



157958

T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKULTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI
ANA BİLİM DALI

İN VİTRO KOŞULLARDA
GRANÜLOSİT-KOLONİ STİMÜLAN FAKTÖR'ÜN
KARACİĞER SİROZLU HASTALARDA NÖTROFİL
FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Aytaç BİLGİÇ
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet BAKIR

Sivas
2003



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun 12.03.2002 tarih ve 2002/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28.03.2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen "Tez Yazım Kılavuzu"na göre hazırlanmıştır.

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Bu çalışma, jürimiz tarafından Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof. Dr. Mehmet BAKIR

ÜYE : Prof. Dr. İlyas DÖKMETAŞ

ÜYE : Prof. Dr. H. Bozkurt TOKSOY

ÜYE : Doç. Dr. Mehmet SENCAN

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Nazif ELALDI

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2003

DEKAN



İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
• ÖZET	iv
• İNGİLİZCE ÖZET	v
• KISALTMALAR	vi
• TABLOLAR VE RESİMLER	vii
• GİRİŞ VE AMAÇ	1
• GENEL BİLGİLER	3
2.1. KARACİĞER SİROZU	3
2.2. SİROZ VE İNFEKSİYON	8
2.3. NÖTROFİLLER (POLİMORFONUKLEER LÖKOSİTLER)	18
2.4. GRANULOSİT KOLONİ STİMULAN FAKTÖR (G-CSF)	24
• GEREÇ VE YÖNTEM	31
• BULGULAR	37
• TARTIŞMA	43
• SONUÇLAR	54
• KAYNAKLAR	55

ÖZET

Bu çalışmada, viral hepatit B ve viral hepatit C'ye bağlı karaciğer sirozlu hastalarda nötrofil fonksiyonları ve Granülosit-Koloni Stimülan faktör (G-CSF)'ün bu hastalarda nötrofil fonksiyonları üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmaya Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği'nde viral hepatit B ve C'ye bağlı karaciğer sirozu tanısı ile takip ve tedavi edilen 14 hasta ile yaş ve cinsiyet bakımından farklılık göstermeyen 14 sağlıklı donör alındı. Hastaların hepsi dekompanse Child C grubuna giriyorlardı. Nötrofiller sağlıklı kontroller ve hastalardan Verbrugh'un tanımladığı modifiye Böyum yöntemiyle elde edildi. Elde edilen nötrofiller in vitro ortamda 1500, 3000, 4500 ve 6000 ünite G-CSF ile muamele edildi. Daha sonra standart *S.aureus* NCTC 8325 suşu ve AB serum ile 37°C'de 15 dk. inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüplerden hazırlanan preparatlar metilen mavisi ile boyanarak fagositoz oranı tespit edildi. Tüpler aynı şartlarda 45.dakikaya kadar inkübe edilip, standart öze yardımı ile sulandırıldıktan sonra kanlı agar plaklarına koloni sayımı için ekim yapıldı. Daha sonra nötrofiller Triton-X-100 ile parçalanıp, standart öze ile tekrar ekim yapıldı. Kültürlerde üreyen koloniler 18-24 saat sonra sayılıp fagositik indeks ve intrasellüler öldürme oranları hesaplandı. Karaciğer sirozlu hastalarda nötrofillerin fagositoz oranı, fagositik indeksi ve hücre içi öldürme oranları sağlıklı kontrollere göre düşük bulundu ($p<0.001$). G-CSF, hem sağlıklı kontrol grubunda hem de karaciğer sirozlu hasta grubunda polimorfonükleer lökosit (PNL)'lerin fagositoz oranını, fagositik indeksi ve hücre içi öldürme oranlarını artırdı ($p<0.001$).

Sonuç olarak karaciğer sirozlu hastalarda nötrofillerin fagositoz ve hücre içi öldürme fonksiyonlarının bozuk olduğu ve G-CSF'in bu hastalarda nötrofil fonksiyonlarını iyileştirdiği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Karaciğer sirozu, nötrofil fonksiyonları, G-CSF

SUMMARY

The aim of the present study was to determine the neutrophil functions of the patients with cirrhosis caused by hepatitis B and hepatitis C viruses, and the effect of recombinant human Granulocyte-Colony Stimulating Factor (rhG-CSF) on the neutrophil functions.

The study consists of 14 patients suffering from the cirrhosis, and 14 healthy volunteers, served as control group. All the patients were considered as Child C group. The neutrophils were prepared from heparinised venous blood obtained from the patients and controls by dextran sedimentation followed by Ficoll gradient centrifugation (modified Böyum technique) method, which described by Verbrugh. These neutrophils separated from either patients and controls were pretreated with various concentrations (1500, 3000, 4500, and 6000 units/ml) of rhG-CSF in Hanks' balanced salt solution (HBSS), and incubated with *Staphylococcus aureus* (NCTC 8325) standard strain for 15 minutes. At the end of the incubation period, a small amount of the mixture was separated and stained by methylene blue dye for calculating phagocytosis. The test continued for 45 minutes to determine intracellular killing of the microorganisms. At the end of this time, 0.1 ml of mixture was separated and cultivated on to blood agar plates. Remaining neutrophils in the test tube were destroyed by triton-X-100, and 0.1 ml of the mixture was separated and cultivated onto blood agar plates again. All plates were incubated at 37⁰C in an incubator and examined after 18-24 hours of incubation. The numbers of colony forming units (cfu) on plates were counted and recorded for each plate. Then also phagocytosis, phagocytic index, and intracellular killing functions of the neutrophils were assessed for each patient and control.

It was observed that the phagocytic functions, phagocytic index, and intracellular killing functions of the neutrophils taken from the patients were lower than the controls ($p < 0.001$). These functions were increased statistically by rhG-CSF in both groups ($p < 0.001$). We conclude that the neutrophils of the cirrhotic patients have more defective functions than the control group, and rhG-CSF can improve these functions.

Key words: Hepatic cirrhosis, neutrophil functions, G-CSF

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome
ASCO	: The American Society of Clinical Oncology
BAL	: Bronkoalveoler Lavaj
BPI	: Bakterisidal Permeabilite Artırıcı
Cfu	: Colony forming units
EPO	: Eritropoietin
G-CSF	: Granulosit-Koloni Stimulan Faktör
GM-CSF	: Granulosit Monosit-Koloni Stimulan Faktör
H₂O₂	: Hidrojen peroksid
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HOCL⁻	: Hipoklorid
ICAM-1	: İntrasellüler Adezyon Molekülü-1
IgA	: İmmünoglobulin A
IgG	: İmmünoglobulin G
IgM	: İmmünoglobulin M
IL	: İnterlökin
LTB₄	: Lökotrien B ₄
M-CSF	: Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör
PNL	: Polimorfonükleer lökosit
rhG-CSF	: Recombinant human Granulocyte-Colony Stimulating Factor
SBP	: Spontan Bakteriyel Peritonit
SCF	: Stem cell Colony-Stimulating Factor
TNF	: Tümör Nekroz Faktör

TABLolar VE RESİMLER

- Tablo-2.1 :Karaciğer Sirozunun Etiyolojisi
- Tablo-2.2 :Modifiye Child-Turcotte Pugh skorlama sistemi
- Tablo-2.3 :Karaciğer sirozunun başlıca komplikasyonları
- Tablo-2.4 :İnsan Nötrofillerinde Bulunan Granüller
- Tablo-2.5 :Bazı hematopoietik büyüme faktörlerinin özellikleri
- Tablo-4.1 :Sağlıklı kontrol grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus*'la inkübe edilmesiyle gözlenen PNL fonksiyonları
- Tablo-4.2 :Karaciğer sirozlu hasta grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus*'la inkübe edilmesiyle gözlenen PNL fonksiyonları
- Tablo-4.3 :Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen fagositoz oranlarının karşılaştırılması
- Tablo-4.4 :Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen fagositoz indekslerinin karşılaştırılması
- Tablo-4.5 :Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen intrasellüler öldürme fonksiyonlarının karşılaştırılması
- Resim-4.1 : *S.aureus*'ların PNL'ler tarafından fagosit edilmesi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer sirozu, normal parankim dokusunun kaybı, bağ dokusunun artışı, rejenerasyon nodüllerinin oluşması ve vasküler yapının bozulması ile karakterize, kronik, diffüz ve ilerleyici bir karaciğer iltihabıdır (1). Karaciğer sirozunda infeksiyonlar sık görülür ve varis kanamalarından sonra ikinci en sık ölüm nedenidir. Bu hastalıkta konağın bağışıklık sisteminin hem hücresel hem de humoral basamağında bozukluk vardır (2).

Karaciğer sirozunda kompleman sentezi ve antikor yapımı, makrofaj aktivasyonu, mobilizasyonu ve bakteri öldürmesi azalmıştır (3,4). Bu hastalarda nötrofillerin kemotaksisi, fagositozu ve bakterisidal aktivitesinin bozulduğu bildirilmiştir (5,6).

Nötrofiller, infeksiyon etkenlerine karşı konağın ilk savunma basamağını oluştururlar. Mikroorganizmaların giriş alanına birikerek fagositik aktivite gösterirler ve infeksiyonun ilerlemesini durdururlar (7). Yetersiz fagositoz, mikroorganizmaların çoğalmalarının kontrol edilememesine ve şiddetli infeksiyona neden olur. Nötrofil sayısında azalma veya nötrofil fonksiyon bozukluklarının infeksiyona zemin hazırladığı bilinmektedir (7,8). Karaciğer sirozlu hastalarda infeksiyonların sık görülmesinin en önemli nedenlerinden birinin nötrofil fonksiyonlarındaki bozukluk olduğu gösterilmiştir (3,4,9).

Granülosit Koloni Stimülan Faktör (G-CSF); nötrofil yapımını ve fonksiyonlarını düzenleyen glikoprotein yapısında bir sitokindir. G-CSF kullanılması ile nötrofil üretimi ve vücut savunması artarak sonuçta

hastalıkların morbiditesi ve mortalitesi azalır(10). Bu etkiyi nötrofillerin sayısı ile birlikte kemotaksisini, bakteriyel fagositozunu ve onları öldürme kapasitesini artırarak yaptığı gösterilmiştir (11).

Yine nütropenik ve nütropenik olmayan hayvan ve insan modellerindeki sistemik bakteri ve mantar infeksiyonlarında G-CSF'in, PNL'lerin fagositoz ve hücre içi öldürme fonksiyonlarını artırdığı da tespit edilmiştir (12).

Bu çalışmada viral hepatit B ve viral hepatit C'ye bağlı karaciğer sirozu gelişen hastalarda nötrofil fonksiyonlarının bozuk olup olmadığı ve G-CSF'in nötrofil fonksiyonları üzerine etkisinin araştırılması planlandı.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER SİROZU

Karaciğer sirozu, normal parankim dokusunun kaybı, bağ dokusunun artışı, rejenerasyon nodüllerinin oluşması ve vasküler yapının bozulması ile karakterize, kronik, diffüz ve ilerleyici bir karaciğer iltihabıdır. Sirozun temel unsurları, fibröz doku artışı ve rejenerasyon nodülleridir. Sadece bağ doku artışı (konjenital hepatik fibrozis) veya sadece rejenerasyon nodüllerinin bulunması (nodüler rejeneratif hiperplazi) tanımlama için yeterli değildir (1).

2.1.1. Etyoloji

Sirozun nedenleri sosyo-ekonomik ve kültür farklılıklarına göre değişiklikler gösterir. Batı ülkelerinde karaciğer sirozuna yol açan en önemli neden alkol kullanımıdır. Uzakdoğu, Ortadoğu ve ülkemizde ise başlıca neden viral hepatitlerdir. Bin dokuz yüz doksan dört ile bin dokuz yüz doksan yedi yıllarını kapsayan 4 yıllık dönemde 393 vakalık karaciğer sirozu serisinde, viral hepatitlerin %60, alkolün %11, alkol+ viral hepatitin %4, diğer nedenlerin (otoimmün hepatit, bilier sirozlar, konjesyon, metabolik nedenler v.b.) %9 oranında etyolojiden sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Vakaların yaklaşık %16'sında ise etyolojik neden belirlenememiştir. Viral hepatitlerden hepatit B virüsü (HBV)'nün katkısı %42.6 ,hepatit C virüsü (HCV)'nün katkısı %34.5 ve hepatit D virüsü (HDV)'nün katkısı ise %15.7 bulunmuştur (13). Sonuç olarak ülkemizde siroz gelişiminde viral hepatitler, özellikle HBV ve HCV ile alkolün önemli rol oynadığı dikkati çekmektedir. Nadir nedenler arasında belirtilen başlıca metabolik siroz nedenleri ise hemokromatoz, Wilson hastalığı, alfa-1 antitripsin eksikliği, tip IV glikojenozis, galaktozemi, kistik fibrozis ve konjenital tirozinozistir. Toksik maddeler, ilaçlar (Amiodarone, metotreksat

vb), intestinal by-pass ameliyatlari ve Hindistan çocukluk dönemi sirozu (Indian childhood cirrhosis) da seyrek nedenler arasında belirtilmektedir. Ülkemizde otoimmün hepatit zemininde gelişen siroza ve primer bilier siroza nadir rastlanır (1). Karaciğer sirozunun etyolojisinde rol oynayan nedenler Tablo-2.1’de gösterilmiştir.

Tablo-2.1 .Karaciğer Sirozunun Etiyolojisi (14)

Hepatit virusları
HBV, HCV, HDV
Alkol
Metabolik nedenler
Wilson hastalığı
Hemokromatoz
Alfa-1 antitripsin eksikliği
Tip IV glikojenoz
Galaktozemi
Tirozinemi
A hipervitaminozu
Non-alkolik steatohepatoz
İntestinal by-pass
İmmünite bozukluğu
Otoimmün hepatit
Primer bilier siroz
Uzamış kolestaz (intra ve ekstrahepatik)
Konjesyon
Budd-Chiari sendromu
Konstriktif perikardit
Veno okluziv hastalık (Tıkayıcı ven hastalığı)
İlaç ve toksinler
Metotreksat
Amiodarone
Indian childhood cirrhosis (Hindistan çocukluk dönemi sirozu)
Kriptojenik (sebebi bilinmeyen)

2.1.2. Patoloji ve Patogenez

Etyolojik neden ne olursa olsun, başlattığı olaylar zinciri aynı morfolojik yapı, yani karaciğer sirozu ile sonuçlanır. Bu karaciğerin küçülmesi, sertleşmesi ve nodüler bir yapıya dönüşmesi demektir. Morfolojik olarak 3 tip siroz bilinmektedir. Mikronodüler siroz genellikle 1 cm'den küçük ve homojen rejenerasyon nodülleri ile karakterizedir. Makronodüler siroz 1 cm'den büyük ve homojen rejenerasyon nodülleri içerir. Mikst nodüler siroz mikro ve makronodülleri içerir. Alkolik siroz mikronodüler, posthepatik siroz makronodülerdir. Ancak alkol bırakıldığında mikst nodüler bir görünümle karşılaşmak mümkün olabilir(1,14).

Karaciğer sirozunda hepatosit hasarı (dejenerasyon ve nekroz), hepatosit rejenerasyonu, iltihabi reaksiyon, bağ dokusu septumlarının oluşması, safra kanalı proliferasyonu ve karaciğer içi damar yatağının distorsiyonu olmak üzere altı ayrı histopatolojik değişiklik görülür. Etyolojik etkene bağlı olarak oluşan nekrozu fibrozis izler. Genelde üç tip nekroz fibroziste rol oynar. Peace-meal nekrozu portal-portal septum oluşumuna yol açarken, konfluent nekroz santral-portal köprüleşme ve fibrozise fokal nekrozlar ise fokal fibrozise neden olur (1,14,15).

2.1.3. Klinik Belirti ve Bulgular

Karaciğer sirozu her yaşta görülen ciddi bir hastalıktır. Erkeklerde biraz daha siktir. Hastalığın kompanse ve dekompanse olmak üzere iki dönemi vardır. Sinsi seyirli bir hastalık oluşu nedeniyle, vakaların ancak %25-30'u kompanse dönemde tanınır. Kompanse dönemde siroz ya asemptomatik ya da semptomatik olabilir. Semptomlu vakaların bir grubu genel belirtilerle hekime başvurur. Başlıca genel belirtiler halsizlik, çabuk yorulma, dispepsi ve sağ ile sol hipokondrium ağrılarıdır. Bu dönemde başlıca fizik muayene bulguları ikter, hepatomegali ve splenomegali olabilir. Kompanse dönem aylar ve yıllarca devam edebilir. Karaciğer sirozunun hepatosellüler yetersizlik ve

portal hipertansiyon olmak üzere iki ana grup bulgusu söz konusudur. Başlıca hepatosellüler yetersizlik bulguları örümcek anjiom, telenjiektazi, Dupuytren kontraktürü, çomak parmak, tırnak değişiklikleri (beyaz tırnak v.s), palmar eritem, j inekomasti, karaciğer dili, ikter, subikter, purpuralar, gonadal atrofi (kıllanmada azalma, impotans, amenore v.b) dir. Başlıca portal hipertansiyon bulguları ise splenomegali, portal tipte kollateral dolaşım ve asittir. Bazen hepatomegali de saptanabilir (1,14,16).

2.1.4. Tanı

Karaciğer sirozunun tanısı tipik vakalarda anamnez, fizik muayene ve biyokimyasal testlerle oldukça kolaydır. Portal hipertansiyon ve hepatosellüler yetersizlik belirti ve bulgularının birkaçının bir arada bulunması ile tanı desteklenir. Tanıdan şüphe edildiğinde, kesinleştirmek amacı ile, karaciğer ponksiyon biyopsisi veya laparoskopiden yararlanılır (1).

2.1.5.Prognoz

Karaciğer sirozu ciddi ve öldürücü bir hastalıktır. Prognozun saptanmasında etyoloji, alkol alınması, teşhis ve tedavinin zamanı ve şekli rol oynayabilir. Asit, ikter ve hepatik ensefalopatiden herhangi birinin bulunması dekompanse bulgusudur. Prognoz değerlendirilmesinde Child-Turcotte-Pugh skorlama sistemi kullanılır (1,15)(Tablo-2).

Tablo-2.2.Modifiye Child-Turcotte Pugh skorlama sistemi (15).

Skor	1	2	3
Protrombin zamanı (INR)	<4 sn(<1.7)	4-6sn (1.7-2.3)	>6sn(>2.3)
Bilirubin (mg/dl)	<2	2-3	>3
Albumin (g/dl)	>3.5	3.5-2.8	<2.8
Asit	Yok	Orta	Ciddi
Ensefalopati	Yok	Orta	Ciddi

Skor 6 ve altındaysa Child A, 7-9 arasında ise Child B, 10 ve üzerinde ise Child C olarak değerlendirilir. Child evresi ilerledikçe prognoz kötüleşmektedir. İtalya'da yapılan çok geniş bir çalışmada her yıl hastaların %10'unun kompanse evreden dekompanse evreye geçtiği gözlenmiştir. Dekompanse hastalarda 6 yıllık yaşam oranı %21'dir. Mortaliteye etki eden faktörler yaş, erkek cinsiyet, ensefalopati, kanama, varis varlığı, protrombin zamanının uzun olması, HBsAg pozitifliği ve hepatosellüler karsinom olarak bulunmuştur (16).

2.1.6.Komplikasyonlar

Karaciğer sirozunun başlıca komplikasyonları özofago-gastrik varis kanaması, hepatik ensefalopati, hepatosellüler karsinoma, spontan bakteriyel peritonit ve hepatorenal sendromdur. Nadir olarak hepatopulmoner sendroma ve portopulmoner hipertansiyona rastlanabilir (1,14)(Tablo-2.3).

Tablo-2.3. Karaciğer sirozunun başlıca komplikasyonları (14)

-
- 1.Portal hipertansiyon: varis kanaması
 - 2.Asit: spontan bakteriyel peritonit, hepatik hidrotoraks
 - 3.Hepatorenal sendrom
 - 4.Hepatik ensefalopati
 - 5.Koagulopati
 - 6.Hepatopulmoner sendrom
 - 7.Hepatosellüler karsinom
 - 8.Hepatik osteodistrofi
 - 9.Feminizasyon
 - 10.İlaç metabolizmasında değişim
-

2.2 SİROZ VE İNFEKSİYON

İnfeksiyon sirozun iyi tanımlanmış sık ve ciddi bir komplikasyonudur (17). Sirozlu veya akut fulminan karaciğer yetmezliği olan hastalar bakteriyel ve fungal infeksiyonların gelişimi için yüksek risk taşırlar. İnfeksiyon riski karaciğer hastalığının ciddiyeti ve hastaneye yatma ile artar. İnfeksiyonlar varis kanamalarından sonra öldürücü komplikasyonlar içinde ikinci sırada yer alır (2). İnfeksiyon alkolik sirozlarda en sık, primer biliyer sirozda ise en az sıklıktadır. Etyolojik nedene bağlı olmaksızın sirozlu hastalarda fulminan hepatik nekroz, ciddi akut karaciğer hastalığı veya subakut hepatik nekroz gelişmesi infeksiyon sıklığını artırır (18).

Sirozlu hastalarda en sık görülen infeksiyon spontan bakteriyel peritonittir. Bununla birlikte pnömoni, bakteriyemi, üriner infeksiyon ve bakteriyel endokardit de sık rastlanan infeksiyonlardır (19). Bu hasta grubunda ateş, lökositoz gibi infeksiyon göstergelerinin olması her zaman

beklenmediğinden, klinik durumun bozulması, ensefalopati yada böbrek yetmezliğinin ilerlemesi durumunda infeksiyondan şüphelenilmelidir. İnfeksiyondan şüphelenilen tüm hastalarda kan kültürleri ve şüphelenilen alana yönelik kültürler alınmalı, asit varsa parasentez yapılmalıdır. Parasentez sıvısında lökosit sayımı ile birlikte gram boyama ve mikroskopisi yapılmalı, aerob ve anaerob kültürler için örnek alınmalıdır (18).

Sirozlu hastalarda infeksiyonların normal insanlardan daha sık olmasının bir çok nedene bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sık infeksiyon nedenleri intestinal floranın değişmesi, monosit-makrofaj sistemi fonksiyonlarının bozulması, nötrofil fonksiyonlarının bozulması, humoral ve hücrel immüitenin bozulması, alkol alımı, malnütrisyon, gastrointestinal kanama, portal sistemde staz, invaziv tanısal ve terapötik işlemlerle doğal bariyerlerin bozulması ve sık antibiyotik kullanımı gibi faktörleri içermektedir (19). Bunların arasında gastrointestinal kanamanın bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Gastrointestinal kanaması olan hastalarda %33 oranında infeksiyon izlenirken, diğer nedenlerle hastaneye yatanlarda %13 oranında infeksiyon gelişmiştir. Gastrointestinal kanama ile infeksiyon arasındaki ilişkiye benzer şekilde, invaziv işlemlerle spontan bakteriyel peritonit arasında da ilişki gösterilmiştir. Bunların yanında asit sıvısındaki düşük protein düzeyleri de spontan bakteriyel peritonit için bağımsız bir risk faktörüdür (17).

2.2.1. Konak Savunması

Hiç kuşkusuz karaciğer hastalığı olan hastalarda bakteriyel infeksiyonlara duyarlılığı artıran en önemli faktörlerden biri konak savunmasındaki bozukluklardır (18). Sirozlu hastalarda birden fazla immünolojik anormallik tanımlanmasına rağmen çalışmaların büyük çoğunluğu alkolik sirozda immünolojik fonksiyonlara odaklanmıştır. Sirozlu hastalarda hem humoral hem de hücrel immünitede bozukluk vardır. Karaciğer, komplemanın C₃ komponenti sentezinin primer yapıldığı alan

olduğundan kompleman yetersizliği sık ve fulminan karaciğer yetmezliğinde daha ciddidir (20-22). Ciddi karaciğer yetmezliği ve kompleman yetersizliği ortaya çıktığında opsonizasyon bozulur. Hastalarda *Escherichia coli* ve *Haemophilus influenzae* gibi gram negatif bakterilere karşı Immunoglobulin M (IgM) aracılı bakterisidal aktivitede azalma gözlenir (9,23). Dekompense karaciğer sirozlu hastalarda serum kompleman düzeyinde düşme ile birlikte antikor yapımında bozulma gözlenir (3).

Retiküloendotelial hücreler portal kandaki patojenler için potansiyel filtrasyon mekanizması işlevi görürler. Sirozda filtrasyon bozulur. Çünkü makrofaj aktivasyonu ve mobilizasyonu bozuktur ve bakteri öldürmesi azalmıştır (4). De Fernandez ve arkadaşlarının (5) alkolik karaciğer sirozu ve primer bilier sirozu olan hastalarda yaptıkları çalışmada serum bağımlı fagositoz disfonksiyonu gösterilmiştir. Bundan dolaşımda bulunan ve muhtemelen Fc reseptörlerini bloke eden inhibitör immün komplekslerin sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir. Bu hastaların serumunda bulunan ve mobilizasyonu inhibe eden bu madde “serum kemotaktik inhibitör faktör” olarak adlandırılmıştır. C5a ve diğer kemotaktik faktörlerin varlığında bu inhibitör faktörün inaktive olduğu ve kompleman yapımı normal olan hastalarda deneysel hasar alanlarına normal ya da artmış sayıda PNL göçü olduğu gösterilmiştir (24).

Bu hastalarda nötrofil mobilizasyonunu bozan nedenin açıklanması için yapılan bir çalışmada karaciğer sirozlu hastalarda serum Immunoglobulin A (IgA) ve Immunoglobulin G (IgG) düzeylerinde artma gözlenmiştir. Anti IgA ile immünabsorbsiyon yapıldıktan sonra mobilizasyon bozukluğu düzelmiş fakat anti IgG ve anti IgM ile aynı etki gözlenmemiştir. Bu sonuç araştırmacılar tarafından serumdaki bu inhibitör maddenin IgA ya da IgA'ya bağlı veya benzer bir molekül olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (25). Ancak daha sonra yapılan bir çalışmada nötrofil fonksiyonları ile serum immünglobulin ya da immün kompleks düzeyleri arasında bir korelasyon gösterilememiştir (26).

Rajkovic ve arkadaşları (26), alkolik sirozlu hastalarda yaptıkları çalışmada total süperoksit üretimini, lizozim ve miyeloperoksidaz enzim içeriğini ve salınımını, heksoz monofosfat şant aktivitesini ve redükte glutasyon içeriğini normal kontrollere göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Buna karşılık hidrojen peroksit üretimini normal olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada *E.coli* ve *Staphylococcus aureus*'un intrasellüler öldürülmesi ile total süperoksit üretimi, lizozim ve miyeloperoksidaz içeriği ve salınımı, heksoz monofosfat şant aktivitesi ve redükte glutasyon içeriği arasında pozitif korelasyon bulunmuş, ancak intrasellüler öldürme ile hidrojen peroksit üretimi arasında ilişki bulunamamıştır.

Fagositoz, retiküloendotelial sistemin spesifik bir fonksiyonudur. Bu fonksiyon opsonik bir glukoprotein olan fibronektin ile diğer opsoninlere bağlıdır. Plazma fibronektin konsantrasyonu fulminan karaciğer yetmezliğinde %76, alkolik karaciğer hastalığında ise %50 azalır. Alkolik karaciğer hastalığı olan vakalarda plazma fibronektin yetmezliği kötü prognozla ilişkilidir (18).

İmmünolojik defektlerden başka mekanik defans sistemlerinin bozulması da enfeksiyona duyarlılığı artırır. Alkol alımı ile bilinç düzeyinin baskılanması glottik kapanmaya ve öksürük refleksine engel olur, bu da aspirasyona ve pnömoni gelişimine zemin hazırlar. Asit oluşumu solunum hareketlerini kısıtlar ve alt solunum yolu enfeksiyonu oluşmasına yardımcı olur (27).

2.2.2. Spontan Bakteriyel Peritonit

Kronik karaciğer hastalarında en önemli problemlerden biri spontan bakteriyel peritonittir (SBP). Değişik klinik görünümde olabilmesi, tanının zor olması ve potansiyel tedavi yaklaşımlarına rağmen yüksek mortalite ile seyretmesi nedeniyle önemlidir (18). SBP eksternal ya da intraabdominal enfeksiyon odağı olmadan ani başlayan bakteriyel peritonit olarak tanımlanır.

SBP en çok sirozla birlikte görülür. Bununla birlikte konjestif kalp yetmezliği, malignensi ve nefrotik sendrom gibi diğer nedenlere bağlı asiti olan hastalarda da gelişebilir (27). Hatta asiti olmayan karaciğer hastalarında bile peritonit atakları rapor edilmiştir (18). Hastaneye yatırılmış asitli hastalarda SBP oranı %7-23'tür. SBP'nin patogeneğinde geçici bakteriyemiler sırasında asit sıvısının kolonizasyonu vardır. Bozulmuş antibakteriyel veya opsonik aktivite diğer immünolojik defektlerle birleşince mikroorganizma çoğalır. Deneysel olarak kanıtlanmadığı halde barsak duvarından bakteri translokasyonu da diğer potansiyel bir mekanizmadır. Gastrointestinal kanaması ve fulminan hepatik yetmezliği olan hastalar; yüksek serum bilirubini ve invaziv işlemlere daha fazla maruz kalmaları nedeniyle SBP'e daha yatkındırlar (27).

SBP'in klasik klinik görünümünde ateş, üşüme, karın ağrısı ve asitte artma vardır. Peritoniyal bulgular veya ensefalopati olabilir. SBP hastaların üçte birinde abdominal semptomlar olmadan da ortaya çıkabilir. Semptomlar sadece ensefalopati, gastrointestinal kanama veya renal yetmezlikte artma olabilir. Bundan dolayı asiti olan tüm hastalara şüphe ile yaklaşılmalıdır (27). Hastaların büyük kısmında karaciğer fonksiyonlarını gösteren biyokimyasal testlerde bozulma ve periferik kan lökosit sayısında artış vardır. Tanı asit sıvısından mikroorganizmanın izolasyonuna dayandığından SBP'ten şüphelenilen tüm hastalara tanısal amaçlı parasentez yapılmalıdır (18). Asit sıvısında bulanıklık infeksiyon tanısı için gerekli değildir. Asit sıvısının aerob ve anaerob kültürleri yapılmalıdır. Örneği laboratuvara steril bir taşıyıcıda taşımak yerine yatak başında kan kültürü vasatına ekim yapılır ise kültür pozitifliği iki kat artar, fakat kontaminasyon olasılığı da artar. Kültür sonucu 24-72 saate kadar alınamayacağından diğer infeksiyon göstergeleri de araştırılmalıdır (18). Örnek santrifüj edilerek gram boyama yapılmalıdır. Bu şekilde ml'de sadece 2 adet mikroorganizma olsa bile gram boyası pozitif bulunabilir (18). Gram boyama %30 vakada pozitifdir. Bununla birlikte hastaların üçte birinde gram boyama ile kültür arasında korelasyon yoktur.

Günümüzde en çok kullanılan ve kabul edilen indikatör asit sıvısında PNL sayımıdır. SBP'li hastaların %85'inden fazlasında asit sıvısındaki PNL sayısı ml'de 1000'in üzerindedir. Diüretik tedavisi alanlarda toplam lökosit sayısı ml'de 2000'in üzerine çıktığı halde PNL sayısı bundan etkilenmez. Bunun sebebi muhtemelen asit sıvısının azalması ve PNL'ler ile karşılaştırıldığında mononükleer hücrelerin yaşam süresinin daha uzun olmasıdır. Bu nedenle asit sıvısında PNL sayısı belirlenmelidir. Normal steril asit sıvısında ml'de 250'nin altındadır ve daha fazlası infeksiyonu akla getirmelidir. Diğer bulguları olan hastalarda düşük pH ve glukoz düzeyleri ile asit sıvısında artmış laktat konsantrasyonları tanıya yardımcıdır (18).

Klinik çalışmalar sirozlu hastalarda peritoniyal infeksiyonun subklinik infeksiyondan tam oturmuş sendroma kadar geniş bir aralık içinde olabileceğini göstermiştir. Klinik olarak peritonit görüntüsü olmadan asit sıvısında bakteri bulunması "bacteriascites" olarak adlandırılır ve asiti olan sirozlu hastaların %4'ünde görülür. Bacteriascites peritonite ilerleyebilir bu yüzden parasentez tekrarlanmalı ve sonuçlara göre tedavi planlanmalıdır. Klinik olarak peritonit bulguları gösteren, asit sıvısında PNL sayısının arttığı ancak asit sıvısının steril olduğu klinik durum "sterile neutrosytic ascites" olarak adlandırılmıştır. Bu vakaların %50'si peritonite ilerler ve benzer mortalite ile seyrederek. Antibiyotik tedavisi ile nötrozitoz ve prognoz düzelir. Peritonitin bu tipinde sıklıkla bakteriyemi ve üriner sistem infeksiyonu da bulunur (18).

Klinik olarak peritonit bulguları olan ve asit sıvısında ml'de 250'den fazla PNL olan hastalar ve peritonitin klinik bulguları olmasa bile asit sıvısında ml'de 500'den fazla PNL olan hastalara antibiyotik tedavisi verilmelidir (18).

Asit sıvısı kültürü hastaların %50-75'inde pozitifdir. Bu oran alınan örneğin miktarı ve sıvıdaki bakteri konsantrasyonuyla değişmektedir. Bunların

%90'ında tek bakteri üretilmektedir. Erişkinlerin %70'inde *E.coli* ve gram negatif enterik bakteriler etken olarak görülmektedir (18). Pediatrik yaş grubunda en sık etken olan pnömokoklar, erişkin hastaların %20'sinde etken olarak bulunur. Özellikle etken *E.coli* ya da pnömokok olduğunda vakaların %20-40'ında aynı etken kan, balgam ya da idrardan da üretilmektedir (18). Diğer streptokoklar, *H.influenzae* ve *Pseudomonas aeruginosa* daha az sıklıkla rastlanan etkenlerdir (27)

Anaerobik infeksiyonlar nadirdir ve barsak perforasyonu ya da obstruksiyonu ile ortaya çıkar. Polimikrobiyal infeksiyon ya da kültürde *Candida albicans* veya *Bacteriodes fragilis* üremesi, akut abdominal bir olaydan kaynaklanan sekonder peritoniti düşündürmelidir (27).

Tüberküloz peritonit nadirdir ve bakteriyel peritonite benzer. Sıklıkla akciğer grafisinde pulmoner tüberküloz bulgusu vardır. Tanı periton biyopsisi ile konur (27).

Antibiyotik tedavisi klinik olarak peritonit şüphesi varsa asit sıvısı örneği alındıktan hemen sonra başlanmalıdır. Gram boyama veya başka bir alanda infeksiyon bulgusu olması sorumlu organizma hakkında bir fikir verebilir. Nefrotoksiteden kaçınmak amacıyla sefotaksim, ampisilin ve aminoglikozid kombinasyonundan daha üstündür. Anaerob bakteriler sık olmamasına rağmen metronidazol eklenmesi de önerilir, ancak karaciğer hastalarında özellikle böbrek yetmezliği de varsa yarılanma ömrü uzadığından dozu azaltılmalıdır. Antibiyotiklerin başlangıç dozu intraperitoniyal olarak verilmelidir. Bu şekilde 2 saat asit sıvısında yeterli ve etkili konsantrasyonda bulunabilir. Antibiyotik tedavisine rağmen SBP'in prognozu kötüdür ve mortalite oranı %60-90'dır. Kötü prognostik faktörler ciddi karaciğer hastalığı, 38°C'nin üstünde ateş, periferik kanda lökosit sayısının 25.000/mm³'ün üzerinde olması ve böbrek yetmezliğini içerir. İyileşen hastaların %40'ında yaşamları sırasında aynı etkenle SBP tekrarlar ve prognozu ilk atakla aynıdır. Bu hastalar diğer alanlardaki infeksiyona da açıktırlar (18).

2.2.3. Üriner Sistem İnfeksiyonu

Sirozlu hastaların yaklaşık %17'sinde üriner sistem infeksiyonu görülür ve tüm infeksiyonlu olguların yaklaşık yarısını oluşturur (18). İnfeksiyon hastaneye yatmamış hastalar arasında kadınlarda daha sıktır; özellikle primer bilier sirozlu kadın hastalarda bakteriüri insidansı diğer karaciğer hastalıklarına göre daha fazladır (27). Hastaneye yatmış hastalarda üriner sistem infeksiyonları üriner kateterizasyonla ilişkili olup kadın ve erkeklerde eşit oranda görülür (18). Üriner sistem infeksiyonlarından sorumlu bakteriler karaciğer sirozu olmayan populasyonla benzer olarak *E.coli* ve diğer aerob enterik gram (-) basillerdir (27). Sirotik veya alkolik hastalarda üriner sistem infeksiyonları renal papiller nekroz ve piyelonefritle birliktelik gösterir. Bu ilişki renal arteriyel vazokonstriksiyon ve interstisyel ödem nedeniyle olabilir. Üriner kateterizasyon gerektirecek kadar ciddi hastalık ya da renal yetmezlik gelişmesi infeksiyona yatkınlık sağlar ve kötü prognoz faktörüdür. Üriner sistem tüm bakteriyemi olgularının %50'sinde, SBP olgularının %20'sinde ve bazı infektif endokardit olgularında bakteriyeminin kaynağını oluşturur (18).

2.2.4. Bakteriyemi

Hastaneye yatırılan sirozlu hastalarda yaklaşık %7 oranında bakteriyemi ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu oran kompanse sirozlu hastalarda %1 iken dekompanse sirozlu hastalarda %20 'dir. Genellikle hastalığın son dönemlerinde ortaya çıkar ve kötü prognoz göstergesidir. Dekompanse hastalarda *E.coli* ve diğer enterik gram (-) basiller en sık etken iken kompanse hastalarda *Streptococcus pneumoniae* ve grup A streptokoklar en sık etkenler olarak karşımıza çıkar. Bakteriyemilerde *E.coli* ve diğer enterik mikroorganizmaların yüksek insidansı kaynağın barsaklar olduğunu düşündürmektedir. Muhtemelen bu portal kanın retiküloendotelial sistemden geçmeden sistemik dolaşıma katılmasını sağlayan portosistemik şantların bir sonucudur. Bakteriyeminin diğer önemli kaynakları üriner sistem, solunum

sistemi ve intravasküler kateterlerdir. Menenjit ve endokardit sık olmayan kaynaklar olsa da araştırılmalıdır (18,27).

2.2.5. Pnömoni

Antibiyotik öncesi dönemden günümüze kadar pnömoninin prognozu ve mortalitesi ile alkol bağımlılığı arasındaki ilişki bilinmektedir. Karaciğer hastalığı ve lökopeni olmasa bile tek başına alkolizm prognozu büyük oranda etkiler. Pnömonili vakaların büyük kısmı orofarengeal içeriğin akciğerlere aspirasyonu ile ortaya çıkar. Diğer risk faktörleri gastrointestinal kanama, özefagogastroduodenoskopi gibi invaziv girişimler ve asit varlığıdır. *S.pneumoniae* en sık patojendir. Klinik tablo sıklıkla sadece şiddetli ve produktif öksürük ve paslı balgamla birlikte ani başlayan ateşi içerir. Komplikasyonlar alkoliklerde siktir. Bu komplikasyonlar ampiyem, kavitasyon, endokardit ve menenjiti içerir. *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* gibi gram (-) bakteriler alkol bağımlılarında daha sık rastlanan etkenlerdir (18,27).

2.2.6. İnfektif Endokardit

Dekompanse karaciğer hastalığı olan hastalarda infektif endokardit kolayca gözden kaçabilir. Sirozlu hastalarda infektif endokardit sıklığı ile ilgili farklı sonuçlar veren araştırmalar mevcuttur. Ancak sıklığına bakılmaksızın kronik karaciğer hastalığı olanlarda infektif endokarditin değişik klinik görünümüyle ortaya çıkabileceği bilinmelidir. Aort ve mitral kapaklar en sık etkilenen kapaklardır. Genellikle bunlarda altta yatan kapak hastalığı bulunmaz. Bu hastalarda nonkalsifik aort stenozunun daha sık olduğu gösterilmiştir. Bu hastalarda en sık gözlenen mikroorganizmalar *S.pneumoniae* ve enterik bakterilerdir. Sirozla birlikte olsun veya olmasın alkolizm pnömokokal endokardit için majör risk faktörüdür ve sıklıkla pnömokokal menenjit ve/veya pnömoni ile ilişkilidir. Bu mikrobiyolojik farklılık kronik karaciğer hastalığı olan infektif endokarditli vakalarda antibiyotik tedavisi planlanırken önemlidir. Tanının gözden kolayca kaçması ve yetersiz

antibiyotik tedavisi bu hastalarda mortaliteyi arttıran faktörlerdir. Günümüzde ekokardiyografinin yaygın olarak kullanımı ile bu hastaların tanı ve takibi kolaylaşmıştır. Karaciğer hastalığı ve pnömokok septisemisi olan tüm hastalar ekokardiyografi ile değerlendirilmelidir. Kalp kapak hastalığı, prostetik kapağı veya daha önceden geçirilmiş infektif endokardit öyküsü olan hastalara bakteriyemi riski olan invaziv işlemlerden önce antibiyotik profilaksisi verilmelidir (18,27).

2.2.7. Bakteriyel menenjit

Menenjit, sirozlu hastalarda seyrek olarak görülür. Ancak dekompanse karaciğer hastalığı olanlarda kolayca gözden kaçabilir. Çünkü bu hastalarda ensefalopati nedeniyle konfüzyon ve uykuya meyil vardır. En sık pnömokokal menenjit görülür ve sıklıkla eş zamanlı septisemi ile birlikte dir. Genellikle prognozu kötüdür. Daha az olmakla birlikte *E.coli* ve *Listeria monocytogenes*'te bu hastalarda menenjit etkeni olarak karşımıza çıkabilirler (18,27).

2.3. NÖTROFİLLER (POLİMORFONUKLEER LÖKOSİTLER)

Nötrofiller, kemik iliğinde yer alan pluripotent kök hücrelerinden orijin alan kan hücreleridir. Nötrofillerin ortalama çapları 10-15µm olan; santral veya ekzantrik yerleşimli, iki veya daha fazla loblu olabilen, koyu eflatun renkli, kaba kromatin ağılı nükleusları vardır. Nükleusu pembe-menekşe renkli granüller içeren, soluk pembe renkli sitoplazma çevreler (28-30).

En erken tanımlanabilen nötrofil prekürsörü miyeloblasttır. Hücre daha ileri farklılaşma basamaklarına ilerledikçe kromatin yoğunlaşır ve çekirdekçikler kaybolur ve aynı zamanda sitoplazma karakteristik granüllerini oluşturur. Prekürsör gelişimi vasıtasıyla promiyelosit, miyelosit, metamiyelosit, çomak ve olgun PNL'ler oluşur. Yeni bir kök hücresinin olgun bir nötrofil haline gelebilmesi için 8-10 gün gereklidir. Matür nötrofiller kan dolaşımına katılmadan önce kemik iliğinde depolanırlar. İnfeksiyonlar ve stres sırasında kan dolaşımına salınırlar. Dolaşımdaki yarı ömürleri sadece altı saattir. Dokularda günlerce kalabilirler (31).

Normal bir insanda periferik kandaki lökosit sayısı $4-10 \times 10^9 /L$ olup bunların %40-75'ini nötrofiller oluşturur (32).

2.3.1 Nötrofillerin Yapısı

Miyeloid serinin olgun hücreleri olan nötrofillerin önemli görevlerinden biri vücuda giren mikroorganizmaların fagositozu ve onların öldürülmesidir (7,8). Bu işlevini hücre içindeki granüller içinde paketlenmiş lizozomlarla yaparlar. Bu granüller içerisinde hidrolitik enzimler ve antibakteriyel ajanları vardır. Nötrofiller azurofil, spesifik ve tersiyer granülleri içermektedir (33).

Azurofil granüller: Promiyelositer evrede oluşur. Sindirimde hidrolitik enzimlerin fagozom içine salınmasından önce rezervuar olarak görev yaparlar.

İçerikleri;

Asit hidrolazlar; Nötrofiller içine alınan materyalin indirgenmesi.

Nötral proteazlar; İnflamatuvar dokunun parçalanması.

Lizozim; Bakteri duvarının sindirilmesi.

Miyeloperoksidaz; Oksijen bağımlı bakteri öldürülmesi.

Defansinler ve bakterisidal permeabilite arttırıcı proteinler;
Oksijen bağımsız bakteri öldürülmesi.

Spesifik granüller: Daha geç miyelositik evrede oluşurlar (28,30).

İçerikleri;

Laktoferrin; Demir bağlayıcı protein

Kollajenaz; Kollajen fibrillerini hidrolize eder.

Kobalamin bağlayıcı protein; Bakteriyel kobalamin ve analoglarını bağlar.

Lizozim; Bakteri duvarını sindirir.

Tersiyer granüller: Özellikleri tam olarak karakterize edilememiş granüllerdir.

İçerikleri;

Gelatinoz; Kollajene benzeyen bir enzimdir.

C3bi reseptörleri; Nötrofil adezyonuna katılır.

Nötrofil plazma membranı: Ekstrasellüler proteinleri tanımlamak için gerekli olan reseptörleri içermektedir (34).

Bunların dışında nötrofillerin yapısında lipidler, sitolitik enzimler ve nükleik asitler yer alırlar (33).

Tablo-2.4. İnsan Nötrofillerinde Bulunan Granüller (35)

	Azurofil granüller	Spesifik granüller	Tersiyer granüller
Mikrobisidal enzimler	Lizozim Elastaz Katepsin Myeloperoksidaz	Lizozim	
Antibakteriyel katyonik protein Asit hidrolaz	Defansinler BPI N-asetil glukronidaz Katepsin B Katepsin D β Glukronidaz β Gliserofosfataz α Monosidaz	Laktoferrin	
Metalloproteinaz Nötral serin proteaz Diğerleri	Kollagenaz Proteinaz Kinin C5a-inaktivatörü	Sitokrom b Histaminaz Heparinaz Plazminojen Kompleman aktivatörü Vit B12 bağlayıcı protein Reseptörler FMLP C3bi FcRIII Laminin Trombospondin	Gelatinaz C3bi reseptörleri Sitokrom b Alkalen fosfataz FcRIII reseptörleri

BPI: Bakterisidal permeabilite artırıcı

2.3.2. Nötrofil Fonksiyonları

Nötrofiller vücudun ilk ve en önemli savunma mekanizmalarındandır. Çeşitli mikroorganizmalar ve kemotaktik faktörler, dış uyaranlar; dolaşımın sakin bir üyesi olan nötrofili güçlü bir silaha çevirmektedir. Bu değişikliklere uğramış hücre “Aktive edilmiş nötrofil” olarak bilinir (30). Mikroorganizmaların nötrofil tarafından yok edilmesi dört aşamada olmaktadır. Mikroorganizmanın bulunması, hücre içine alınması, sindirilmesi ve öldürülmesi. Bu aşamada nötrofil fonksiyonları dört bölümde incelenir (30).

- 1.Adezyon ve kemotaksis
- 2.Fagositoz
- 3.Hücre içi sindirim
- 4.Öldürme

Adezyon

Nötrofillerin inflamatuvar bölgeye dokular arasından göç edebilmesi için yüzeylere yapışması gerekir. Adezyon CD11/CD18 ailesi olarak bilinen bir grup nötro fil yüzey glikoproteinleri ile sağlanır. İnflamatuvar dokuda bulunan makrofajlar tarafından salgılanan interlökin-1 (IL-1) ve Tümör Nekrotizan Faktör (TNF) gibi sitokinler salgılanır. Bunlar endotel hücrelerinden endotelial lökosit adezyon molekülü (ELAM-1; E selektin) ve GMP-140 (P-selektin; CD62) gibi adezyon moleküllerini açığa çıkartır. Bunların nötrofillerdeki L-selektinler ile birleşmesi nötrofillerin endotele doğru hareketine sebep olur. Daha sonra aktive olmuş endotel hücrelerinden salgılanan intrasellüler adezyon molekülü (ICAM-1, CD54) ile, nötrofil yüzeyinde CD11/CD18 glikoproteinlerinin etkileşimi sonucunda endotele adezyon gerçekleşir. Daha sonra nötrofiller subendotelial bazal membranı sindirerek inflamatuvar dokuya ulaşırlar (30).

Kemotaksis

Nötrofil, hedefini kimyasal bir duyu sayesinde kemotaktik faktörler olarak bilinen, hücrenin belirli maddeleri tespit etmesini kolaylaştıran maddelerle bulur. Bu kemotaktik faktörler mikroorganizmaların dokuları invaze ettiği bölgelerden devamlı olarak salınır ve belli bir konsantrasyon gradiyenti oluşturmak için diffüze olur. Dolaşımdaki nötrofiller bu gradiyenti hissederler ve kaynağına doğru göç ederler. Yolculuklarına kapiller ve post kapiller endotele marjinyasyon yaparak başlarlar. Daha sonra damar duvarları boyunca göç ederler, muhtemelen kollajenaz ile lokal sindirim yaparak subendotelial bazal membranı penetre ederler. Bu, bir kimyasal uyarının kaynağına doğru migrasyon olayına kemotaksis denir (30).

Nötrofiller çok sayıdaki kemotaktik faktörlere cevap verir, fakat bunlardan üç tanesi önemlidir.

N-formüllü oligopeptidler

C5a

Lökotrien B₄ (LTB₄)

N-formüllü oligopeptidler: Bakteriyel protein sentezindeki ara ürünlerdir ve zedelenen bakterilerden salınır.

C5a: Kompleman sisteminin mikroorganizmalarla ilişkisi sonrasında ve aktive nötrofillerden C5a parçalayıcı enzimin salınması ile oluşur.

LTB₄: Nötrofillerden araşidonik asitin, endojen fosfolipidlerden üretilmesi ile sentezlenir (30).

Fagositoz

Nötrofillerin mikroorganizmaları tanıyabilmesi için onların opsoninlerle kaplanmış olması gerekir. Bu olaya opsonizasyon denir. Bu opsoninler ise spesifik antikorlar ve komplemanın C3b fragmanıdır. Opsonize edilen mikroorganizma bu opsoninler aracılığı ile nötrofil yüzeyine yapışır. Bu yapışmada bu opsoninleri tanıyan nötrofil membranındaki reseptörler önemli rol oynar. Mikroorganizmanın nötrofil yüzeyine bağlandığı yerde membran içeri doğru kıvrılarak, partikülü çepeçevre sarar, içeri alınan partikül, nötrofil

membranı ile çevrili bir vezikül olarak içeri alınır. Bu veziküle fagositik vezikül denir. Bu olaya da fagositoz denir (30).

Hücre İçi Sindirim ve Öldürme

Fagosit edilen mikroorganizmaların öldürülmesi nötrofillerin iki ayrı aktiviteleri ile oluşur (30).

Degranülasyon

Respiratory burst (Respiratuar patlama)

Degranülasyon: Granül membranının plazma membranı ile birleşmesi ve içeriğini fagositik veziküle boşaltması işlemidir. Böylece azurofil granüller tamamıyla fagositik vezikül içine degranüle olurlar. Çünkü içerikleri temel olarak sindirilen mikroorganizmaya karşıdır. Spesifik granüller ise hem fagositik vezikül içine hem de dış çevreye degranülasyon yaparlar. Çünkü içerikleri mikroorganizmaya karşı olduğu gibi, nötrofillerin dışına da etkilidir (30).

Respiratuar patlama: Oksijenin parsiyel reduksiyonu ile potent mikrobisidal oksidanların üretimi şeklinde metabolik bir olaydır. Bu yanma olayı spesifik granüllerin degranülasyonunu uyaran, daha çok sindirilebilen partikülle kontakt veya yüksek konsantrasyonda kemotaktik faktörlere maruz kalınmasıyla olur. Bu uyaranlar önce plazma membranına bağlı oksidaz enzimini aktive eder. Oksidaz enzimi ise oksijenin süperoksida dönüşümünü kataliz eder. Süperoksidlerin çoğu ise Hidrojen iyonları ile reaksiyona girerek hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur. Mikrobisidal ajanlar H_2O_2 'den gelişir. H_2O_2 'in bir kısmı Cl^- u okside etmek için kullanılır ve sonuçta yüksek mikrobisidal hipoklorit iyonu ($HOCl$) oluşur. Bunu azurofil granüllerinden fagositik veziküle salınan myeloperoksidaz enzimi yapar. H_2O_2 'nin diğer bir kısmı reaktif hidroksil radikallerine dönüşür. Bunlar ve bunlarla bağlantılı oksidanlar hücrel içeriğini okside ederek mikroorganizmaları öldürürler (30).

2.4. GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLAN FAKTÖR (G-CSF)

Hematopoezin regülasyonundan sorumlu hormonlara hematopoietik büyüme faktörleri adı verilir. Sitokin grubuna dahil olan bu faktörler, hematopoietik progenitör hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve olgun kan hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleyen glikoprotein yapısında moleküllerdir. Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF) nötrofil serisinden hematopoietik öncü hücrelerin proliferasyon ve differansiyonunu uyararak 17q11-21 no'lu kromozomda yerleşik tek gen tarafından kodlanan 18-kD molekül ağırlığında glikoprotein yapısında bir maddedir (36).

G-CSF monosit/makrofaj hattından vasküler endotel hücrelerinden, fibroblastlar ve mezotel hücreleri gibi mezodermal orijinli hücrelerden üretilmektedir (37). 1966'da Metcalf ile Bradley ve Pluznic ile Sachs in vitro kemik iliği hücrelerinin yaşayabileceği semi-solid kültürleri geliştirdiler. Böylelikle ilk defa hematopoietik progenitör hücrelerinin ayrı koloniler oluşturmasını sağlayan ve glikoprotein yapısındaki koloni uyarıcı bu faktörler hematopoietik büyüme faktörleri (Colony-Stimulating Factors: CSF) olarak isimlendirildi (10).

Günümüzde birçok koloni uyarıcı faktör kolaylıkla tanımlanmış genetik kodlamaları yapılmış ve rekombinant yöntemlerle üretilebilir hale gelmiştir. Bugün eritropoetin başta olmak üzere G-CSF, Granülosit Monosit-Koloni Stimüle Edici Faktör, (GM-CSF) Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktör (M-CSF) interlökin 1'den 27'ye kadar bir çok hematolojik büyüme faktörü bulunmuştur (10,38-44) (Tablo-2.5).

Tablo 2.5. Bazı hematopoietik büyüme faktörlerinin özellikleri (10,38-44)

Molekül	Kromozom	Etkisi
G-CSF	17q11-22	CFU-G uyarımı, nötrofil aktivitesi ve sayısının artımı
GM-CSF	5q23-31	CFU-GM, CFU-GEMM ve CFU-MK uyarımı; nötrofil, monosit, eozinofil aktivasyonu; nötrofil sayısının artımı
EPO	7q11-22	CFU-E, BFU-E uyarımı, eritrosit sayısının ve hemoglobin yapımının artımı
M-CSF	5q23	CFU-M uyarımı, monosit-makrofaj sayı ve aktivitesinin artımı
SCF	4q	Stem hücre, erken lenfoid, myeloid ve mast hücre stimülasyonu
PIXY3121	-	CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-MK, BFU-E uyarımı
IL-1	2q14	IL-3, G-CSF, GM-CSF, M-CSF ile sinerjistik hematopoez ve immün sistem uyarımı
IL-2	15	T hücrelerindeki sitotoksik cevabı artırır. B hücrelerinin olgunlaşmasında ve farklılaşmasında kofaktör rol oynar
IL-3	5q23-31	CFU-GM, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M, CFU-MK, BFU-E uyarımı, nötrofil sayısının artımı
IL-4	15-20	Sitotoksik T lenfositlerinin farklılaşmasını ve timosit gelişmesini stimüle eder
IL-5	12-18	Sitotoksik T lenfositlerinin farklılaşmasında kofaktör rol oynar, B hücrelerinde IgA ve IgM sentezini artırır
IL-6	7q15	IL-1, IL-3 ve GM-CSF ile sinerjistik b lenfosit ve megakaryosit stimülasyonu
IL-7	25	Lymphokine-activated killer cell (LAK) aktivitesini artırır. B hücre gelişimini uyarır.

Tablo 2.5. Bazı hematopoietik büyüme faktörlerinin özellikleri (10,38-44)
(Devamı)

Molekül	Kromozom	Etkisi
IL-8	8-16	T ve B hücreleri, monositler ve nötrofiller için güçlü bir kemotaktik ajandır.
IL-9	32-39	Antijen spesifik T helper hücrelerinin klonal yapısını stimüle eder.
IL-10	17-21	T helper-1 hücrelerinde sitokin sentezini inhibe eder. Makrofaj aktivitesini inhibe eder.
IL-11	24	IL-3 ile sinerjistik plazmositoma ve BFU-MK uyarımı
IL-12	75	CD4+, CD8+ T hücrelerini aktive eder.
IL-13	132aa	IgE sentezini artırır.
IL-14	468aa	B hücre proliferasyonunu artırır.
IL-15	144aa	İn vitro LAK hücrelerinin ve sitolitik hücrelerin gelişimini artırır.
IL-16	15q26,3	T hücre gelişimini ve farklılaşmasını uyarır.
IL-17	2q31	İn vitro hematopoezisi stimüle eder.
IL-18	11q22,2	Sistemik ve lokal inflamasyonda rol oynar. Thelper-1, sitotoksik T lenfosit, NK , makrofaj , dendritik hücreler ve B lenfositlerin aktivasyonunu; NO ve adezyon moleküllerinin sentezini düzenler.
IL-19	1q32,2	T helper-1 hücrelerinde sitokin sentezini inhibe eder. Makrofaj aktivitesini inhibe eder.
IL-20	1q32	T helper-1 hücrelerinde sitokin sentezini inhibe eder. Makrofaj aktivitesini inhibe eder.
IL-21	4q26-q27	NK hücrelerin farklılaşmasını ve B hücre proliferasyonunu uyarır.

Tablo 2.5. Bazı hematopoitik büyüme faktörlerinin özellikleri (10,38-44)
(Devamı)

Molekül	Kromozom	Etkisi
IL-22	12q15	T helper-1 hücrelerinde sitokin sentezini inhibe eder. Makrofaj aktivitesini inhibe eder.
IL-23	12	CD4+, CD8+ T hücrelerini aktive eder.
IL-24	1q32	Tümör hücreleri için proapoptotiktir.
IL-25	-	IL-17'nin bir varyantıdır. Akciğerde T helper-2 hücrelerinden salgınır. Serum IgE , IgA ve IgG ₁ düzeyini ve eozinofil sayısını artırır.
IL-26	12q15	Makrofaj aktivitesini inhibe eder.
IL-27	19p13,3	NK hücrelerin farklılaşmasını sağlar

G-CSF'ün ilk saflaştırılması insan mesane kanseri hücrelerinden olmuş ve sonradan insan G-CSF geni ve cDNA'sı moleküler olarak klonlanmıştır. G-CSF geni 17. kromozomun uzun kolunda bulunur. Nötrofilik granülositlerin gelişiminde rol oynadığı bilinen diğer faktörlerle aynı bölgede yer almaktadır (10,38). Doğal olarak bilinen insan G-CSF'ü 19.600 Dalton molekül ağırlığındadır. Rekombinant human G-CSF (rhG-CSF)'ü ise *E.coli*'den elde edilen 174 aminoasitten oluşan 18.800 Dalton molekül ağırlığında amino terminalinde methionin aminoasiti bulunan ve karbonhidrat taşımayan bir proteindir. Endotoksin, TNF, IL-1 ve GM-CSF, G-CSF üretimini stimüle ederler. G-CSF salgınımında erkek ve kadın arasında herhangi bir fark yoktur. Diürnal varyasyon da göstermez. Erişkinlerde serum immünoreaktif G-CSF seviyesi 20-95 pg/ml olarak bulunmuştur. Bakteriyemide G-CSF seviyesi 2000 pg/ml'nin üzerine çıkar. Bu durum G-CSF'in nötrofil yapımındaki düzenleyici rolünü gösterir (45).

G-CSF diğer hematopoietik büyüme faktörlerinde olduğu gibi etkisini hedef hücre membranı üzerindeki reseptörleri aracılığı ile gösterir (45). Miyeloid hücrelerde G-CSF için yüksek affiniteli bir reseptör sınıfı gösterilmiştir. G-CSF reseptörleri spesifiktir, tek bir affiniteleri vardır, nötrofilik granülositer serinin tüm hücrelerinde bulunur. G-CSF reseptörleri normal ve malign miyeloid hücrelerde, endotelde, plasenta hücrelerinde, osteoklastlarda ve bazı hematolojik kaynaklı olmayan tümör hücrelerinde bulunur. İnsan nötrofil reseptör sayısı hücre olgunlaşmasıyla artar. G-CSF'in etkisini gösterebilmesi için reseptöre bağlanma, internalizasyon ve degradasyon gerekir. G-CSF reseptör kompleksi internalize olup hücre içinde degrade oldukça G-CSF reseptör sayısı azalır (46).

Çalışmalarda, G-CSF uygulanmasıyla periferik kanda PNL'lerin sayısında doza bağlı artış bildirilmektedir. G-CSF verilmesini takiben ilk 60 dakika içinde periferik kan PNL sayısında önce geçici bir düşme, arkasından 4-5 saat içinde nötrofil sayısında hızlı bir artış görülür. İlk geçici düşüşün sebebi vasküler duvara nötrofil marjinasyonudur. Bunu nötrofil demarjinasyonu ve kemik iliğinden olgun nötrofillerin dolaşıma verilmesi izler. G-CSF uygulamasında görülen kemik iliği bulgularının başında hücresel içeriğin artışı gelir. Miyeloid/eritroid oranı ve erken miyeloid hücrelerin geç miyeloid hücrelere oranı artmıştır. Kemik iliğinde displastik değişiklik izlenmez (36,45).

G-CSF çeşitli hücresel ve humoral uyarıya cevap olarak kemik iliği, stroma hücreleri, endotelial hücreler ve fibroblastlarca salındıktan sonra öncelikle granülositlerin yapımını uyarır ancak çok yüksek dozlarda, örneğin 60 µg/kg/gün gibi, monositler üzerine etkilidir. Eozinofil ve bazofil sayısında bir artış gözlenmez. Lenfosit ve prekürsörlerinde G-CSF reseptörü yoktur, bazen görülebilen lenfositöz görecelidir (36,46).

G-CSF'ün in vivo ve in vitro etkileri üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. İn vitro koşullarda nötrofillerin kemotaksisini (47), superoksit üretimini, dolayısıyla respiratuar patlamasını arttırdığı gösterilmiştir (36). Yine in vitro koşullarda nötrofillerin bakterileri fagositozunu ve öldürme kapasitesini arttırmış ama kandida hücrelerinin nötrofiller tarafından fagositoz ve öldürülmesi üzerine etkili bulunmamıştır (48). Matsumoto ve arkadaşları (12) nötroopenik fareleri *Serratia marcescens*, *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *C.albicans* ile in vivo yoldan infekte ederek geliştirdiği nötroopenik sepsis modelinde hayvanlardaki mortaliteyi azalttığını bildirerek bu durumu G-CSF'in miyeloid seri üzerine olan etkisi ve nötrofil fonksiyonlarını artırmasıyla açıklamışlardır.

G-CSF, klinikte geleneksel kemoterapiye bağlı myelosupresyonun önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. G-CSF'ün nötroopenik hastalarda nötroopeni süresi ve derinliğini azalttığı, antibiyotik kullanım gereksinimini ve hastanede yatış süresini kısalttığı görülmüştür (36). Mather ve arkadaşları (49), 216 nötroopenik hastaya G-CSF uygulamış ve bu hastalardaki nötroopeni süresinin kısalacağını, mikrobiyolojik olarak kanıtlanmış infeksiyonların azaldığını, ama ateşli gün sayısının azalmadığını gözlemişlerdir

G-CSF allojenik ya da otolog kemik iliği transplantasyonlarından sonra, çeşitli kronik nötroopenilerde (miyelodisplastik sendrom, aplastik anemi ve idiyopatik nötroopeniler) ve siklik nötroopeni durumlarında başarı ile kullanılmıştır (10,50). Burada kullanımdaki primer amaç, nötrofil yapımını artırarak vücudun savunma yeteneğini geliştirmek, nötrofil sayısını optimale ulaştırmak ve böylelikle ilgili hastalıkların mortalite ve morbiditesini azaltmaktır. G-CSF kemik iliği nakli sonrasında kullanıldığında nötroopeni daha erken düzelmekte, infeksiyon insidansı düşmekte ve hastanede yatış süresi kısalmaktadır (10,51).

Yine Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)'lu hastalarda G-CSF uygulaması bu hastalardaki nötrofil sayısını doza bağımlı olarak artırmaktadır (52). AIDS'li hastalardan in vitro koşullarda elde edilen nötrofillerin *C.albicans* ve *Cryptococcus neoformans* hücreleriyle muamele edilmesi sonucunda fungisidal aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir (53). Enfeksiyon durumunda uygun bir antibiyotik ile rhG-CSF'in kombine uygulamasının additif etki yarattığı iddia edilmiştir (54). Gillan ve arkadaşları (55), sepsisli 42 yenidoğana değişik dozlarda G-CSF uygulamış, nötrofil sayılarının arttığını gözlemlemiştir. Amerikan Klinik Onkoloji Birliği (ASCO) febril nötropenik hastalarda antibiyotiğe ek olarak pnömoni, hipotansiyon, multiorgan yetmezliği veya fungal enfeksiyon durumlarında kullanılmasını benimsemektedir (10).

Koloni stimüle edici faktörlerin kullanımının nötrofil sayı ve fonksiyonlarını olumlu yönde değiştirmesi ile konakçı savunmasını güçlendireceği fikri, ciddi enfeksiyonlu hastalarda morbidite ve mortaliteyi azaltmak açısından yeni bir umut kaynağı olmuştur. rhG-CSF'in Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde kabul edilmiş başlangıç dozu 5µg/kg'dır (56). Subkutan veya kısa süreli intravenöz yolla uygulanır. İlaç en fazla 2 hafta veya nötrofil sayısı $10 \times 10^9/L$ 'ye çıkıncaya kadar uygulanmalıdır (10).

G-CSF genellikle iyi tolere edilir, ancak tedavi sırasında ateş, sırt ağrısı, göğüs ağrısı, baş ağrısı, iştahsızlık, bulantı, dispepsi, deri döküntüleri, çarpıntı, titreme, kaşıntı, parestezi, ishal, burun tıkanıklığı ve poliüri gibi yan etkiler çıkabilir (57). Çok nadiren anafilaktoid reaksiyon gelişebilir (47). G-CSF verildikten sonra kısa bir süre için nötrofil ve monosit azalması olabilir. Bu durum nötrofillerin pulmoner vasküler yatakta geçici olarak göllenmesinden kaynaklanmaktadır ve klinik öneminin olmadığı ama ilk dozdan hemen sonra hastalarda gözlenen geçici hipoksemiye açıklayabileceği ileri sürülmüştür (58).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığının 04/03/2003 tarih ve 2003/4 sayılı onayı ile; 1 Mart 2003- 30 Haziran 2003 tarihleri arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde yapıldı. Çalışmaya İç Hastalıkları Kliniğinde viral hepatit B ve C' ye bağlı karaciğer sirozu tanısı ile takip ve tedavi edilen 14 hasta alındı. Çalışmaya alınan karaciğer sirozlu hastaların yaş ortalaması $59,64 \pm 2,31$ yıl idi. Çalışmaya alınan hastaların 9'u (%64,3) erkek; 5'i (%35,7) kadın idi. 9 hastada etyoloji kronik Hepatit B (%64,3), 5 hastada ise kronik Hepatit C (%35,7) idi. Hastaların Child-Pugh evrelendirmesine göre ortalama skorları $10,93 \pm 1,27$ idi; ve hepsi dekompanse Child C grubuna giriyorlardı (15).

Kontrol amacı ile 14 sağlıklı donör çalışmaya alındı. Donörlerin yaş ortalaması $59,71 \pm 1,08$ yıl idi ve gruplar arasında yaş yönünden anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,945$). Kontrol grubundaki donörler de 9 erkek ve 5 kadından oluşuyordu ve hasta grubu ile aralarında cinsiyet açısından da fark yoktu.

Çalışmaya alınan tüm hastalar ve donörlerde nötrofiller elde edilmeden önceki 30 günlük süre içerisinde antibiyotik kullanma ve enfeksiyon öyküsü yoktu.

3.1. Nötrofillerin Elde Edilmesi

Nötrofiller on dört hasta ve on dört sağlıklı donörden alınan venöz kandan Verburgh'un tanımladığı modifiye Böyum tekniğiyle elde edildi (59).

a. Venöz kan, 5-10 ünite/ml benzil alkol içermeyen heparin ile sıvanmış enjektörlere alındı.

b. Steril plastik 17x100 mm ebatlarındaki kapaklı tüpe %6'lık dextran içeren solüsyondan 3ml kondu. (Macrodex®, Eczacıbaşı, Türkiye)

c. Alınan heparinize 10 ml kan tüpe yavaşça aktarıldı ve 45 dakika kadar oda ısısında çökmeye bırakıldı. Bu sürenin sonunda eritrositler dibeye çöktü.

d. Lökosit zengin süpernatant plazma pipet yardımıyla alındı ve temiz, steril 17x100 mm ebatlarındaki plastik tüp içindeki 3 ml Ficoll solüsyonu (Histopaque® Sigma Katalog No: 1077-1) içine yavaşça aktarıldı.

e. 200xg hızda 30 dakika santrifüje (Hettich EBA-85) edildi.

f. Üstte toplanan mononükleer kısım pastör pipetiyle ayrıldı.

g. Altta kalan eritrosit ve lökosit karışımı soğuk distile su ile 45 saniye kadar elle çevrilerek eritrositlerin parçalanması sağlandı.

h. Geriye kalan lökositler Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma Katalog No: H6136) ile iki kez yıkandı ve 160xg hızda 10 dakika süreyle santrifüje edildi.

i. Süpernatant kısım atılarak altta kalan lökositlerin canlılığı Trypan Blue solüsyonu (Sigma Katalog No: T8154) ile kontrol edildi. Elde ettiğimiz lökositlerin %95'ten fazlası canlı idi.

j. Nötrofiller Neubaer lamı ve lökosit pipeti yardımı ile 5×10^6 /ml'ye ayarlandı.

3.2. Bakterilerin Hazırlanması

Araştırma sırasında *S.aureus* NCTC 8325 suşu kullanıldı ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü (Ankara- Türkiye)'nden sağlandı. Bakteriler çalışmadan önce -20°C 'de triptoz soy buyyon içinde saklandılar ve çalışma öncesinde oda ısısında erimeleri sağlandıktan sonra kanlı agar plağına ekildiler. 24 saat 37°C 'de inkübe edildikten sonra HBSS içinde MacFarland ölçeğı yardımı ile $25 \times 10^6/\text{ml}$ olacak şekilde ayarlandılar. Böylece deney aşamasında bakteri/ nötrofil oranının 5/1 olması sağlandı.

3.3. G-CSF'in Hazırlanması

Rekombinant human G-CSF (rhG-CSF, Neupogen®) piyasadan sağlandı. *E.coli*'den rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiş, 1×10^8 ünite /mg protein aktivitesindeydi. 0,5 ml'lik kullanıma hazır enjektör içinde, 30 milyon ünite rhG-CSF içeriyordu. İlaç, 1500-6000 Ü/ml konsantrasyonlara HBSS içinde ayarlandı.

3.4. AB serumun hazırlanması

AB kan grubundan olan sağlıklı bir donörden 20 ml venöz kan alındı. 30 dk. oda ısısında bekletildikten sonra santrifüje edildi. Elde edilen serum 1'er cc'lik hacimlerde -20°C 'de saklandı. Her kullanımdan önce oda ısısında çözdürüldü.

3.5. Deneyin Yapılışı

Deneyde 14 hasta ve 14 sağlıklı donörden alınan kanlardan elde edilen PNL'ler G-CSF'in değişik konsantrasyonları ile muamele edildiler. Daha sonra nötrofillerin fagositoz oranı, fagositik indeksi ve intrasellüler öldürme gibi parametreler her hasta ve donör için ayrı ayrı hesaplandı.

PNL'lerin önceden G-CSF ile muamele edilmesi

- a. Steril, temiz 17x100 mm ebatlarında 5 adet tüp hazırlandı.

- b. Tüpler 1-5 arasında numaralandırıldı.
- c. Daha önceden hazırlanmış olan 5×10^6 /ml PNL içeren solüsyondan her bir tüpe 0,2 ml (1×10^6 PNL olacak şekilde) mikropipet yardımıyla yavaşça aktarıldı
- d. Tüplerde aşağıdaki işlemlerle PNL'lerin dört ayrı konsantrasyondaki G-CSF ile muamele edilmesi sağlandı.
- i. Birinci tüp kontrol tüpü olarak alındı ve üzerine 0,2 ml HBSS solüsyonu eklendi.
- ii. İkinci tüpe mikropipet ile 7500U/ml G-CSF içeren solüsyondan 0,2 ml eklendi. (Tüp içindeki miktarının 1500U olması sağlandı)
- iii. Üçüncü tüpe mikropipet ile 15000U/ml G-CSF içeren solüsyondan 0,2 ml eklendi. (Tüp içindeki miktarının 3000U olması sağlandı)
- iv. Dördüncü tüpe mikropipet ile 22500U/ml G-CSF içeren solüsyondan 0,2 ml eklendi. (Tüp içindeki miktarının 4500U olması sağlandı)
- v. Beşinci tüpe mikropipet ile 30000U/ml G-CSF içeren solüsyondan 0,2 ml eklendi. (Tüp içindeki miktarının 6000U olması sağlandı)
- e. İşlemler tamamlandıktan sonra kapaklar sıkıca kapatıldıktan sonra 30 dakika süreyle 37°C 'lik Benmari (Elektro-Mag, Türkiye) içinde tüpler uçtan uca olacak şekilde 4 devir/dakika hızla elle çevrildiler.
- f. Deneyin her aşamasından önce Trypan Blue boyası ile PNL'lerin canlılığı test edildi ve %95'ten daha az canlılığı olan solüsyonlar çalışmaya alınmadı.

Bakterilerin fagositoz ve intrasellüler öldürmesinin ölçülmesi

- a. Önce HBSS içinde 25×10^6 /ml konsantrasyonda olacak şekilde bakteri solüsyonu hazırlandı.
- b. Bu bakteri solüsyonundan mikropipet ile 0,2 ml (5×10^6 bakteri olacak şekilde) daha önce hazırlanan G-CSF ve tampon ile muamele edilmiş ve 1×10^6 sayıda PNL içeren tüplere ilave edildi.

- c. Daha sonra tüplere 0,2'şer ml AB serum ilave edildi.
- d. Son olarak son hacim 1 ml olacak şekilde tüm tüplere 0,2 ml HBSS eklendi.
- e. Tüpler 37°C'lik Benmari içinde 15 dakika ortalama 4 devir/dakika olacak şekilde elle çevrilerek inkübe edildiler.
- f. Her tüpten 0,2 ml mikropipet yardımıyla alınıp steril, temiz 17x100 mm'lik plastik kapaklı tüplere yavaşça aktarıldı.
- g. Tüplere önceden alındığı tüp ile aynı olacak şekilde 1-5 arasında numaralar verildi.
- h. Bu yeni tüpler 400 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edildiler.
- i. Süpernatant kısım atılarak altta kalan PNL ve bakteri karışımından temiz lam üzerine yayma hazırlandı.
- j. Lamlara ayrı ayrı alındığı tüpe uygun şekilde 1-5 arasında numaralar verildi. Lamlar oda ısısında kurutulduktan sonra 15 dakika metil alkol ile tespit edildiler. Bu sürenin sonunda lamlar metilen mavisi ile boyandılar.

Fagositoz indeksi ve intrasellüler öldürmenin ölçülmesi

- a. Daha önce hazırlanan PNL ve bakteri içeren tüplerden fagositoz oranı tespiti için 0,2 ml solüsyon alındıktan sonra tüpler aynı şekilde 30 dakika daha inkübe edildiler.
- b. İnkübasyon sonunda her tüpten 0,01ml'lik standart plastik öze yardımıyla ve steril serum fizyolojik ile sulandırarak kanlı agar plağına koloni sayım ekimi yapıldı.
- c. Plaklara tüplerle aynı olacak şekilde 1-5 arasında numaralar verildi.
- d. 1. kültürler ekildikten sonra tüplere Triton 100 solüsyonu eklenerek lökositlerin parçalanması sağlandı.
- e. Daha sonra tekrar her tüpten 0,01ml'lik standart plastik öze yardımıyla ve steril serum fizyolojik ile sulandırarak kanlı agar plağına koloni sayım ekimi yapıldı.
- f. Plaklara tüplerle aynı olacak şekilde 1-5 arasında numaralar verildi.

g.Plaklar 24 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra her plaktaki koloniler sayıldı ve not edildi (60).

Fagositoz oranı, fagositoz indeksi ve intrasellüler öldürme için sayımlar farklı bir araştırıcı tarafından yapıldı. Sayımı yapan araştırmacı boyalı preparatların ve plakların hangi tüpten hazırlandığını bilmiyordu.

Fagositoz oranı metilen mavisi ile boyanmış preparatlarda her preparat için bakteri fagosite etmiş ve etmemiş olan toplam 100 hücre sayılarak hesaplandı.

Fagositik indeks hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

100PNL içindeki bakteri sayısı ÷ fagositoz yapmış toplam PNL sayısı

100 PNL içindeki ortalama bakteri sayısının hesaplanması aşağıdaki formülle yapıldı.

[Tüpteki bakteri sayısı (5x10⁶)-1.kültürde üreyen bakteri sayısı ÷Tüpteki PNL sayısı (1x10⁶)]x 100

İntrasellüler öldürmenin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

(100 PNL içindeki ölü bakteri sayısı÷100 PNL içindeki canlı ve ölü toplam bakteri sayısı) x 100

100 PNL içindeki ortalama ölü bakteri sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

[Tüpteki bakteri sayısı (5x10⁶)-2.kültürde üreyen bakteri sayısı ÷Tüpteki PNL sayısı (1x10⁶)]x 100

3.6. İstatistik

Çalışmanın verileri SPSS (Versiyon 9.05) programına yüklenerek, verilerin değerlendirilmesinde; tekrarlı ölçümlerde varyans analizi, Tukey testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Veriler tablolarda ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan karaciğer sirozlu hastaların yaş ortalaması $59,64 \pm 2,31$ yıl idi. Çalışmaya alınan hastaların 9'u (%64,3) erkek; 5'i (%35,7) kadın idi. Kontrol amacı ile 14 sağlıklı donör çalışmaya alındı. Donörlerin yaş ortalaması $59,71 \pm 1,08$ yıl idi ve gruplar arasında yaş yönünden anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,945$). Kontrol grubundaki donörler de 9 erkek ve 5 kadından oluşuyordu ve hasta grubu ile aralarında cinsiyet açısından da fark yoktu.

Sağlıklı kontrol grubunda PNL'lerin önceden G-CSF'ün 1500-6000 Ü/ml konsantrasyonlarıyla muamele edilmesi sonucunda gözlenen PNL fonksiyonları Tablo-4.1'de özetlenmiştir.

Tablo-4.1. Sağlıklı kontrol grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus*'la inkübe edilmesiyle gözlenen PNL fonksiyonları

G-CSF (U/ml)	0 (X± Sx)	1500 (X±Sx)	3000 (X±Sx)	4500 (X±Sx)	6000 (X±Sx)	Sonuç
Fagositoz (%)	77,21±1,08	78,14±0,93	80,50±1,18	82,35±1,11	85,64±1,15	F=138,22 P<0,001
Fagositik İndeks	4,02±0,05	4,06±0,04	4,10±0,04	4,17±0,02	4,19±0,03	F=12,12 p<0,001
İntrasellüler Öldürme (%)	36,37±0,16	36,73±0,12	36,77±0,14	36,99±0,15	37,21±0,12	F=38,30 p<0,001

Sağlıklı kontrol grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesi sonrasında *S.aureus*'ları fagosite etme oranları incelendiğinde; G-CSF'in 1500U/ml konsantrasyonunda anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$), 3000U/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda fagositoz oranı doza bağımlı olarak artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bulundu ($p<0,001$).

Fagositik indeks G-CSF'in 1500U/ml konsantrasyonundan itibaren her konsantrasyonda doza bağımlı artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).

İntrasellüler öldürme oranı sağlıklı kontrol grubunda G-CSF'in 1500U/ml konsantrasyonundan itibaren artan konsantrasyonlarda doza bağımlı artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi ($p<0,001$).

Karaciğer sirozlu hasta grubunda PNL'lerin önceden G-CSF'ün 1500-6000 Ü/ml konsantrasyonlarıyla muamele edilmesi sonucunda gözlenen PNL fonksiyonları Tablo-4.2'de özetlenmiştir.

Tablo-4.2. Karaciğer sirozlu hasta grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus*'la inkübe edilmesiyle gözlenen PNL fonksiyonları

G-CSF (U/ml)	0 ($X\pm Sx$)	1500 ($X\pm Sx$)	3000 ($X\pm Sx$)	4500 ($X\pm Sx$)	6000 ($X\pm Sx$)	Sonuç
Fagositoz (%)	55,71 \pm 1,34	59,00 \pm 1,27	63,35 \pm 1,30	67,28 \pm 1,04	71,64 \pm 1,27	F=199,45 P<0,001
Fagositik İndeks	3,52 \pm 0,09	3,80 \pm 0,06	4,02 \pm 0,04	4,26 \pm 0,06	4,46 \pm 0,09	F=41,89 p<0,001
İntrasellüler Öldürme (%)	30,48 \pm 0,32	31,40 \pm 0,45	31,77 \pm 0,34	32,40 \pm 0,34	32,77 \pm 0,35	F=52,56 p<0,001

Karaciğer sirozlu hasta grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesi sonrasında *S.aureus*'ları fagosite etme oranları incelendiğinde; G-CSF'in artan konsantrasyonlarında fagositoz oranı doza bağımlı olarak artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bulundu. ($p<0,001$)

Fagositik indeks G-CSF'in 1500U/ml konsantrasyonundan itibaren her konsantrasyonda doza bağımlı artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p< 0,001$).

İntrasellüler öldürme oranı karaciğer sirozlu hasta grubunda G-CSF'in 1500U/ml konsantrasyonundan itibaren artan konsantrasyonlarda doza bağımlı artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi ($p<0,001$).

Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen fagositoz oranlarının karşılaştırılması Tablo-4.3'de gösterilmiştir.

Tablo-4.3. Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen fagositoz oranlarının karşılaştırılması

G-CSF (U/ml)	0 ($X \pm Sx$)	1500 ($X \pm Sx$)	3000 ($X \pm Sx$)	4500 ($X \pm Sx$)	6000 ($X \pm Sx$)
Sağlıklı kontrol grubu	77,21±1,08	78,14±0,93	80,50±1,18	82,35±1,11	85,64±1,15
Fagositoz (%)					
Karaciğer sirozlu Hasta grubu	55,71±1,34	59,00±1,27	63,35±1,30	67,28±1,04	71,64±1,27
Fagositoz (%)					
Sonuç	$p< 0,001$	$p< 0,001$	$p< 0,001$	$p< 0,001$	$p< 0,001$

Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubu karşılaştırıldığında, hasta grubunda fagositoz oranları hem G-CSF yerine tampon kullanıldığında, hem de G-CSF'in 1500, 3000, 4500 ve 6000U konsantrasyonlarında sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$).

Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen fagositoz indekslerinin karşılaştırılması Tablo-4.4'de gösterilmiştir.

Tablo-4.4. Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen fagositoz indekslerinin karşılaştırılması

G-CSF (U/ml)	0 (X± Sx)	1500 (X±Sx)	3000 (X±Sx)	4500 (X±Sx)	6000 (X±Sx)
Sağlıklı kontrol grubu	4,02±0,05	4,06±0,04	4,10±0,04	4,17±0,02	4,19±0,03
Fagositik indeks					
Karaciğer sirozlu hasta grubu	3,52±0,09	3,80±0,06	4,02±0,04	4,26±0,06	4,46±0,09
Fagositik indeks					
Sonuç	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$

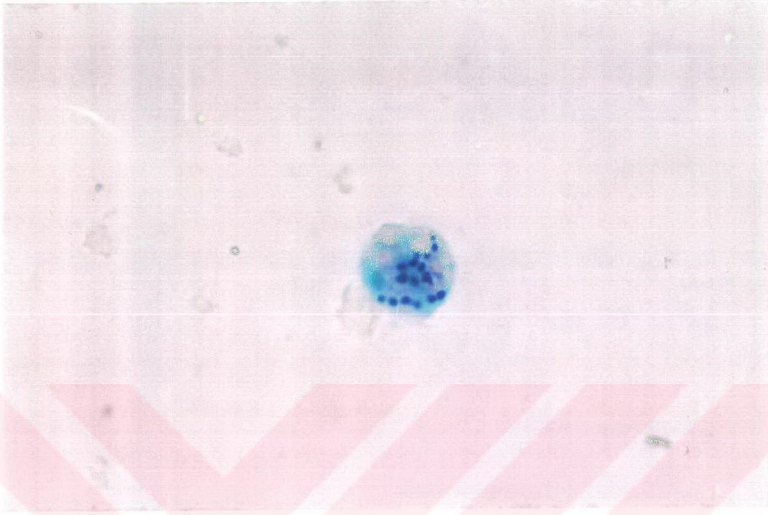
Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesinden sonra fagositik indeksleri karşılaştırıldığında her iki grupta da fagositik indeks G-CSF'in artan konsantrasyonlarında doza bağımlı artış gösterdi. Bu artış her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p < 0,001$) Sağlıklı kontrol grubunda G-CSF yerine tampon kullanıldığında ve G-CSF'in 1500 U/ml ve 3000 U/ml konsantrasyonlarında fagositik indeks hasta grubuna göre daha yüksekti. Bu yükseklik G-CSF yerine tampon kullanıldığında ve 1500U/ml

konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0,001$ ve $p < 0,05$); G-CSF'in 3000U/ml konsantrasyonunda ise anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). G-CSF'in 4500 U/ml ve 6000 U/ml konsantrasyonlarında ise hasta grubunda fagositik indeks kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Bu farklılık G-CSF'in 4500 U/ml konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p > 0,05$), 6000 U/ml konsantrasyonda anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubu karşılaştırıldığında, hasta grubunda intrasellüler öldürme oranları hem G-CSF yerine tampon kullanıldığında, hem de G-CSF'in 1500,3000,4500 ve 6000U konsantrasyonlarında sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$)(Tablo 4.5).

Tablo-4.5. Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubuna ait PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra *S.aureus* ile inkübe edilmesiyle gözlenen intrasellüler öldürme fonksiyonlarının karşılaştırılması

G-CSF (U/ml)	0 ($X \pm Sx$)	1500 ($X \pm Sx$)	3000 ($X \pm Sx$)	4500 ($X \pm Sx$)	6000 ($X \pm Sx$)
Sağlıklı kontrol					
Grubu	36,37 \pm 0,16	36,73 \pm 0,12	36,77 \pm 0,14	36,99 \pm 0,15	37,21 \pm 0,12
İntrasellüler öldürme (%)					
Karaciğer sirozlu					
Hasta grubu	30,48 \pm 0,32	31,40 \pm 0,45	31,77 \pm 0,34	32,40 \pm 0,34	32,77 \pm 0,35
İntrasellüler öldürme (%)					
Sonuç	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$



Resim 4.1. *S.aureus*'ların PNL'ler tarafından fagosite edilmesi. Metilen mavisi ile boyama. (x1000)

5. TARTIŞMA

Karaciğer sirozu çeşitli etyolojik nedenlere bağlı olarak meydana gelen karaciğerin kronik, diffüz ve ilerleyici bir iltihabıdır (1). İnfeksiyon karaciğer sirozunun iyi tanımlanmış, sık görülen, ciddi bir komplikasyonudur (17). Karaciğer sirozlu hastalarda infeksiyonlar varis kanamalarından sonra öldürücü komplikasyonlar arasında ikinci sırada yer alır (2). Sirozlu hastalarda en sık görülen infeksiyon spontan bakteriyel peritonittir, bununla birlikte pnömoni, bakteriyemi, üriner infeksiyon ve bakteriyel endokardit de sık rastlanan infeksiyonlardır (19). Bu hastalarda infeksiyonlara duyarlılığı artıran bir çok faktör vardır. Bunlar arasında en önemlilerinden biri konak savunmasındaki bozukluklardır (18). Sirozlu hastalarda hem humoral hem de hücresele immünitede bozukluk vardır. Bu hastalarda kompleman üretimi ve antikor yapımı azalır (3,20-22). Aynı zamanda bu hastalarda makrofaj aktivasyonu ve mobilizasyonu bozukluğu ile birlikte nötrofillerin fagositoz fonksiyonları ve bakterilerin hücre içinde öldürülmesi fonksiyonlarının azaldığı da gösterilmiştir (4,5,24,26).

PNL'ler infeksiyonlara karşı vücudun ana savunma hücreleridir. En önemli görevlerinden birisi vücuda giren mikroorganizmaların fagositozu ve onların öldürülmesidir (30). Bunun için dış uyarılara ilk yanıtları sırası ile; marjinsasyon ve endotele adezyondur. Ardından kemotaksis ile endoteli aşarak mikroorganizmaların bulunduğu alana geçer ve mikroorganizmaları fagosite eder. Oluşan fagositik vakuoller ve lizozomal granüller birleştikten sonra degranulasyon meydana gelir. Serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar ve mikroorganizmaların öldürülmesi sağlanır (7).

G-CSF, nötrofil serisinden hematopoietik öncü hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunu uyaran 17q11-21 no'lu kromozomda yerleşik tek gen tarafından kodlanan 18-kD molekül ağırlığında glikoprotein yapısında bir maddedir (36). G-CSF monosit/makrofaj dizininden, vasküler endotel hücrelerinden, fibroblastlar ve mezotel hücreleri gibi mezodermal orijinli hücrelerden üretilmektedir (37). G-CSF PNL'lerin kemik iliğinde maturasyonunu uyarır ve kemik iliğinden dolaşıma olgun hücrelerin geçişini artırır (61). G-CSF'in in vitro koşullarda nötrofillerin kemotaksisini (47), superoksit üretimini, dolayısıyla respiratuar patlamasını arttırdığı gösterilmiştir (36). Yine in-vitro koşullarda nötrofillerin bakterileri fagositozunu ve öldürme kapasitesini arttırmıştır (48). İn vivo koşullarda nötrofillerde adezyon molekülleri olan CD11b/CD18b düzeylerinde artışa neden olur. Aynı zamanda G-CSF uygulamasından sonra nötrofil yüzeyinde spesifik bir IgG reseptörü olan CD64 düzeylerinde de artma gözlenmiştir (61). G-CSF nötrofillerde antikor bağımlı sitotoksiteyi ve yüzeyel IgA Fc reseptör sayısını artırarak , IgA aracılıklı fagositozu artırır (62).

Bu çalışma, in vitro koşullarda, viral hepatit B ve viral hepatit C'ye bağlı gelişen karaciğer sirozlu hastalarda G-CSF'in nötrofil fonksiyonları üzerindeki etkisini araştırmak için planlandı. Çalışmamızda karaciğer sirozlu hastalardan elde edilen nötrofiller G-CSF'in 1500, 3000, 4500 ve 6000Ü/ml konsantrasyonlarıyla 30 dakika süreyle muamele edildi. Klinikte hastalara G-CSF intravenöz veya subkutan yolla 1,5-3 µg/kg arasındaki dozlarda verildiği zaman, bu konsantrasyonlar rahatlıkla sağlanabilmektedir (48,63). Bu nedenle çalışmada bu konsantrasyonlar uygulanmıştır. Daha sonra hem sağlıklı kontrollerden hem de karaciğer sirozlu hastalardan elde edilen PNL'ler *S.aureus* NCTC 8325 suşu ile muamele edilerek fagositoz ve intrasellüler öldürme gibi fonksiyonları araştırıldı.

Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesi sonrasında *S.aureus*'ları fagosite etme oranları incelendiğinde; G-CSF'in 1500U/ml konsantrasyonunda anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$), 3000U/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda fagositoz oranı doza bağımlı olarak artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bulundu ($p<0,001$). Fagositik indeks ve intrasellüler öldürme oranı sağlıklı kontrol grubunda G-CSF'in artan konsantrasyonlarında doza bağımlı artış gösterdi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi ($p<0,001$)(Tablo 4.1).

Roiledes ve arkadaşları (48), sağlıklı donörlerden elde ettikleri PNL'leri 10 dakika süreyle artan konsantrasyonlarda G-CSF ile muamele etmiş; daha sonra bu PNL'lerin bakteriyel fagositoz ve intrasellüler öldürme fonksiyonlarını *S.aureus* ile test etmişlerdir. Bu çalışmada normal PNL'lerin G-CSF ile muamelesinden sonra bakteriyel fagositoz oranının, fagositoz indeksinin ve intrasellüler öldürme fonksiyonlarının arttığı gözlenmiştir. De Haas ve arkadaşlarının (64), çalışmasında da G-CSF'in sağlıklı donörlerde in vitro ve in vivo şartlarda nötrofillerin spesifik ve azurofilik granüllerinde artmaya yol açtığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada in vivo G-CSF uygulamasından sonra spesifik granüllerin, in vitro uygulamadan sonra ise hem spesifik hem de azurofilik granüllerin degranulasyonunda artış olduğu izlenmiştir. Bilindiği gibi spesifik ve azurofilik granüller nötrofillerin bakterisidal aktivitesinde önemli rol oynarlar. İçerdikleri lizozim bakteri duvarının sindirilmesini sağlar. Azurofilik granüllerde bulunan myeloperoksidaz ise oksijen bağımlı bakteri öldürülmesinde önemlidir(33). Dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları G-CSF'in nötrofillerin bakterisidal aktivitesini artırdığını gösterir. İn vivo yapılan bir başka çalışmada da sağlıklı donörlere G-CSF uygulamasından sonra nötrofillerde süperoksid anyon üretimi, myeloperoksidaz aktivitesi ve opsonik reseptör yapımının arttığı gösterilmiştir (65). Görüldüğü gibi bu çalışmaların yöntemleri bizim çalışmamızdan farklıdır. Fakat sonuç olarak sağlıklı insanlarda G-CSF'in

nötrofillerde bakterilerin intrasellüler öldürmesini artırdığını göstermesi bakımından bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur.

Çalışmamızda hasta grubunun yaş ortalaması yüksek olduğu için kontrol grubu olarak alınan sağlıklı donörler de bu yaş grubundan seçildi. Sağlıklı donörlerin yaş ortalamasının yüksek olması ($59,71 \pm 1,08$ yıl) sonuçlarda bir farklılık yaratmadı. Bu konuda daha önce Price ve arkadaşlarının (66) yaptığı çalışmada yaşları 20-30 ve 70-80 arasında olan iki grup sağlıklı donöre in vivo G-CSF uygulanmış ve G-CSF'in etkisinin yaşla değişip değişmediği araştırılmıştır. G-CSF uygulamasından sonra nötrofil sayısı, nötrofillerin dokuya migrasyonu ve kemotaktik fonksiyonları araştırılmış, her iki grupta da G-CSF'in sağlıklı donörlerde nötrofil fonksiyonları üzerine olumlu etkisi gözlenmiş ve gruplar arasında fark gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrollerin yaş grubu yüksek olduğu halde G-CSF'in beklenen etkisi gözlenmiştir ve bu sonuç önceki çalışmaların sonuçları ile benzerdir.

Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubu karşılaştırıldığında, hasta grubunda fagositoz oranı ve intrasellüler öldürme oranı hem G-CSF yerine tampon kullanıldığında, hem de G-CSF'in tüm konsantrasyonlarında sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,001$) (Tablo 4.3-4.5). Sağlıklı kontrol grubu ile karaciğer sirozlu hasta grubunun fagositik indeks oranları karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubunda G-CSF yerine tampon kullanıldığında ve G-CSF'in 1500 U/ml ve 3000 U/ml konsantrasyonlarında fagositik indeks hasta grubuna göre daha yüksekti. Bu yükseklik G-CSF yerine tampon kullanıldığında ve 1500U/ml konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0,001$ ve $p < 0,05$); G-CSF'in 3000U/ml konsantrasyonunda ise anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). G-CSF'in 4500 U/ml ve 6000 U/ml konsantrasyonlarında ise hasta grubunda fagositik indeks kontrol grubuna göre

daha yüksek bulundu. Bu yükseklik G-CSF'in 4500 U/ml konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p>0,05$), 6000 U/ml konsantrasyonda anlamlı idi ($p<0,05$)(Tablo 4.4).

Rajkovic ve arkadaşlarının (26), alkolik sirozlu hastalarda yaptıkları çalışmada *S.aureus* ve *E.coli* ile fagositoz fonksiyonları araştırılmış; sirozlu hastalardan elde edilen nötrofillerin bu bakterileri fagosite etme oranlarında anlamlı düşüklük bulunmuştur. Aynı çalışmada karaciğer sirozlu hastalardan elde edilen nötrofillerin *S.aureus* ve *E.coli*'ye karşı bakterisidal aktivitesinde de sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı oranda bozulma saptanmıştır. De Fernandez ve arkadaşlarının (5), yaptıkları çalışmada alkolik karaciğer sirozlu ve primer bilier sirozlu hastaların nötrofil fonksiyonlarını, hastaların otolog serumları ve AB serum ile ayrı ayrı çalışmışlardır. Bu çalışmada otolog serum kullanıldığında, alkolik karaciğer sirozlu hastaların nötrofillerinde fagositoz oranları sağlıklı kontrollere göre düşük bulunmuş, ancak intrasellüler öldürme oranlarında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Nötrofil fonksiyonları çalışılırken AB serum kullanıldığında fagositoz oranlarında da sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Araştırmacılar bu sonuçların ışığında hastaların serumunda nötrofil fonksiyonlarını bozan inhibitör bir faktörün olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu sonuç etiyolojik faktörler farklı olmasına rağmen sadece siroz olarak ele alındığında bizim çalışmamızın sonuçlarıyla çelişmektedir. Çünkü bizim çalışmamızda hastaların otolog serumları değil AB serum kullanıldı. Böylece nötrofil fonksiyonları serumdan bağımsız olarak değerlendirildi. Buna rağmen nötrofil fonksiyonlarının bozuk olması hastalığın evresi ile ilişkili olabilir. Bu çalışmada hastaların hangi evrede olduğuna dair bir bulgu yoktur. Bizim çalışmamızda seçilen tüm hastaların dekompanse evrede olması bu farklılığı açıklayabilir. Nitekim Kirsch ve arkadaşları (67), stabil komplike olmayan karaciğer sirozlu hastaların nötrofil fonksiyonlarında bozulma olmadığını bildirmişlerdir. Fiuza ve arkadaşları (68), 11'i viral etiyolojili, 5'i alkole bağlı, 4'ü hem alkol

hem viral nedenlere bağlı ve 2'sinde etiyoloji tespit edilemeyen 22 karaciğer sirozlu hastada yaptıkları çalışmada; karaciğer sirozlu hastalarda n6trofillerin infeksiyon alanına doğru ilerleme yeteneğinin azaldığı ve in vivo ortamda bakteri fagositozunun azaldığı gözlemlenmişlerdir. Hastaların n6trofil fonksiyonları etiyolojik nedenlere göre ayrı ayrı değerlendirilmemiş fakat hastalar hastalığın evresine göre karşılaştırılmıştır. Hastaların 10 tanesi Child B, 12 tanesi Child C evresinde olan bu çalışmada fagositoz bozukluğunun karaciğer hastalığının ciddiyeti ile orantılı olduğu ileri sürülmüştür. In vivo bakteri fagositozu Child- Pugh evrelendirmesine göre evre C olan hastalarda evre B olan hastalara göre daha bozuk bulunmuştur. Bu sonuç da bizim alışmamızda AB serum kullanıldığı halde n6trofil fonksiyon bozukluğu saptanmasının hastalığın evresiyle ilişkili olabileceği tezini destekler niteliktedir.

Bizim alışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar viral hepatit B ve viral hepatit C'ye bağlı karaciğer sirozlu hastalarda n6trofil fonksiyonlarının bozulmuş olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. Daha 6nce 6zellikle alkolik sirozlarda olmak 6zere değişik etiyolojilere bağlı sirozlu hastalarda n6trofil fonksiyonlarının bozuk olduğunu g6steren çalışmalar olmakla birlikte, sadece viral hepatit etiyolojili sirozlu hastalarda yapılmış bir çalışma bulamadık. Yukarıda s6z6 edilen çalışmalardan biri olan Fiuza ve arkadaşlarının (68), çalışmasında viral etiyolojili sirozlu hastalarda çalışmaya dahil edilmiş, ancak etiyolojinin n6trofil fonksiyonları 6zerine etkisi hakkında bilgi verilmemiştir. Burada dikkat çekilmesi gereken nokta 6zellikle alkolik sirozlu hastalarda imm6niteyi bozan fakt6r6n alkole mi yoksa siroza mı bağlı olduğunun ayırt edilememesidir. 6nk6 bilindiği gibi alkol hem akut intoksikasyonda, hem de kronik alkolizmde siroz gelişmeden 6nceki d6nemde, n6trofil fonksiyonlarını ve h6cresel aracılı imm6niteyi bozar (69). Biz MEDLINE'da 1965-2003 yılları arasında "hepatitis B and neutrophil functions", "hepatitis C and neutrophil functions", "hepatitis B and G-CSF",

“hepatitis C and G-CSF”, “cirrhosis and neutrophil functions”, “cirrhosis and G-CSF” anahtar kelimeleri ile yaptığımız taramada kronik hepatit B ve C’de ve bu hastalıklara bağlı karaciğer sirozunda nötrofillerin fagositoz ya da bakterisidal fonksiyonlarının araştırıldığı bir çalışma bulamadık.

G-CSF’in kazanılmış nötrofil fonksiyon bozukluklarında kullanımı yeni bir fikir değildir. Bu konuda değişik hasta gruplarında yapılmış çalışmalar vardır. Lejeune ve arkadaşları (63), kemoterapi alan kanser hastalarının PNL’lerini 4000U/ml konsantrasyonda G-CSF ile muamele etmişler ve *S.aureus* ile *E.coli*’lerin intrasellüler öldürülmesinin anlamlı oranda arttığını saptamışlardır. Bu etkiyi G-CSF’in PNL’lerde serbest oksijen radikali üretimini artırarak respiratuar patlamayı düzeltmesi ile açıklamışlardır. Bober ve arkadaşları (53), in vitro koşullarda steroide bağlı fonksiyonları bozulmuş PNL’lerin G-CSF ile *S.aureus*’u öldürme kapasitesi ve fagositik fonksiyonlarının arttığını bildirmişlerdir. Peck ve arkadaşları (70), diabetes mellituslu olup diabetik ayak infeksiyonu gelişen hastaların PNL’lerini 50 ng/ml G-CSF ile inkübe etmiş; G-CSF uygulandıktan sonra PNL’lerde süperoksid üretiminin, bakteriyel fagositozun ve fagositik indeksin arttığını göstermişlerdir. Gough ve arkadaşları (71), ise diabetik ayak infeksiyonu olan 40 hasta üzerinde G-CSF’in in vivo etkisini araştırmışlardır. Hastaların 20’sine 7 gün boyunca G-CSF verilirken, diğer 20’sine 7 gün boyunca plasebo verilmiş ve G-CSF verilen grupta mikrobiyolojik eradikasyon ve klinik iyileşmenin anlamlı olarak daha hızlı olduğu ve hastanede yatış süresini kısalttığı bildirilmiştir. G-CSF verilen grupta tedavi öncesi nötrofillerde süperoksid üretimi önemli derecede azalmış iken tedavi sonunda süperoksid üretiminin plasebo verilen grupla karşılaştırıldığında önemli oranda artmış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Nötrofil fonksiyonundaki düzelme salgılanan süperoksid anyonunun artışına bağlanmıştır. Ohsaka ve arkadaşlarının (72), malign lenfomalı 7 hasta üzerinde

yaptıkları in vivo çalışmada G-CSF'in sadece nötrofil sayısını artırmadığını, bununla birlikte süperoksid üretimini ve kompleman reseptörlerini de artırdığını ve böylece konağın savunma sistemlerini güçlendirdiğini tespit edilmiştir. Daha önce kliniğimizde yapılan iki çalışmada da kronik böbrek yetmezlikli ve Diabetes Mellitus'lu hastaların nötrofil fonksiyonlarının bozuk olduğu ve in vitro şartlarda G-CSF'in nötrofil fonksiyonlarını düzelttiği tespit edilmiştir (73,74).

Çalışmamızda karaciğer sirozlu hasta grubunda PNL'lerin önceden G-CSF ile muamelesi sonrasında *S.aureus*'ları fagosite etme oranları, fagositik indeksleri ve intrasellüler öldürme oranları G-CSF'in artan konsantrasyonlarında doza bağımlı olarak artış gösterdi. Tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ($p<0,001$) bu artış G-CSF'in 3000U/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarında daha belirgindi. (Tablo 7).

Rolando ve arkadaşları (75), aşırı dozda parasetamol alımına bağlı akut karaciğer yetmezlikli hastaların nötrofillerini in vitro ortamda 1000U/ml ve 5000U/ml dozlarda G-CSF ile muamele etmişler ve bu nötrofillerin fagositoz, intrasellüler öldürme fonksiyonlarında önemli ölçüde artış gözlemişlerdir. G-CSF ile muamele edildikten sonra bu hastaların nötrofillerinde süperoksid ve hidrojen peroksid üretiminde artma olduğu tespit edilmiş ve intrasellüler öldürmenin artması bu etki ile açıklanmıştır. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında akut karaciğer yetmezlikli hastalarda in vivo G-CSF'in etkisini araştırmışlardır. $25\mu\text{g}/\text{m}^2$ doz uygulanan hastalarda nötrofil fonksiyonlarında düzelme gözlenmezken, 50, 100 ya da $150\mu\text{g}/\text{m}^2$ doz uygulanan hastalarda 96 saat sonra nötrofillerin *S.aureus*'u fagositozu ve intrasellüler öldürme oranlarında anlamlı düzeyde artış gözlemişlerdir. Bu dozlarda 96 saat sonra nötrofillerde süperoksid düzeyi de anlamlı olarak artmıştır (76).

Preheim ve arkadaşları (77), CCl_4 ile deneysel olarak siroz oluşturulan ratlarda *S.pneumoniae* ile pnömoni oluşturmuş ve in vivo olarak G-CSF'in bu ratlardaki etkisini araştırmışlardır. Kontrol grubu olarak *S.pneumoniae* ile pnömoni oluşturmuş sağlıklı ratlar kullanılmıştır. Daha sonra her grup ikiye ayrılmış ve yarısına G-CSF diğer yarısına %5 Dekstroz uygulanmıştır. Hem sağlıklı hem de sirotik ratlara günde 2 kez 5, 10 veya 50 μ g/kg subkutan G-CSF uygulamışlardır. Dört doz G-CSF uygulanan ratlarda uygulanmayan ratlara göre periferik kandaki PNL sayısı anlamlı olarak fazla bulunmuş ve bu artış sirotik ratlarda daha belirgin olmuştur. Her iki grupta da G-CSF uygulanan ratlarda bronkoalveoler lavaj (BAL) ile elde edilen PNL sayısında artış gözlenmiş, bu artış sirotik olmayan ratlarda istatistiksel olarak anlamlı değilken, sirotik ratlarda anlamlı bulunmuştur. Sirotik veya sağlıklı ratlarda BAL ile elde edilen PNL'lerin *S.pneumoniae*'yi fagositozunda ve fagositik indekste G-CSF uygulanan grupta hafif bir artış gözlendiği halde bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hem sirotik, hem de normal ratlarda infeksiyon gelişmeden önce G-CSF uygulaması mortaliteyi anlamlı olarak azaltmamıştır. İnfeksiyon geliştikten 2 gün sonra G-CSF uygulamasına başlanması ise sağlıklı ratlarda mortaliteyi anlamlı olarak azaltırken, sirotik ratlarda mortalite üzerine etkili bulunmamıştır.

Yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde planlanmış ve yürütülmüş çalışmalarında Nelson ve arkadaşları (78), intraperitoneal etanol uygulanan ratlarla sağlıklı ratlarda *K.pneumoniae* ile pnömoni oluşturmuş ve G-CSF'in etkisini araştırmışlardır. Ratlara 2 gün 50 μ g/kg G-CSF uygulanmış ve G-CSF uygulanan ratlarda her iki grupta da BAL ile elde edilen PNL sayısında anlamlı artış gözlenmiş, aynı zamanda G-CSF uygulanan ratlarda *K.pneumoniae*'ya karşı bakterisidal aktivitede de anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Etanol uygulanıp G-CSF verilmeyen gruptaki tüm ratlarda pnömoni oluşturulduktan sonra bakteriyemi gelişirken, G-CSF uygulanan

ratların hiçbirinde bakteriyemi gelişmemiştir. Bu çalışmada G-CSF'in mortalite üzerine etkisi de anlamlı bulunmuştur. G-CSF u uygulanmayan ratların hepsi 72 saat içinde ölürlen, G-CSF uygulanan ratlardan sadece biri ölmüştür. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir. Ancak Preheim ve arkadaşlarının (77) sonuçları ile çelişmektedir. Bu iki çalışmanın yöntemleri çok benzerdir, bu nedenle sonuçlar arasındaki çelişki siroz oluşturulan maddenin farklı olmasına bağlı olabilir. Ancak sonuçlardaki bu farklılığı tek başına bununla açıklamanın doğru olmayacağı kanısındayız. Bu nedenle bu çelişkinin nedenleri açıklanması ve G-CSF'in karaciğer sirozlu hastalarda nötrofil fonksiyonları üzerindeki etkisinin tam olarak açığa çıkmasında kontrollü insan çalışmalarına ihtiyaç olduğu açıktır.

Garcia-González ve arkadaşlarının (79), yaptıkları çalışmada sirozlu olup infeksiyon anamnezi olmayan hastalar, spontan bakteriyel peritonit geçiren hastalar ve sağlıklı kontrollerden elde edilen nötrofillerin in vitro ortamda fagositoz, fagositik indeks ve kemotaksis fonksiyonları araştırılmıştır. Fagositoz ve fagositik indeks nötrofillerin kandida hücrelerini fagosit etme oranları ve hücre başına fagosit edilen ortalama kandida hücresi olarak hesaplanmıştır. Her iki grupta da nötrofil fonksiyonları sağlıklı kontrol grubuna göre bozuk bulunmuş, spontan bakteriyel peritonit geçiren hastalarda nötrofil fonksiyonlarının göreceli olarak daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç infeksiyona cevap olarak nötrofillerin aktivasyonuna bağlanmıştır. Aynı çalışmada nötrofiller GM-CSF ile muamele edildikten sonra her iki grup hastada nötrofillerin fagositoz oranı ve fagositik indekslerinde anlamlı olarak iyileşme gözlenmiştir. Bu çalışmada karaciğer sirozlu hastaların etiyojisi ile ilgili bilgi verilmemiştir. Ancak koloni stimulan faktörlerin sirozlu hastalarda nötrofil fonksiyonlarını düzelttiğini göstermesi bakımından bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir. Daha önce de belirttiğimiz gibi karaciğer

sirozunda immün sistem bozukluğunun nedeni etiyoloji ile de ilişkili olabilir. Ancak biz kronik hepatit B ve C'nin nötrofil fonksiyonları üzerine olan etkisini gösteren bir çalışma bulamadık. Bu nedenle bizim çalışmamızın sonuçları etiyolojik faktörlerden bağımsız olarak karaciğer sirozunun nötrofil fonksiyonlarını bozan etkisini ve G-CSF'in bu hastalarda nötrofil fonksiyon bozukluğunu iyileştirebileceğini göstermektedir.

Bizim çalışmamız in vitro, kontrollü bir insan çalışmasıdır. Otolog serum kullanılmamış olması serumun muhtemel inhibitör etkisini ortadan kaldırmış olması nedeniyle bir avantajdır. Yukarıda sözü edilen akut karaciğer yetmezlikli ve diabetik ayak infeksiyonu olan gruplarda G-CSF'in in vitro ve in vivo etkilerinin benzer olması, bu çalışmada karaciğer sirozlu hastalarda G-CSF'in in vitro gösterilen etkisinin in vivo olarak mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Biz G-CSF'in viral hepatit B ve C'ye bağlı karaciğer sirozlu hastalarda bozulmuş nötrofil fonksiyonlarını iyileştirebileceğini ve böylece bu gruptaki hastalarda infeksiyonlara eğilimi azaltabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu konuda daha geniş ve in vivo çalışmalara gereksinim olduğu kanısındayız.

SONUÇLAR

Hematopoietik büyüme faktörlerinin sağlıklı insanlarda ve kazanılmış nötrofil fonksiyon bozukluğu olan hastalarda PNL'lerin fagositik ve bakterisidal fonksiyonları üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermektedir. Sonuçlar kullanılan yöntem, uygulanan sitokinlerin konsantrasyonlarına, sitokinlerle muamele sürelerine ve hedef hücrelerin türüne göre değişmektedir. Hatta yöntem aynı olsa bile farklı bakterilerin kullanımı karşılaştırma yapmayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın sonuçlarının bu faktörler göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızda:

1- G-CSF sağlıklı kontrol grubunda PNL'lerin fagositoz, fagositoz indeksi ve intrasellüler öldürme fonksiyonlarını artırdı. Bu etki istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$).

2- Karaciğer sirozlu hastaların PNL'lerinin fagositoz oranları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük idi ($p<0.001$).

3- Karaciğer sirozlu hastaların PNL'lerinin fagositoz indeksleri sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük idi ($p<0.001$).

4- Karaciğer sirozlu hastaların PNL'lerinin intrasellüler öldürme oranları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük idi ($p<0.001$).

5- G-CSF karaciğer sirozlu hastalarda PNL'lerin fagositoz oranını, fagositoz indeksini ve intrasellüler öldürme fonksiyonlarını doza bağımlı olarak artırdı. G-CSF'in bu etkisi istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$).

KAYNAKLAR

1. Ökten A. Karaciğer sirozu. Ökten A.(editör) Gastroenterohepatoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2001: 449-67
2. Iber FL. Patients with cirrhosis and liver failure are at risk for bacterial and fungus infection. Am J Gastroenterol 1999; 94(8): 2001-3
3. Takagi I, Toda G. Defects of defence mechanisms against bacterial infections in patients with liver cirrhosis. Nippon Rinsho 1994;52(2):395-9 (abstract)
4. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. Hepatology 1984;4(1):53-8.
5. De Fernandez MA, Clark A, Triger DR. Neutrophil phagocytic and bactericidal function in primary biliary cirrhosis and other chronic liver diseases. Clin Exp Immunol 1987;67(3):655-61
6. Horing E, Otto D, Von Gaisberg U. Influence of ascites on the chemotaxis of granulocytes in patients with cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol 1995;10(2):186-91
7. Brodie DH: Inflammatory cells: Structure & Function: Sites DP, Terr AL (editörler). Basic and Clinical Immunology, 7th edition; Appleton & Lange; Lebanon, 1991: 141-5
8. Stosell TP: Leukocytes phagocytosis and it's disorders. Beck WS (editör) Hematology, The MITT Press, Cambridge, 1989: 281-290
9. Fierer J, Finley F. Deficient serum bactericidal activity against Escherichia coli in patients with cirrhosis of the liver. J Clin Invest 1979;63(5):912-21.
10. Yalçın Ş, Güllü İ. H. Hematopoyetik Büyüme faktörleri: Yeni Gelişmeler ve Klinik Uygulamaları. Türk Hematoloji- Onkoloji Dergisi 1996; 6(3):156-164
11. Basu S, Dunn A, Ward A. G-CSF: Function and modes of action. Int J Mol Med 2002; 10(1):3-10

12. Matsumoto M, Matsubara S, Matsuno T, Tamuro M, Hattori K, Nomura H, Ono M, Yokota T. Protective effect of human granulocyte-colony stimulating factor on microbial infection in neutropenic mice. *Infect and Immun* 1987; 55(11): 2715-20
13. Ökten A. Türkiye’de karaciğer sirozunun etiyolojisi. *Hepatolojide Güncel Gelişmeler Sempozyum Kitabı*. Diyarbakır 1998: 67-71
14. Acar A. Karaciğer sirozu. *Çapa Gastroenterohepatoloji Günleri Kurs Kitabı*. İstanbul 2002: 122-27
15. Habib A, Bond WM, Heuman DM. Long-term management of cirrhosis: appropriate supportive care is both critical and difficult. *Postgrad Med* 2001; 109(3): 101-13
16. Hepatic Cirrhosis. Sherlock S, Dooley J. (editörler) *Diseases of the liver and biliary system*, 9th edition, Oxford, Blackwell Science 1999:357-69
17. Deschênes M, Villeneuve JP. Risk factors for the development of bacterial infections in hospitalized patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(8):2193-7
18. Wyke RJ. Bacterial infections complicating liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1989; 3(1):187-210
19. Caly WR, Straus E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18(3):353-8
20. Homann C, Varming K, Høgåsen K, Mollnes TE, Graudal N, Thomsen ÅC, Garred P. Acquired C3 deficiency in alcoholic cirrhosis predisposing to infection and increase mortality. *Gut* 1997;40(4):544-9
21. Petz LD. Variable mechanisms for low serum complement in liver disease (letter). *Lancet* 1971;2(7732):1033-4
22. Wyke RJ. Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 1987;28(5):623-41
23. MacGregor RR, Louria DB. Alcohol and infection. *Curr Clin Top Infect Dis*. 1997;17:291-315.

24. Mac Gregor RR. In vivo neutrophil delivery in men with alcoholic cirrhosis is normal despite depressed in vitro chemotaxis. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14(2):195-9
25. Van Epps DE, Strickland RG, Williams RC. Inhibitors of leukocyte chemotaxis in alcoholic liver disease. *Am J Med* 1975; 59(2):200-7
26. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986; 6(2):252-62
27. Johnson DH, Cunha AB. Infections in cirrhosis. *Infect Dis Clin North Am* 2001;15(2):363-71
28. Müftüoğlu E. Klinik Hematoloji, 3. baskı, Bizim Büro Basımevi, Diyarbakır, 1994; 201-205
29. Berk A.Ö. Atlaslı Kan Hastalıkları Tanı ve Tedavi İlkeleri. Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, 1989
30. Babior BM. Function of neutrophils and mononuclear phagocytes and disorders of neutrophil function. Wayngarden JB, Smith LH. (editörler) *Cecil textbook of Medicine*, WB Saunders Company, Philadelphia, 1992:898-904
31. Athens JW. Granulocyte-Neutrophils. Le GR, Bithell TC, Foerster J. (editörler) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lea & Fabiger. Philadelphia, 1993; 226-233
32. Curnette JJ, Babior BM, Biochemistry and function of neutrophils. Williams WS. Beutler JI, Erslev AJ. (editörler) *Hematology*. Mc Graw Hill Publishing Company New York, 1991;770-4
33. Jandi JH. Granulocytes in Hematology MIT Press . *Blood Textbook of Hematology*. Little Brown Boston / Toronto, 1987: 441-471
34. Bointon DF. Morphology of neutrophils. Williams WC, Beutler E, Erslev ADC. (editörler) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lea & Fabiger. Philadelphia, 1993: 761-769

35. Smole JE, Boxer LA. Functions of Neutrophils. Beutner E, Lichman MA, Collier BS, Kipps TJ. William's Hematology. Mc Graw Hill. New York, 1995:779-798
36. Lindemann A, Hermann F, Oster W, Hafner G, Meyenburg W, Souza LM, Mertelsmann R. Hematologic effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignancy. *Blood* 1989; 74(8): 2644-51
37. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and its receptor. *Blood* 1989; 78(11): 2791-2808
38. Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *The J Immunol* 2000; 164(9): 4783-9
39. Biet F, Loch C, Kremer L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med* 2002; 80(3):147-62
40. Parrish-Novak J, Xu W, Brender T, Yao L, Jones C, West J, Brandt C, Jelinek L, Madden K, McKernan PA, Foster DC, Jaspers S, Chandrasekhar YA. Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. *J Biol Chem* 2002; 277(49):47517-23
41. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Raymond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408(6808): 57-63

42. Cordoba-Rodriguez R, Frucht DM. IL-23 and IL-27: new members of the growing family of IL-12-related cytokines with important implications for therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3(5):715-23.
43. Dumoutier L, Renauld JC. Viral and cellular interleukin-10 (IL-10)-related cytokines: from structures to functions. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13(1):5-15
44. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, Menon S, Seymour B, Jackson C, Kung TT, Brieland JK, Zurawski SM, Chapman RW, Zurawski G, Coffman RL. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 response in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002; 169(1):443-53
45. Kawakami M, Tsutsumi H, Kamakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, Mori M, Fukushima M. Levels of granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* 1990; 76(10): 1962-64
46. Watari K, Asono S, Shirafuji N, Kodo H, Ozawa K, Takaku F, Karnachi S. Serum granulocyte colony stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by immunoassay. *Blood* 1989; 73(1):117-22
47. Wang JM, Chen ZG, Colella S, Bonilla MA, Welte K, Bordignon C, Mantovani A. Chemotactic activity of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Blood* 1988;72 (5): 1456-60
48. Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M. Granulocyte Colony-Stimulating Factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis* 1991; 163(3): 579-83
49. Mather D, Green J, Bishop R. Randomized placebo controlled trial of filgrastim in patients with febrile neutropenia following chemotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12:149a
50. Testa NG, Dexter TM. Haematopoietic growth factors: their usage in oncology. *Oncol Today* 1992; 6: 4-8
51. Groopman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors. Biology and applications. *N Engl J Med* 1989; 321(21): 1449-59

52. Hollingshead LM, Goa KL. Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Drugs* 1991; 42(2): 300-30
53. Bober LA, Grace MJ, Sivo CP, Rojas-Triana A, Waters T, Sullivan LM, Narula SK. The effect of GM-CSF and G-CSF on human neutrophil function. *Immunopharmacology* 1995; 29(2): 111-9
54. Solberg CO. Neutrophil granulocyte function in bactericidal infections. *Lancet* 1972;2(7780):727-30
55. Gillan ER, Christensen RD, Suen Y, Ellis R, Van de Ven C, Cairo MS. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor administration in newborn infants with presumed sepsis: Significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia. *Blood* 1994; 84(5): 1427-33
56. Uchida K, Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H, Yamaguchi H. Granulocyte Colony-Stimulating Factor facilitates the restoration of resistance to opportunistic fungi in leukopenic mice. *J Med Vet Mycol* 1992; 30(4): 293-300
57. Asano S. Human granulocyte colony-stimulating factor: Its basic aspect and clinical applications. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13(4): 400-13
58. Hovgaard D, Schifter S, Rabøl A, Mortansen BT, Nissen NI. In vivo kinetics of ¹¹¹Indium-labelled autologous granulocyte following i.v administration of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Eur J Haematol* 1992; 48(4): 202-7
59. Verbrugh HA, Peters R, Peterson PK, Verhoef J. Phagocytosis and killing of staphylococci by human polymorphonuclear and mononuclear leukocytes. *J Clin Pathol* 1978;31(6):539-45
60. Wiik H. Inflammatory response following abdominal surgery and its modulation by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF, filgrastim). <http://herkules oulu.fi/isbn9514268474/html/index.html> (Oulu Universitesi Kütüphanesi web alanı)

61. Root RK, Dale DC. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor: Comparison and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. *J Infect Dis* 1999; 179(Suppl 2):342-52
62. Daifuku R, Andersen J, Morstyn G. Recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor for the prevention and treatment of non-neutropenic infectious diseases. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32(Suppl A):91-7
63. Lejeune M, Sariban E, Continieaux B, Ferster A, Devalck C, Fondu P. Defective polymorphonuclear leukocyte functions in children receiving chemotherapy for cancer are partially restored by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in vitro. *J Infect Dis* 1996;174(4): 800-5
64. De Haas M, Kerst JM, Van Der Schoot CE, Calafat J, Hack CE, Nuijens JH, Roos D, Van Oers RH, Von Dem Borne AE. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* 1994 ;84(11):3885-94.
65. Allen RC, Stevens PR, Price TH, Chatta GS, Dale DC. In vivo effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil oxidative functions in normal human volunteers. *J of Infect Dis* 1997;175(5): 1184-92
66. Price TH, Chatta GS, Dale DC. Effect of Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Neutrophil Kinetics in Normal Young and Elderly Humans. *Blood* 1996;88(1):335-40
67. Kirsch R, Woodburne VE, Shephard EG, Kirsch RE. Patients with stable uncomplicated cirrhosis have normal neutrophil function. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(11):1298-306
68. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 2000; 182(2):526-33

69. MacGregor RR. Alcohol abuse, host defenses, and infection. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. Remington and Swartz. (editörler) Blackwell Science Inc.1999:853-57
70. Peck KR, Son DW, Song JH, Kim S, Oh MD, Choe KW. Enhanced neutrophil functions by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in diabetic patients with foot infections in vitro. *J Korean Med Sci* 2001; 16(1):39-44
71. Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster AV, Philpott-Howard J, Edmonds ME. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet* 1997; 350(9081):855-9
72. Ohsaka A, Kitagawa S, Sakamoto S, Miura Y, Takanashi N, Takaku F, Saito M. In vivo activation of human neutrophil functions by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1989; 74(8): 2743-8
73. Dazkır D, Bakır M, Dökmetaş İ, Elaldı N. Granülosit Koloni Stimulan Faktörün kronik böbrek yetmezlikli hastaların nötrofil fonksiyonları üzerine in-vitro etkisi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2001;35(1):99-108
74. Kulotu S. İn-vitro koşullarda Granülosit-Koloni Stimulan Faktörün Diabetes Mellitus'lu hastalarda nötrofil fonksiyonları üzerine etkisi. *Uzmanlık Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi. Sivas,2000*
75. Rolando N, Clapperton M, Wade J, Panetsos G, Mufti G, Williams R. Granulocyte colony-stimulating factor improves function of neutrophils from patients with acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12(10):1135-40.
76. Rolando N, Clapperton M, Wade J, Wendon J. Administering granulocyte colony-stimulating factor to acute liver failure patients corrects neutrophil defects. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12(12):1323-8.
77. Preheim LC, Snitily MU, Gentry MJ. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in cirrhotic rats with pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1996;174(1):225-8

78. Nelson S, Summer W, Bagby G, Nakamura C, Stewart L, Lipscomb G, Andersen J. Granulocyte colony-stimulating factor enhances pulmonary host defenses in normal and ethanol-treated rats. *Journal of Infectious Diseases* 1991;164(5):901-6

79. Garcia-González M, Boixeda D, Herrero D, Burgaleta C. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993;105(2):527-31





T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

SAYI : B.30.2.CUM.0.1H.00.00/
KONU :

04 / 03 / 2003

Karar No :

Etik Kurul Kararı : 2003 / 4

“İn vitro koşullarda G-CSF’in karaciğer sirozlu hastalarda nötrofil fonksiyonları üzerine etkisi”adlı Dr.Aytaç BİLGİÇ’e ait Tıpta Uzmanlık Tezinin Yerel Etik Kurul Kararında uygun olduğuna ;

Karar Verilmiştir.

Prof.Dr.A.Oktay IŞIK

Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ

Prof.Dr.Fahrettin GÖZE

Prof.Dr.Öge ÇETİNKAYA

Doç.Dr.Tijen KAYA

Doç.Dr.Okay BULUT

Doç.Dr.Serdar SOYDAN