis** 1991; 163: 579-583.
56. Wang JM, Chen ZG, Collela S, et al: Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Blood** 1988; 72: 1456-1460.
57. Cebon J, Layton JE, Maher D, et al: Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. **Br J Haematol** 1994; 86: 265-274.
58. Dale DC: Potential role of colony stimulating factors in the prevention and treatment of infectious diseases. **Clin Infect Dis** 1994; 18 (suppl 2): 180-188.
59. Rose RM: The role of granulocyte colony-stimulating factor in infectious diseases: Current status, future challenges. **Semin in Onco** 1992; 19: 415-421.

60. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, et al: Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. **Blood** 1990; 76: 1962-1964.
61. Guyton AC, Hall JE: Resistance of the body to infection: I- Leukocytes, granulocytes, the monocyte-macrophage system, and inflammation. **Textbook of Medical Physiology**. W.B. Saunders Company, 1996: 435-442.
62. Jacobsen FW, Rothe M, Rusten L, et al: Role of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor: Inhibition of early hematopoiesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91: 10695-10699. In: Lundblad R, Wang MY, Kvaehheim G, et al: Granulocyte colony-stimulating factor improves myelopoiesis and host defense in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. **Shock** 1995; 4: 68-73.
63. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH, et al: Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res** 1980; 29: 189-201.
64. Wakefield CH, Barclay GR, Fearon KCH, et al: Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonists and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. **Br J Surg** 1998; 85: 818-825.
65. Pitcarin M, Schuler J, Erve PR, et al: Glucocorticoid and antibiotic effect on experimental gram-negative bacteremic shock. **Arch Surg** 1975; 110: 1012 In: Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH, et al: Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res** 1980; 29: 189-201.
66. Thal AP, Robinson RG, Pruett R, et al: The critical relationship in intravascular blood volume and vascular capacitance in sepsis. **Surg Gynecol Obstet** 1976; 143: 17. In: Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH, et al: Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res** 1980; 29: 189-201.
67. Browne MK, Leslie GB: Animal models of peritonitis. **Surg Gynecol Obstet** 1976; 143: 738. In: Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH, et al: Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res** 1980; 29: 189-201.
68. Salkowski CA, Detore G, Franks A, et al: Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: Monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. **Infect Immun** 1998; 66: 3569-3578.
69. Wittman DH. World progress in surgery. Intra-abdominal infection-introduction. **World J Surg** 1990; 14: 145-147.

70. Bohnen J, Boulanger R, Meakins JL, et al: Prognosis in generalized peritonitis. Relation to cause and risk factors. **Arch Surg** 1983; 118: 285-290.
71. Christou NV, Barie PS, Dellinger EP, et al: Surgical Infection Society intra-abdominal infection study. Prospective evaluation of management techniques and outcome. **Arch Surg** 1993; 128: 193-199.
72. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, et al: Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery** 1983; August : 331-335.
73. Ulich TR, Castillo JD, Souza L,: Kinetics and mechanisms of recombinant granulocyte colony-stimulating factor-induced neutrophilia. **Am J Pathol** 1988; 133: 630-638.
74. Mercer-Jones MA, Heizelmann M, Peyton JC, et al: Inhibition of neutrophil migration at the site of infection increases remote organ neutrophil sequestration and injury. **Shock** 1997; 8: 193-199.
75. Offner F, Philippe J, Vagelaers D, et al: Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. **J Lab Clin Med** 1990; 116: 100-105. In: Lundblad R, Nesland JM, Giercksky KE: Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. **Crit Care Med** 1996; 24: 820-826.
76. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, et al: Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon- α , and interferon- γ in the serum of patients with septic shock. **J Infect Dis** 1990; 161: 982-987.
77. Damas P, Ledoux D, Nys M, et al: Cytokine serum level during severe sepsis in human: IL-6 as a marker of severity. **Ann Surg** 1992; 215: 356-362.
78. Hirota M, Ogawa M: Immune response induced by surgical trauma. **Nippon Geka Gakkai Zasshi** 1996; 97: 721-725 (Abstract).
79. H Shijo, Iwabuchi K, Hosoda S, et al: Evaluation of neutrophil functions after experimental abdominal surgical trauma. **Inflamm Res** 1998; 47: 67-74 (Abstract).