

**T.C.**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN SEPSİS HASTALARINDA**  
**LENFOSİT YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN İFADELENMESİ**  
**VE SERUM SİTOKİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. FERYAL ÇETİN GÜRELİK**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. TURGUT İMİR**

**ANKARA - 2008**

**TEŞEKKÜR**

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim sırasında emeği geçen başta tez danışmanım Prof. Dr. Turgut İmir olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr.Nedim Sultan, Prof. Dr. Sevgi Türet, Prof. Dr. Semra Kuştimur, Prof. Dr. Seyyal Rota, Doç. Dr. Meltem Yalınay Çırak, Doç. Dr. Kayhan Çağlar, Doç. Dr. Ayşe Kalkancı, Doç. Dr. Gülendamar Bozdayı, Yard. Doç. Dr. Işıl Fidan, Yard. Doç. Dr. Funda Doğruman Al ve Yard. Doç. Dr. Doruk Engin'e; ve birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ; eşime ve tüm aileme teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

|                    |    |
|--------------------|----|
| KISALTMALAR        | 3  |
| ŞEKİLLER           | 8  |
| GİRİŞ ve AMAÇ      | 10 |
| GENEL BİLGİLER     | 13 |
| GEREÇ VE YÖNTEMLER | 46 |
| BULGULAR           | 52 |
| TARTIŞMA VE SONUÇ  | 65 |
| ÖZET               | 84 |
| İNGİLİZCE ÖZET     | 86 |
| KAYNAKLAR          | 88 |
| ÖZGEÇMİŞ           | 99 |

**KISALTMALAR**

|           |  |
|-----------|--|
| SIRS      | Systemic inflammatuar response syndrome                                      |
| HIV       | Human Immunodeficiency virus   |
| TNF       | Tumor necrosis factor  |
| IFN       | İnterferon   |
| IL        | İnterlökin   |
| Th        | T helper,yardımcı T hücresi  |
| CD        | Cluster of differentiation   |
| LPS       | Lipopolisakkarit   |
| ACCP/SCCM | American Collage of Chest Physicians ve Society of Critical Care<br>Medicine |
| ESICM     | The European Society of Intensive Care Medicine                              |
| ATS       | The American Thoracic Society  |
| SIS       | The Surgical Infection Society   |
| CDC       | Centers for disease control  |
| ABD       | Amerika Birleşik Devletleri  |

|        |   |
|--------|---|
| AIDS   | Acquired immunodeficiency syndrome                  |
| SOAP   | the Sepsis occurrence in the acutely ill patients   |
| NNIS   | National nosocomial infectious surveillance system  |
| RES    | Retikuloendotelial sistem                           |
| CRP    | C reaktif protein                                   |
| PCT    | Prokalsitonin                                       |
| CI     | Cardiac indeks,kalp indeksi                         |
| DM     | Diabetes mellitus                                   |
| PIRO   | Predisposition,Infection,Response,Organ dysfunction |
| TNM    | Tumor,Node,Metastase                                |
| NO     | Nitrik oksid  |
| EAA    | Endotoksin Activity Assay                           |
| MIF    | Macrophage Migration Inhibitory Factor              |
| TREM-1 | Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1):  |
| LBP    | Lipopolisakarit binding protein                     |
| TLR    | Toll Like Receptor                                  |
| DNA    | Deoksiribonükleik asit                              |

|                 |   |
|-----------------|---|
| RNA             | Ribonükleik asit                                  |
| NK              | Natural Killer                                    |
| PRR             | Pathogen Recognition Receptors                    |
| PAMPS           | Pathogen Associated Molecular Patterns            |
| TIR             | Toll/IL-1 reseptör                                |
| MyD88           | Myeloid Differansasyon primer response protein 88 |
| PAI-1           | Plasminogen Activator Inhibitor 1                 |
| TRAF            | Tumor necross factor Receptor Associated Factor   |
| PMNL            | Polimorfonükleer lökosit                          |
| FDA             | Food and Drug Administiration                     |
| NF kB           | Nükleer Faktör kappa Beta                         |
| L-Selektin      | Leucoside selektin                                |
| P-Selektin----- | Platelet selektin                                 |
| E-Selektin----  | Endotelial selektin                               |
| ICAM            | Intracellular Adesion Molecule                    |
| PGN             | Peptidoglikan                                     |
| LTA             | LipoTeikoik Asit                                  |

|         |   |
|---------|---|
| PAF     | Platelet Activation Factor                                      |
| PLA-2   | Phospholipase A-2   |
| ARDS    | Adult Respiratory Distress Syndrome                             |
| LDL     | Low Density Lipoprotein   |
| LGL     | Large Granular lymphocyte                                       |
| MHC     | Major Histocompatibility Complex                                |
| Tc      | Cytotoxic T cell, sitotoksik T hücresi                          |
| TCR     | T cell receptor   |
| LTB4    | Leukotrien B4   |
| DIC     | Disseminated Intravascular coagulation                          |
| CARS    | Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome                 |
| HDL     | High Density Lipoprotein  |
| VLDL    | Very Low Density Lipoprotein                                    |
| PROWESS | Human Activated PROtein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis |
| HMGB-1  | High Mobility Group Box-1                                       |
| NOS     | Nitric Oxide Synthase   |
| Treg    | T regulatory, düzenleyici T hücresi                             |

|      |   |
|------|---|
| TXA2 | Tromboksan A2   |
| GITR | Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor |
| TGF  | Transforming Growth Factor                            |
| AIM  | Activation Inducer Molecule                           |

## ŞEKİLLER

|  |    |
|--|----|
| Şekil 1 Akım sitometri cihazından alınan ölçüm örnekleri       | 50 |
| Şekil 2 Hücre yüzeyinde CD3 ifadenmesi                         | 56 |
| Şekil 3 Hücre yüzeyinde CD4 ifadenmesi                         | 57 |
| Şekil 4 Hücre yüzeyinde CD8 ifadenmesi                         | 57 |
| Şekil 5 Hücre yüzeyinde CD19 ifadenmesi                        | 58 |
| Şekil 6 Hücre yüzeyinde CD14 ifadenmesi                        | 58 |
| Şekil 7 Hücre yüzeyinde CD3 <sup>-</sup> CD16/ CD56 ifadenmesi | 59 |
| Şekil 8 Hücre yüzeyinde CD4/CD25 ifadenmesi                    | 59 |
| Şekil 9 Hücre yüzeyinde CD4/CD69 ifadenmesi                    | 60 |
| Şekil 10 Hücre yüzeyinde CD8/CD69 ifadenmesi                   | 60 |
| Şekil 11 Hücre yüzeyinde TLR2 ifadenmesi                       | 61 |
| Şekil 12 Hücre yüzeyinde TLR4 ifadenmesi                       | 61 |
| Şekil 13 Serum TNF- $\alpha$ düzeyleri                         | 62 |
| Şekil 14 Serum IFN- $\gamma$ düzeyleri                         | 62 |
| Şekil 15 Serum IL-1 $\beta$ düzeyleri                          | 63 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| Şekil 16 Serum IL-2 düzeyleri  | 63 |
| Şekil 17 Serum IL-6 düzeyleri  | 64 |
| Şekil 18 Serum IL-10 düzeyleri | 64 |

## GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis, enfeksiyonla birlikte sistemik enflamatuvar yanıt sendromunun ( SIRS) varlığıdır (18,24,104).Ağır sepsis ve septik şoklu hasta sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu durum insanların daha uzun süre yaşamasına, agresif kanser tedavisine bağlı gelişen immünsupresif durumların artmasına, hastalara uygulanan girişimsel yöntemlerin artmasına ve HIV pozitif hasta prevalansının artışına bağlıdır( 31,88).

Sepsis epidemiyolojisi ile ilgili son yıllarda oldukça geniş kapsamlı ve önemli çalışmalar yapılmıştır.Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular sepsis morbidite ve mortalite oranlarının ve yoğun bakım enfeksiyonlarının artmakta olduğunu göstermiştir. Sepsis ,günümüzde yoğun bakımlardaki en sık ölüm sebeplerinden biridir.Elde edilen bu veriler klinisyenler tarafından ürkütücü bulunmaktadır (7,10, 87,99).

Sepsiste ölüm oranı; inme ve akut myokard enfarktüsüne bağlı ölüm oranlarından çok daha fazladır(67,109). Bunun en önemli nedenlerinden biri, sepsisin kompleks bir patofizyolojiye sahip olması ve oldukça karmaşık bir tablo olarak kendisini göstermesidir.<sup>55</sup> Sistemik enflamasyonun işaret ve semptomları enfeksiyon ya da enfeksiyon dışı SIRS' da farklı değildir.Ayrıca her zaman sepsisli hastalardan bakteriyel patojen izole edilemeyebilmektedir( 59,97,98,116). Sepsis belirleyicilerinin bir çoğu özgül olmayıp diğer bir çok enfeksiyon/enfeksiyon dışı durumda da mevcut olabilir. Bu nedenle sepsis tanısında gecikmeler olabilmekte ve hastaların tedavisi çoğunlukla, yoğun bakım ünitesine yatış öncesi, bu hastalığın belirti ve bulgularına aşına olmayan hekimler tarafından başlatılabilmektedir. Sepsis tanısında özgül belirleyicilerin olmaması ve bu konuda çok fazla gelişme yaşanmaması da tanıda sıkıntılara yol açmaktadır (88).

Sepsiste enfeksiyon odağı çoğunlukla solunum sistemi (ventilatörle ilişkili pnömoni), abdomen veya üriner sistemdir. Kateterler de enfeksiyon odağı oluşturabilmektedir. Sepsiste enfeksiyon %90 oranında bakterilere bağlı iken özellikle immün sistemi baskılanmış olan hastalarda diğer etkenlere bağlı olarak da görülebilmektedir(25,99). Bu nedenle mikrobiyolojik tanı önemlidir. Mikrobiyolojik tanı öncelikle uygun antibiyotik tedavisi başlayabilmek için şarttır. Uygun olmayan antibiyotik tedavisi ölüm oranını artırmaktadır. Ayrıca lokal epidemiyolojik verileri saptamak, direnç paternlerini tahmin edebilmek ve buna göre ampirik tedaviyi planlamak açısından da mikrobiyolojik tanı gereklidir. Ancak enfeksiyon odağını tesbit etmek çoğu zaman zordur(88,104).

Sepsis patogeneğinde; nötrofiller, monosit- makrofaj serisi gibi immün hücrelerin veya endotel, epitel gibi parankimal hücrelerin aktivasyonu temel nokta olarak rol oynamaktadır (19,20,104,110).

Enfeksiyona yeterli immün yanıt doğal ve monosit, T hücresi ve nötrofil cevabını içeren özgül immün sistem arasındaki etkileşimi gerektirir. Son yıllarda sepsiste immunopatofizyoloji konusundaki çalışmalar özellikle T hücreleri üzerine yoğunlaşmıştır(53). Sepsiste organizmada görülen hemodinamik, metabolik ve immün değişiklikler; hücreler arası sinyal iletilişinde rol alan mediyatörler ve sitokinler aracılığı ile olmaktadır. Sitokinler etkilerini sadece sistemik dolaşıma karışarak değil, direkt hücre- hücre ilişkisi ile ve çok küçük konsantrasyonlarda da ortaya koymaktadır(104).

Aktive olmuş T hücreleri sitokin salınımına programlıdır. T hücreleri bunu iki antagonistik profil ile yaparlar. Bu özelliklerine göre T lenfositleri ya enflamatuvar özellikteki TNF-  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 gibi sitokinleri salgılayan Th1 hücreler ve ya antiinflamatuvar özellikte IL-4, IL-10 gibi sitokinleri salgılayan Th2 hücreleri olarak ikiye ayrılır. CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin Th1 veya Th2 cevaplarını belirleyen faktörler bilinmemekle birlikte bunların enfeksiyona

neden olan bazı patojen tipleri, bakteri inokülasyonunun düzeyi ve enfeksiyonun odağı gibi özelliklerden etkilendiği sanılmaktadır (5,72).

Sepsiste doğal immün yanıtın kontrolsüz bir şekilde aktivasyonu ile makrofaj, endotel ve epitel hücrelerinin lipopolisakkarit (LPS) gibi bazı bakteriyel ürünleri özgül reseptörleriyle tanımları sitokin zincirinin tetiklenmesiyle (TNF- $\alpha$ ,IL-1,IL-12,IL-18,IFN- $\gamma$ , IL6 ,IL-8) sonuçlanır (5,19,20,72).

Sepsiste patofizyolojik açıdan bazı değişimlerin söz konusu olduğu düşünülmektedir. Sepsiste patofizyolojinin artık tek başına artmış veya kontrolden çıkmış sistemik bir yanıt olmaktan çok öte olduğu açıkça görülmektedir. Bu yeni bakış sepsiste sistemik yanıtla birlikte patojeni ortadan kaldıramayan ciddi bir immün yetersizlik mekanizmasının olduğunu düşündürmektedir(37).

Patofizyolojik süreçte yaşanan bu gelişmeler hastanın genetik polimorfizmine, hastalığın süresine ve patojen karakterine bağlı değişebilen immün cevap üzerinde geliştirilen sağ kalımı artırıcı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır (37) .

Sepsis modern yoğun bakım ünitelerinin en önemli morbidite ve mortalite nedenlerindedir. Destekleyici tedaviler ve güçlü antibiyotiklere rağmen etkilenen hastalarda %30-70 oranında ölüm ile sonuçlanmakta, yaşayanlarda ise yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir.(12,52,84,116)Tedavi stratejilerinin etkin bir şekilde kullanılabilmesi için ise erken tanı zorunludur.

İnsanların immün ve enflamatuvar hastalıkları için yeni terapötiklerin geliştirilmesinin temel amaçlarından biri hücre yüzey reseptörü veya hücre içindeki yolakları hedefleyerek immün yanıtların modüle edilmesidir. Yakın gelecekte sepsis basitçe enfeksiyonun klinik bulgu ve belirtileri ile tanımlanmayacak daha çok aktive olan genler, moleküller ve hücre içi etkileşimlere dayandırılacaktır. Bu nedenle sepsiste fizyopatolojinin immünolojik temelini bilmek önemlidir.

Bu çalışmanın amacı sepsis hastalarında oluşan immunolojik değişiklikleri incelemektir. Bu nedenle hastalardan alınan periferik kan örneklerinden lenfositlerin izolasyonu ve daha sonra lenfosit yüzey belirteçlerine bakılması ve serum sitokin düzeylerinin ölçülerek kontrol grubu olan sağlıklı kişilerden alınan kan örnekleriyle karşılaştırılması hedeflenmiştir.

## **GENEL BİLGİLER**

### **1- Tarihçe**

Sepsis kelimesi Hipokrat tarafından tıbbi literatüre sokulan, o zamanlar hastalığa veya ölüme neden olan doku yıkımını tanımlamak amacıyla kullanılmış eski Yunan kökenli bir kelimedir. Sepsis tanımı eski Yunanca'da çürüme anlamına gelen kelimedenden gelmektedir. Çünkü uzun süre bu sendrom doku bozulması ve çürümesi ile ilişkilendirilmiştir. (87)

19.yüzyılda mikroorganizmanın tanınmasından ve pütrefikasyona yol açtığı öğrenilmesinden sonra bakterilerin neden olduğu ve kanda bakterilerin görüldüğü, dokunun mikroorganizmalar tarafından işgali ile eş anlamlı olarak algılanmaya başlanmıştır.

1970' li yıllarda çoğunlukla septisemi terimi kullanılarak sepsis ile ilgili çok fazla sayıda çalışma yapılmış ,bakteriyel endotoksinin; kompleman, kinin ve koagülasyon sistemi gibi bir çok humoral yolağı etkilediği belirlenmiştir.

1980' li yılların başlarında erken dönem ölümlerinin çok fazla olması, sepsis tanımı yerine gram negatif bakteriyemi tanımının ön planda olması, epidemiyolojik çalışmaların yetersizliğinin günümüze oranla daha fazla olması nedeniyle tanımlar üzerinde belirli bir fikir sağlanamamıştır. Bu nedenle sepsis, sepsis sendromu ve septik şok için belirtilen mortalite oranları büyük değişiklikler göstermiştir.

1986' da Marshall tarafından sepsiste çoklu organ yetmezliğine gidişte gastrointestinal kanalın rolü önemsenmiştir.1990' da sepsiste sonucu, enfeksiyonun değil konak yanıtının belirlediği ilk kez ileri sürülmüş; Bone, Sibbald ve Sprung tarafından terminolojide birlik sağlanması için yoğun çalışmalar başlatılmıştır. (110)

1990' ların başında sepsiste konağın pasif olmadığı, endojen enflamatuvar mediyatörlerin organ hasarlanmasındaki rolleri, non enfeksiyöz tetiklenmelerle de aynı enflamatuvar yanıtın ortaya çıkabildiği ve enfeksiyon eradike edilse bile klinik yanıtın sürebildiği ortaya konmuştur.

Günümüzde ise konağın yanıtının ön planda olduğu tanımlamalar yapılmaya çalışılmaktadır(80).

1991 yılında American Collage of Chest Physicians ve Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) tarafından sponsorluğu üstlenilen bir uzlaşma toplantısı yapılmıştır. Bu toplantıda sepsis ve sepsisle ilişkili diğer kavramlar tekrar tanımlanmıştır.

Daha sonraki yıllarda sepsis ile ilgili yeni tedavi yöntemlerinin gündeme gelmesi ve patofizyolojinin daha iyi aydınlatılması gereği nedeniyle klinisyenlerin bir çoğu 1992 yılında yayımlanan uzlaşma toplantısı tanımlamalarının yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini savunmuşlardır. Bu gereksinim nedeniyle SCCM /ACCP The European Society of İntensive Care Medicine (ESICM), The American Thoracic Society (ATS) ve The Surgical Infection Society (SIS) tarafından 2001 yılında Uluslararası Sepsis Tanımlamaları toplantısı yapılmıştır(63) .

## **2-Tanımlar (63)**

Sepsis, her geçen gün patogenezi, fizyopatolojisi, tanı ve sağaltım yöntemlerindeki buluşlara karşın bugün hala önemini koruyan enfeksiyona bağlı ölümcül bir hastalıktır.

Sepsisi tam olarak açıklayabilmek için mikroorganizmaların konakçı dokuyu istila etmesiyle meydana gelen bulaşmadan SIRS (systemic inflamatuvar response syndrome)' a kadar değişen çeşitli tanımlanmaları ortaya koymak gerekecektir.

Sepsisteki gelişmelerin sürekliliği yapılan tanımlarda da değişikliklere neden olmuştur. Belli başlı olanların tanımı şöyledir;

**-Enfeksiyon;** patojen mikroorganizmaların kanda bulunmasına veya normalde steril olan dokulara girişine karşı verilen enflamatuvar yanıttır.

**-Bakteriyemi;** kan dolaşımında bakterinin bulunmasına denir. Konağın enfeksiyona sistemik cevabı ve enflamatuvar mediyatörler, sitokinler, vazoaktif ajanların etkisi ile RES (retiküloendotelyal sistem) aktivasyonu sonucu bakteriyemi genellikle geçici olmaktadır.

**-Septisemi;** önceleri mikroorganizmaların ve ya toksinlerin kanda bulunması olarak tanımlanmış ise de tüm patojen organizmaların tamamını yeterli tarif etmediğinden bugün kullanılmamaktadır.

**-Enflamasyon;** vücudun her hangi bir yerinde yaralanmaya sebep olan etkenleri yok edici, sınırlayıcı ve bölgeyi yeniden yapılandıran bir işlemdir.

Uzun süre sepsis ve ilişkili tablolar tanımlanırken kavram kargaşası sürmüştür. Sepsis klasik bir tıp sözlüğünde septisemi ile belirtilmekte "bakteri ve bakteri toksinlerinin kana geçmesi sonucu olan ateş ve titreme ile belirgin durum" olarak tanımlanmıştır. Ayrıca aynı maddede fungal septisemi tanımı yer almakta ve "patojen mantarların kana geçmesi" olarak ifade edilmektedir.

1992 yılında ACCP ve SCCM nin düzenlediği bir konsensus toplantısından sonra Bone ve arkadaşları sepsis tanımlarını yayınlamışlardır. Bu konferansın amaçları sepsis ağır sepsis ve septik şok arasındaki farkları aydınlatmak, klinik çalışma dizaynının dahil edilme kriterlerini belirleyerek homojen populasyonların çalışma protokollerini almasını sağlamaktır. Uzlaşma konferansı tanımlarına göre;

**-SIRS:** Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu aşağıdakilerden iki veya daha fazlasının varlığı olarak tanımlanmıştır.

1-Vücut sıcaklığı >38C veya <36 C

2-Kalp tepe atımı >90/dk

3-Dakika solunum sayısı >20

4-Lökosit sayısı  $>12000$  veya  $<4000$  ya da immatür hücre oranı  $>10\%$

**-Sepsis:** SIRS ile birlikte pozitif kültür sonucu ile dökümanite edilmiş bir enfeksiyonun varlığı olarak tanımlanmaktadır. Kültür negatif ise klinisyenin enfeksiyon varlığını öngörmesi ve/veya aşağıdakilerden birisinin varlığı :

1-Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (20 ml/kg/20 saat)

2-Hiperglisemi ;Glukoz  $>120$ (Diabetes Mellitus yok iken)

3-Enflamasyon belirteçleri;CRP  $>2SD$ ,prokalsitonin  $>2SD$

4-Karışık venöz satürasyon

5-Kardiak indeks;CI $>3,5L/dk/m$

**-Ağır sepsis;** Sepsis ile birlikte organ disfonksiyonu, hipoperfüzyonu bulguları veya hipotansiyon varlığıdır.

**-Septik şok:** Yeterli sıvı takviyesine rağmen sepsis kaynaklı hipotansiyon ve hipoperfüzyon bulguları şeklinde tanımlanmıştır.

Günümüzde hastaların immünolojik durumlarını içeren bir terminoloji henüz sepsis tanımında yerini almamakla birlikte; bu konudaki gelişim immünoenflamatuvar durumu kapsayan tanımların terminolojiye girmesi yönündedir. PIRO konsepti bunun ilk adımı olarak değerlendirilebili(27).

2001 yılında ACCP/ SCCM konferansında; sepsisli hastaların değerlendirilmesinde ve prognozlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere kanser hastalarında kullanılan TNM sistemine benzer bir evrelendirme sistemi kullanılması önerilmiştir. Bu sınıflama kısaca **PIRO** olarak adlandırılmıştır(62)

**-P(predisposition):** Hastada önceden var olan risk faktörlerini işaret etmektedir. Önceden var olan faktörler, sepsiste sonucu değiştirmektedir ve tedavi planlanırken bunlar da dikkate alınmalıdır. Hastanın önceki sağlık durumu, kullanmakta olduğu ilaçlar ve alışkanlıkları sepsis seyrini etkilemektedir. Yakın zamanlı veriler, genetik yapının sepsiste

prognozu önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle, gelecekte genetik yapı da evrelendirme sisteminde yer alabilir.

**-I(infection):** Enfeksiyon varlığını ve yaygınlığını değerlendirmektedir. Enfeksiyonun yeri, tipi ve yaygınlığının prognoza önemli etkisi vardır. Örneğin ağır pnömoni veya intraabdominal enfeksiyona sekonder sepsiste prognoz; üriner sistem enfeksiyonuna bağlı sepsise nazaran daha kötüdür. Sekonder nozokomiyal bakteriyemiye bağlı sepsiste primer bakteriyemi veya katater ilişkili bakteriyemiden daha kötü prognoz mevcuttur. Benzer şekilde, sorumlu mikroorganizmanın özellikleri de önemlidir.

**-R(response):** Hasta yanıtının ciddiyetini belirtmektedir. Prokalsitonin veya sitokinlerin, yanıtın ciddiyetini belirleyebilecekleri düşünülmektedir.

**-O(organ dysfunction):** Tutulan organ sayısı veya skorlama sistemleri ile belirlenmektedir.

İleride hücre düzeyinde etkilenmelerin de (apoptozis, hücrel hipoksi) sınıflamaya girebilecekleri düşünülmektedir.

### 3- Mikrobiyal epidemiyoloji

Mikrobiyal epidemiyoloji ile ilgili bilgilerimizin kısıtlı olmasının en önemli sebeplerinden biri, olguların sadece %60' ının bildirili olmasıdır(66).

Her ne kadar epidemiyolojiyi belirlemek amacıyla bazı uluslararası ve çok merkezli çalışmalar yapılsa da bazen yerel farklar olabilmektedir. Bu farklar hastaneler arasında olabildiği gibi bir hastanenin yoğun bakım üniteleri arasında da farklı olabilir. Örneğin yoğun immünsupresif tedavinin uygulandığı transplantasyon ünitelerinde mantara bağlı sepsis daha sık görülmektedir(66).

Mikrobiyal epidemiyolojide sepsisin kaynaklandığı odak da oldukça önemlidir(66). Ciddi sepsise neden olan enfeksiyonların dört ana kaynağı vardır. Bunlar solunum yolları, karın, üriner sistem ve primer bakteriyemi olarak sıralanabilir Bunlar ciddi sepsis kaynaklarının %75'ini oluşturur(25,99). Yapılan araştırmalar enfeksiyon kaynağı ve etken

mikroorganizmanın, mortalite ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Alt solunum yolları ve intraabdominal enfeksiyonlardan kaynaklanan sepsiste mortalite oranının en yüksek olduğu tesbit edilmiştir(25,99,85).

Centers for Disease Control (CDC) tarafından Amerika Birleşik Devletlerinde 1990 yılında gerçekleştirilen geniş çaplı bir araştırma sonucunda 1979 yılında 100000 hastada 73.6 olan sepsis insidansının 1989 yılında 175.9 a yükseldiği tesbit edilmiş,insidansın artış nedeni olarak HIV /AIDS hastalarının artması, invazif girişimlerin çoğalması ve daha çok sepsis tanısı koyulması düşünülmüştür. Aynı çalışmada sepsis mortalite oranının %31 den %25.3'e düştüğü belirlenmiş, bu sonuç desteleyici bakım ve farmakolojik tedavideki gelişmelere bağlanmıştır(30,10,95,112,42).

Angus ve arkadaşları tarafından 2001 yılında ABD'de altı milyon hastane raporunun analiz edildiği çalışmada bir yıl içinde 751.000 vakada ciddi sepsis olduğu, mortalite oranının %28.6 vaka başına ortalama maliyetin ise 22.100 dolar olduğu saptanmıştır(10,30,42,95,112).

European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) tarafından 2002 yılında yoğun bakım hastalarında sepsis ve septik şok insidansını araştırmak üzere bir çalışma başlatılmıştır. SOAP (the Sepsis occurrence in the acutely ill patients ) çalışması olarak isimlendirilen bu araştırmada tek olarak etiyolojik, diyagnostik, terapötik ve prognostik parametreler değerlendirilmiştir. Toplam 24 ülkedeki 198 yoğun bakım ünitesinde izlenen 3147 hasta (%62 erkek ortalama yaş 61) hastaneden taburcu edildiği gün veya öldüğü güne kadar takip edilmiştir.SOAP çalışmasının sonuçları tanısal ve terapötik standartların ülkeler ve yoğun bakımlar arasında çok önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur(10,30,42,95,112).

Bu toplantıda etkenlerin oranları %40 gram pozitif bakteriler, %38 gram negatif bakteriler, %17 mantarlar(candida), %18 karışık olarak bildirilmiştir(32,48).

Mevcut verilere göre sadece Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 750000 yeni vaka tesbit edilmektedir. Sepsis insidansı ile ilgili oranlar arasındaki farklılıkların nedenleri; çalışmalarda kullanılan metodların farklı olması, ciddi sepsis tanısı alan hastaların yoğun bakımlara kabul kriterlerinin hastaneler arasında farklılık göstermesi, çalışmaya dahil edilen hastalarda yandaş hastalıkların farklı olması veya genetik farklılıklar olabilir(66,78,88).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda önemli bir çok enflamatuvar molekül kodlayan genlerde polimorfizm tesbit edilmiş, TNF geninde bulunan TNF2 polimorfizminin mortalite oranını artırdığı belirlenmiştir.

Septik şok insidasının bayan hastalarda daha düşük olması TNFB2 tek nükleotid polimorfizmi olan erkek hastalarda mortalite oranının TNFB1 taşıyanlardan yüksek olması da genetik çalışmalar sonucu elde edilen verilerdir(64,74,106).

Sepsisin mikrobiyal epidemiyolojisinde son 20 yılda içinde çok önemli değişiklikler olduğu dikkat çekmektedir. Bunun en önemli nedeni, özellikle nozokomiyal epizodlarda gram pozitif organizmaların görülme oranındaki artıştır. Gram pozitif organizmalarda görülen artışın nedeni katatere bağlı enfeksiyonlar ve primer bakteriyemilerdir. Sonuç olarak bakteriyemik epizodlarda gram pozitif mikroorganizmalar gram negatiflerin önüne geçmiştir(%55-%45)( 25,66,85).

Septik süreci başlatan mikrobiyolojik etkenlerin bilinmesi, sepsis fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi yanında olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde de önemlidir

#### **-Sepsiste mikrobiyal ajanlar**

Sepsiste klinik durum etken olan mikrobiyal faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Gram negatif sepsis olgularının çoğundan *Enterobacteriaceae* ailesi (*E.coli*, *Klebsiella*) ve *Pseudomonas aeruginosa* sorumludur. Gram pozitif koklardan da en çok stafilokoklar ve streptokoklar izole edilir.Tüm sepsis olgularının %5'inden mantarlar ve en çok *Candida*'lar sorumludur(17).

Gram negatif sepsiste: enfeksiyon kaynağı en çok; akciğerler, karın, kan dolaşımı ya da üriner sistem olmaktadır. Gram negatif bakteri duvarının parçası olan lipopolisakarit, gram negatif sepsis patogenezinde ana rolü oynamaktadır. Gram negatif sepsisten en sık sorumlu olan mikroorganizmalar sırasıyla *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *Klebsiella*) ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır(104).

Gram pozitif sepsisin ise çoğundan stafilokoklar (*Stafilococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklardır) ve streptokoklar (*Streptococcus pyogenes*, viridans streptokoklar, *Streptococcus pneumoniae*) sorumludur. Gram pozitif sepsiste enfeksiyon odağı en sık deri, yumuşak doku, damar içi kateterlerin uçları, solunum sistemi, kan dolaşımıdır. Gram pozitif mikroorganizmalar hücre zarı kökenli parçalar olan ve süper antijen gibi davranan peptidoglikan, teikoik asit, lipoteikoik asit gibi ekzotoksinleri üretirler Bu yapılar gram pozitif mikroorganizmaların oluşturduğu sepsiste patogeneze sorumludurlar(104).

1980'li yıllardan itibaren sepsiste etken olarak izole edilen mikroorganizmalar gram negatif bakterilerden gram pozitif bakterilere doğru kaymıştır(34,66,104).

Gram pozitif bakteriyemilerin sebep olduğu sepsislerin mortalitesi, gram negatif bakterilerle kıyaslandığında eşit ya da biraz daha fazladır(99).

NNIS 1992 ile 1997 yılları arasında koagülaz negatif stafilokokların kandan en sık izole edilen mikroorganizmalar olduğunu bildirmiştir(93). Koagülaz negatif stafilokoklardan sonra ise Enterokoklar ve *Staphylococcus aureus*'un en sık izole edilen mikroorganizma olduğu bildirilmiştir. En sık enfeksiyon odağı akciğer olmakla birlikte bunu karın ve üriner sistem takip etmektedir.(59) Enfeksiyonun odağı klinik durumu oldukça etkilemektedir. Örneğin ciddi sepsis gelişiminde nozokomiyal pnömoni en önemli risk faktörüdür.. Aynı şekilde karın içi enfeksiyonu, polimikrobiyal bakteriyemi, post operatif yara yeri enfeksiyonu ve bakteriyemisi olanlarda ciddi sepsis gelişimi açısından yüksek riskli gruplardır. Damar içi kataterler ve üriner katater nedeniyle oluşan bakteriyemilerde ağır sepsis gelişimi riski daha

düşüktür. Nozokomiyal pnömoni ve üriner sistem enfeksiyonlarından çoğunlukla gram negatif bakteriler sorumludur. *Staphylococcus aureus* da hastane kaynaklı pnömonilerde oldukça sık olarak izole edilir. *Pseudomonas aeruginosa* , özellikle immünsupresif hastalarda sıklıkla karşımıza çıkan *Candida albicans* ya da çoklu ilaç direnci olan *Enterococcus faecium* da artmış mortaliteyle ilişkilidir(65,114).

Hastaların %20-30' unda yoğun tanısal incelemeye rağmen belirgin bir enfeksiyon odağı tesbit edilememiştir. Plevra, periton boşluğu ya da paranazal sinüs enfeksiyonlarının çoğunluğu, kolaylıkla gözden kaçırılabilir. Sepsisli hastaların sadece %30-50' sinde kan kültürünün pozitif olması septik şok gelişimi için kan dolaşımı invazyonun şart olmadığı bir göstergesidir(116,59,98,97). Septik şok bazen enfeksiyon dışı enflamatuvar bozukluklarda da gelişebilmektedir. Örneğin akut pankreatitli hastalarda önemli biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler olur ve mortalite oranları mikrobiyal ajanların sebep olduğu sepsislerle hemen hemen aynıdır(89).

#### **4- Sepsise İmmün Yanıt(51,96)**

**-Mikrobiyal ürünlere karşı gelişen doğal yanıt;** Enfeksiyona karşı ilk savunma hattını; deri, mukus, silyalı epitel, mide asidi ve safra gibi doğal bariyerler oluşturur. Eğer bu bariyerler bozulur veya ajan başka bir yolla içeri girerse ateş, interferon, kompleman, doğal öldürücü hücreler(NK, natural killer hücreleri), nötrofiller, makrofajlar gibi hızlı lokal yanıt oluşturan, antijene özgül olmayan doğal immün sistem devreye girerek kazanılmış immün yanıtta önce enfeksiyonu sınırlandırmaya çalışır. Bu nedenle bakteriye ait ürünlerin erken dönemde tanınması; sağ kalım için kritik öneme sahiptir. Konağın doğal immün sistem hücreleri yüzeylerinde bulunan ve patern tanıyıcı reseptörler (PRR-pattern recognizing receptors) adı verilen reseptörler sayesinde vücuda giren mikroorganizmaları tanıma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle doğal immün sistemin, dokulardaki bakteriyel ürünleri hem

tanıma hem de bakterilerin vücuda giriş yerlerine fagositleri çekerek onlarla savaşı başlatma yani bir efektör fonksiyonu mevcuttur.

İmmünite; vücuda dışardan giren enfeksiyöz ajanlar ve bunların dışındaki her türlü yabancı maddeyi ve hatta mutasyonlara bağlı olarak organizma içinde oluşan tümör hücrelerini de tanıma ve yok etmeye programlanmıştır. Bu nedenle de immün sistemin temel işlevi organizmanın kendisine ait olan (self) ve kendisine ait olmayan (non self) yabancı molekülleri tanıması ve kendisine ait olmayana ortadan kaldırmasıdır. İmmün sistem vücudun içinde oluşan tehlikeli sinyalleri tanıyarak bunlara yanıt oluşturur. Bu moleküllerin çoğu patojeniktir. Bununla birlikte doğal immün sistem patojenik moleküllerin dışında patojenik olmayan moleküller ve kommensal bakterileri de tanımakta ve mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da patojenlerden gelen sinyalleri diğer kommensallerden gelenlerden ayırt etmektedir.

Doğal immün sistem tarafından tanınan bu moleküller patojenle ilişkili moleküler patternler (PAMPS)(pathogen associated molecular patterns) olarak adlandırılırlar. Mikrobiyal patojenlerin bu molekülleri, mikroorganizmaların yaşaması için gerekli temel yapılarıdır, major mutasyona uğramazlar ve memelilerde bulunmazlar. Her mikroorganizmanın sınırlı sayıda PAMPS'ı vardır. PAMP; gram negatif bakterilerde endotoksin adı da verilen LPS 'den, gram pozitif bakterilerde peptidoglikan ve lipoteikoik asitlerden, mikobakterilerde glikolipitlerden, mayalarda mannanlardan ve virüslerde RNA' lardan oluşur. Bu moleküler yapılar, konakçının makrofajları ve endotel hücreleri gibi hücrelerinde bulunan ve sitokin ifadenmesi yapan özgül patern tanıma reseptörlerini (PRRs) veya patern tanıyan çözünebilir moleküllerini aktive ederler.PRR;hücre dışında ya da fagositik hücre zarına bağlı olarak dolaşımda bulunan protein yapılarıdır.'

Patern tanıma reseptörleri alt gruplara ayrılır. Bunlar-(48)

### **1-Toll benzeri reseptörler (TLR, toll like receptor)**

**2-Çöpçü reseptörler(scavenger receptor):** modifiye LDL'nin,bazı polisakkarit ve nükleik asitlerin bağlanmasında rol oynar.Bakterinin içeri alınmasında ve apoptozise giden hücrelerin fagositozundan sorumludur.

**3-Opsoninler :**Mikrop yüzeyine bağlandıklarında fagositozu kolaylaştırırlar.Opsonin reseptörleri fagositik hücre yüzeyinde bulunur.Bu işleme opsonizasyon denir.

Sepsis immünopatogenezindeki artan öneminden dolayı TLR'den detaylı olarak bahsedilecektir.

**Toll benzeri reseptörler (TLR, toll like receptor)** sinyal iletiminde görev alırlar. Molekül *Drosophila melanogaster*' deki Toll proteini ile homolog olduğundan "Toll like"- "Toll benzeri" olarak isimlendirilmiştir.PAMP 'ın PRR ile bağlanmasının ardından TLR aracılığı ile çekirdeğe sinyaller iletilir.Bunun sonucunda antimikrobiyal etkisi olan sitokinler ve diğer molekülleri kodlayan genler aktifleşir.Ardından enflamatuvar sitokinlerin sentezi ve sekresyonu gerçekleşerek,lökositler enflamasyonun olduğu bölgeye çekilir(48).

Günümüzde TLR' ler 1' den 10' a kadar tanımlanmış olup hepsinin bir şekilde immun cevapta yer aldığı gösterilmiştir(40).

TLR-2, TLR -3,TLR-4,TLR-5 ve TLR-9 mikrobiyal elemanların tanınmasında yer alır. TLR-4' ün, gram negatif bakterilerdeki LPS'nin tanınmasında görev aldığına dair önemli veriler mevcuttur. TLR-2, peptidoglikan (PGN) ve lipoteikoik asit (LTA) gibi gram pozitif bakterilerin hücre duvar elemanlarını,. TLR-3; viral çift sarmal RNA 'yı tanır. TLR -5; bakteriyel flagellini, TLR-9; bakteriyel CpG DNA'yı tanır. Diğer tanımlanan TLR 'den TLR-1, TLR-2'nin *N. meningitidis*'in hücre duvar elemanlarını tanınmasında aksesuar reseptör olarak görev alır(9).

Hücresinin mikrobiyal elemanlar tarafından uyarılması; CD14 (myeloid hücrelerde) ve/veya sCD14 (endotel ve epitel hücrelerinde)'ün varlığına bağlıdır. CD14 monosit, makrofaj ve granüositlerde hücre yüzeyinde; serumda ise çözünür formda bulunur. LPS ve

LPS bağlayıcı protein kompleksine bağlanır.LPS ile başlatılan makrofaj aktivasyonu için gereklidir.(9)TLR aracılı sinyal iletiminde sCD14' ün fonksiyonu tam olarak belirtilmemiştir. İnsan TLR-4 'ü 841 aminoasitten oluşan molekül ağırlığı 92KD olan bir proteindir. TLR-2 ise 85 KD ağırlığındadır. CD14 ve TLR' nin yapısal olarak en büyük benzerliği; hücre dışı domainlerinde lösinden zengin bir tekrar bölgesi (LLR-leucine rich repeat) içermeleridir. CD14 ve TLR 4 bu LLR kalıntılarından 10 veya 21 adet içerirler. Bu sebeple her ikisinde de LPS bağlayan bölgenin benzer olduğu düşünülmüştür. TLR-4 ün aksine CD14 ün bağlanma bölgesi LRR nin sadece bazı bölümünü içerir. CD14 ile kıyaslandığında monosit üzerindeki TLR-4 reseptörlerinin sayısı oldukça azdır. Her bir molekül başına 115,000 CD14 molekülü varken, 1300 TLR-4 molekülü mevcuttur. Bu durum TLR-4 ifadenmesinin LPS'ye cevapta önemli bir sınırlayıcı faktör olabileceğini göstermektedir.

TLR' lerin ifadenme şekilleri oldukça farklıdır. TLR-1 in kopyaları hemen hemen tüm myeloid ve lenfoid hücrelerde yer alırken ,TLR-3 mRNA' sı ise sadece belirli miktarlarda NK hücrelerinde bulunur. TLR-2 ve TLR-4 'ün ifadenmeleri karşılaştırıldığında. durağan fazda polimorf lökositlerde, monositlerde, makrofajlarda ve dendritik hücrelerde buldukları görülmüştür(104). Her ikisi de epitel hücreleri ve endotel hücrelerinde ifadenmekle birlikte, TLR-2 aynı zamanda hepatositlerde de ifadenir.TLR-2 ve TLR-4' ün ifadenme seviyesi LPS ve diğer mikrobiyal bileşenlerle kontrol edilir.. TLR-4 yüksek duyarlılıktaki bir sinyal yolunun elemanıdır. Bu nedenle bu reseptörün yokluğunda LPS ye azalmış cevap ya da gram negatif bakteriye artmış duyarlılık beklenir. TLR'nin direkt doğal immünitede rolü olduğu kadar kazanılmış immünitenin gelişiminde de rolü vardır.

Tüm bu veriler incelenecek olduğunda TLR'ler farklı mikrobiyal komponentlerin birbirinden ayrımında önemli role sahiptir(9).

Kompleman sistemi; büyük kısmı karaciğerde sentezlenen ; kan ve hücre dışı sıvıda bulunan 20'den fazla proteini içeren bir sistemdir. Kompleman aktivasyonu;iki aşamalı

gerçekleşir.İlk önce C3 parçası oluşur bunu membran atak kompleksi denilen protein yapının oluşumu izler.Kompleman aktivasyonunda en kritik nokta C3 ün klasik ya da alternatif yoldan parçalanması basamağıdır.Bu protein yapı hedef üzerinde bir delik oluşturur ,bu delikten hücre içine su ve iyonlar girer ve hücre parçalanır. Komplemanın C5a parçası enflamatuvar döngünün en güçlü mediyatörüdür.

Kompleman yolunun başlıca görevleri kompleman aracılı lizis ile direkt hücreyi öldürmek,opsonizasyon yaparak fagositozu kolaylaştırmak ve immün cevabı arttırmaktır..Bunu da antijen sunumunu artırıp,T hücre aktivasyonu,Bhücre aktivasyonu ,antikor cevabı ve immünolojik hafızayı uyararak yapar(104).

Enfeksiyona yol açan mikroorganizmanın çoğalmasının önlenmesi ve takiben de tamamen ortadan kaldırılabilmesi için immün sistemin güçlü olması ve mikroorganizma ve ürünlerine karşı gelişen immün yanıtların sıkı bir şekilde düzenlenmesi zorunludur. Aksi takdirde temel amacı organizmayı mikroorganizmalara ve diğer yabancı ajanlara karşı korumak olan immün mekanizmalar iyi kontrol edilemez ya da immün ve enflamatuvar yanıtlar bir denge içinde tutulmazsa mikroorganizmalar aşırı derecede çoğalabilir veya vasküler kollaps ve doku hasarı sonucu çoklu organ yetmezliği gelişebilir. Kısaca temel hedefi organizmayı korumak olan immün yanıtın kendisi de konağa hasar verebilir(101).

**-İmmün hücreler ve immünoenflamatuvar yanıtta rolleri:** İmmün sistem organizmayı enfeksiyöz ajanlara veya yabancı maddelere karşı koruyan hücrelerarası sinyal ileti mekanizmalarının en gelişmiş olduğu sistemdir. İmmün sistem yanıtları doğal ve kazanılmış immun yanıt olarak ikiye ayrılmaktadırlar.

**-Nötrofiller:**

Doğal immünitelerde temel hücre tipidir. Patojenik mikroorganizmaların tanınmasında ve yok edilmesinde kemotaksi, fagositoz ve sitotoksik ürünlerin salıverilmesi gibi yanıtlar aracılığı ile işlev görmektedir. Sözü edilen antimikrobiyal yanıtların başlatılmasında, nötrofillerin

hücre yüzey belirteçleri ile mikrobiyal hedefte veya enflamatuvar ortamda bulunan özgül ligandlar arasında etkileşim önem taşımaktadır. İskemi/reperfüzyon, sepsis, akut akciğer hasarı, akut respiratuvar distress sendromu gibi enflamatuvar süreçlerin yoğun olarak tetiklendiği durumlarda ise tersine lökositlerin rol aldığı fizyolojik yanıtlar organizmanın kendisine zarar verdiği patolojik yanıtlar halini alabilmektedir(26,104).

Sepsis patogeneğinde de immünoenflamatuvar yanıtta ön planda yer alan nötrofillerin işlevlerini sıralayacak olursak;

1-Adezyon: Dolaşımdaki nötrofillerin enfekte dokuya ulaşabilmeleri için damar dışına çıkmaları gerekmektedir. Bunun için birinci adım vasküler endotele adezyonlarıdır. Adezyon, nötrofillerdeki integrinler, L selektin ve endotel hücrelerindeki E-selektin, P-selektin ve ICAM-1 ve ICAM-2 gibi adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Adezyon moleküllerinin ifadelenmesindeki artış ortamda tetiklenen enflamatuvar süreçle ilişkilidir.

Adezyon; patojene verilecek cevap açısından çok önemlidir. Griensven ve arkadaşları ICAM-1 defektif farelerde oluşturdukları sepsis modelinde mortalitenin ve sitokin salınımının azaldığını göstermişlerdir. Ancak henüz elimizde anti ICAM-1 tedavisinin insanlarda sepsis mortalitesini azalttığına ile ilgili bir gelişme bulunmamaktadır.(44)

2-Kemotaksis: Damar dışına çıktıklarında nötrofillerin, kemoatraktan bir gradient doğrultusunda doğrudan enflamasyon ve enfeksiyon alanlarına yönelmesi kemotaksis olarak isimlendirilmektedir. Protrüzyon, adezyon, kontraksiyon ve adezyonun sonlanması sikluslar halinde tekrarlanmakta ve nötrofillerin hareketi sağlanmaktadır. Sepsisli hastalarda nötrofil kemotaksisi azalır(104).

3-Fagositoz: Nötrofil membranında invajinasyon ve 3 mikrometreden büyük partiküllerin alımı ile fagositoz işlemi başlamakta ve mikrobiyal öldürme nötrofillerin içinde gerçekleşmektedir. Mikrobiyal patojenleri tanımda özgül karbonhidrat, glikolipid ve glikoproteinlerden oluşan patojen ilişkili PAMPS tanımlanmıştır. Ayrıca patojen ajanları

opsonize eden antikorlar ve komplemanlara karşı da 'fagositik reseptörler' denen reseptörler de vardır. Opsonizasyon; fagozitoz işlemine fonksiyonellik kazandırması açısından çok önemlidir.

4-Mikrobiyal öldürme; mikrobiyal öldürme fagozom ve fagolizozom gibi özelleşmiş birimlerde gerçekleşerek, organizmanın zarar görmesi en aza indirgenmektedir. Aktive olmuş nötrofiller; NADPH oksidaz aracılığı ile süperoksid ve hidrojen peroksid gibi oksidanları üreterek öldürme işlevini gerçekleştirmektedirler. Sözü edilen oksidanlar, myeloperoksidaz varlığında hipohalöz asite dönüşerek daha da güçlü antimikrobiyal bir özellik kazanmaktadır. Ortamda fazla miktarlarda yer alan süperoksidin nitrik oksid ile birleşmesi, çok daha toksik olan peroksinitrit formasyonu ile sonuçlanmaktadır. Deneysel modellerde sözü edilen enzimlerin baskılanması veya indirek yollarla serbest oksijen/nitrojen türevlerinin oluşumunun önlenmesi ile doku hasarlanmasının önlendiğini gösterilmiştir. Oksidatif olmayan öldürme mekanizmaları içerisinde ise; fagozomun asidifikasyonu, lizozim, laktoferrin, elastaz gibi proteaz ve defensinler sayılabilir. Ayrıca nötrofiller; platelet aktive edici faktörler (PAF), lizofosfotidilkolin ve prostoglandin gibi araşidonik asit derivelerinin üretilmelerinde rol oynayan fosfolipaz A2 (PLA2) enzimini içerir. Tanısı sepsis olan ve akciğer tutulumunun da tabloya eşlik ettiği hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj sıvılarında PLA2 aktivitesinin artmış olarak saptanması, akciğer hasarının patofizyolojisinde PLA2 enziminin rolüne işaret etmektedir. Deneysel sepsis modellerinde de PLA2 inhibisyonunun akciğer hasarlanmasını azalttığı da gösterilmiştir(9,104).

Nötrofiller mikrobiyal öldürmede ve adezyonda rol alan azurofilik (primer) granüller spesifik (sekonder) granüller, jelatinaz (tersiyer) granüller, sekretuvar veziküller olmak üzere dört çeşit hücre içi granül içermektedir.. Myeloperoksidaz eksikliğinde fırsatçı kandida enfeksiyonları; NADPH oksidaz ekikliğinde ise katalaz pozitif *Stafilococcus aureus* enfeksiyonlarının sıklıkla ortaya çıktığı kronik granülamatöz hastalık gözlenmektedir.

5-Enflamatuvar mediyatörlerin sekresyonu: Nötrofiller organizmada sinyal iletide yanıt veren konumlarının yanı sıra enflamasyonun regülasyonunda IL-1,IL-6,IL-8 ve TNF  $\alpha$  gibi sitokinlerin yapım ve saliverilmelerinde yer alarak temel rol oynarlar. Nötrofil kökenli proteazlar da substratların işlenmesinde ve kemotaktik peptidlerin saliverilmesinde işlev görmektedir.

6-Apoptozis: Apoptozis olarak adlandırılan programlanmış hücre ölümü nötrofillerin öldürme fonksiyonlarında doğrudan yer almasa bile son dönemde enflamasyondaki rolleri nedeniyle nötrofil işlevleri arasında tanımlanmaktadır. Doku hasarlanmasının tehdit oluşturduğu durumlarda nötrofil apoptozisi abartılı enflamatuvar yanıtın önlenmesinde fizyolojik olarak en önemli rolü üstlenmektedir. Örneğin; ARDS'nin (Adult Respiratory Distress Syndrome) başlangıcında nötrofil apoptozisinin geciktiği ve sonuçta uzamış enflamasyonla karakterize tablonun ortaya çıktığı gösterilmiştir(21,34,55,101).

#### -Mononükleer fagositer hücreler

Kanda, monosit tüm dokularda ise, makrofaj olarak bulunurlar. Sepsis patogenezinde immunoenflamatuvar yanıtta ön planda yer alan monosit-makrofaj serisinin işlevlerine baktığımızda organizmaya giren patojenlerin tanınmasında ve ortadan kaldırılmasında makrofajların fagositoz, sekresyon aktivitesi ve mikrobiyal öldürme gibi işlevleriyle temel rol oynadıkları görülmektedir.. Doku homeostazı ve yenilenmesinde de yer alan doku makrofajları asıl olarak, immün sistemin ilk savunma mekanizmasını oluştururlar(101,104).

Sepsiste patojen ajanın tanınmasında, sitokinlerin ve mikrobisidal maddelerin üretilmesinde, kemotaksisin uyarılmasında makrofajlardaki farklı yüzey reseptörleri işlev görürler. Bunlar arasında mannoz reseptörleri, çöpçü (scavenger) reseptörler, opsonin için reseptörler, yedi  $\alpha$  helikal transmembran/G protein kenetli reseptörler ve Toll benzeri reseptörlerdir. Mannoze reseptörleri ve çöpçü reseptörler patojen mikroorganizmalara bağlanmada ve hücre içine alımlarında rol oynamaktadır. Mannoze reseptörleri, makrofaj

lektin olarak, patojen mikroorganizmanın hücre duvarında yer alan glikoprotein ve glikolipitlerin mannoz ve fukoz kalıntılarına bağlanırlar. Glikoproteinler ve glikopeptidler terminal sialik asit veya N-asetil galaktozamin içerdiklerinden makrofajlar mannoz reseptörleri aracılığı ile mikroorganizmaları tanıırken, konağın kendi hücrelerini tanımazlar(18).

### -Lenfositler

Kandaki lökositlerin %20'sini lenfositler oluşturur. Ancak bu oran total lenfositlerin sadece %1'ini yansıtır. Yaşamlarının büyük bölümü dokularda geçer. Lenf dokularındaki hücrelerin %99'unu lenfositler oluşturur. Çoğu lenfosit, lenf bezleri, timus, Peyer plakları ve dalak gibi organlarda bulunur. Her saat başı lenfositlerin yaklaşık %1-2 'si yeniden dolaştırılır. Böylece antijene özgül lenfositlerin uygun antijenle karşılaşma olasılığı artırılır. Yeniden dolaşan lenfositler lenf dokularına geçerek burada yerleşir ve lenfatik yol ile tekrar dolaşıma katılır.

Lenfositler B, T ve NK hücreleri olmak üzere üç ana gruba ayrılır. NK hücrelerinde antijen reseptörleri bulunmaz.

### -B Lenfositler

Dolaşımdaki lenfositlerin %5-15'ini oluşturan B lenfositler, temel olarak periferik lenfoid organlarda bulunur. Normalde yaşam süreleri 4-8 hafta arasında değişir. B lenfositler fetal karaciğer, daha sonra kemik iliğindeki hücrelerden köken alır. Dolaşımdan özellikle dalak ve lenf bezleri olmak üzere sekonder lenfoid dokulara geçerler. B lenfositler plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretir.

B lenfositlerin gelişimi olgunlaşma, aktivasyon ve farklılaşma olmak üzere üç evreye ayrılabilir. Olgunlaşma dönemi kemik iliğinde geçer ve bu dönemde antijen ile karşılaşma yoktur. B lenfositler kemik iliğinde antijen ile karşılaşmadan önce Ig genlerini yeniden

düzenler. Kendi antijenlerini bağlayan reseptörlere sahip B lenfositler kemik iliğinde ölür. Kemik iliğinde kendi antijenlerini bağlamayan B lenfositler buradan ayrılabilir.

#### -T Lenfositler

Sekonder lenf dokularına yerleşmeden önce timusta gelişip farklılaşan lenfositlerdir. Çok uzun ömürlü olduklarından dolaşımdaki lenfositlerin %70-80'ini oluştururlar. T lenfositleri immünolojik belleğin çoğundan ve makrofajlarla birlikte hücresel bağışık yanıtta sorumlu temel hücrelerdir.

Çoğu proteinleri CD (cluster of differentiation veya cluster determinant-küme belirleyen) kısaltması ardından numaralandırma ile belirtilir. T lenfositler taşıdıkları belirleyici (marker) tiplerine göre CD4<sup>+</sup> veya CD8<sup>+</sup> olmak üzere iki alt populasyona ayrılır. CD4 taşıyan yardımcı T lenfositler (T helper, CD4<sup>+</sup> Th) immün yanıtı başlatır veya yardım eder. Sitotoksik T lenfositler (cytotoxic T, CD8<sup>+</sup> Tc) ise CD8 taşır.

- NK(Natural killer,doğal katil hücreler) hücreleri:Hücre içi mikroorganizmalar karşı,enfekte hücreleri öldürerek ve makrofajı aktive eden sitokin olan IFN - $\gamma$ 'yı salgılayarak etki eder.NK lar dolaşımdaki ve periferik lenfoid organlardaki lenfositlerin %10 unu oluşturur. NK hücrelerinde antijen reseptörleri bulunmaz(3,101).

**-Sitokin yanıtı :** Sitokinler sepsis ve septik şoku oluşturan immün yanıtta anahtar role sahiptirler. Sepsiste görülen hemodinamik, metabolik ve immün değişiklikler hücreler arası sinyal iletide rol alan mediyatörler ve sitokinler aracılığı ile olmaktadır. Küçük sinyal proteinleri olan sitokinler, genellikle salındıkları hücre üzerinden doğrudan (otokrin) ya da salındıkları hücre çevresindekilere (parakrin) etkilidir. Sitokinler doğal ve kazanılmış bağışık yanıtı kontrol etmede, yangısal tepkimelerde, enfeksiyonlara karşı savunmada, T ve B lenfositlerin çoğalıp farklılaşmasında rol oynarlar. Sentezinde uyarı gerektiren sitokinler antijen için özgül olmamakla birlikte belirli bir fonksiyonun aktivasyonuna ve baskılanmasına

yol açabilir. Kendi aralarında agonist ve antagonist etkileşimde bulunabilirler. Genellikle serumda bulunmayan sitokinler oluşturuldukları hücrenin hemen yakınında ya da hücrenin üzerinde belirli reseptörlere bağlanarak etkili olurlar(5,104).

Th cevabı Th1 ve Th2 cevabı olmak üzere iki grupta gerçekleşir. Bu cevap salgılanan sitokinlere göre sınıflandırılır(Th1 hücreleri IL-12, IL-15, makrofajlar ve dendritik hücrelerden antijen sunumu ile aktive olurlar. Th1 hücreleri tarafından salınan sitokinler TNF $\alpha$ , IL-1, IFN $\gamma$ , IL-12, IL-15 gibi proenflamatuvar özellikteki sitokinlerdir(72).

Th1 hücreleri bu sitokinler aracılığı ile mikobakteriyel, viral ve mantar enfeksiyonlarının kontrolü için enflamatuvar cevabı uyarırlar. IgM üretimini ve komplemanla birleşebilen spesifik Ig G alt sınıflarının üretimini artırır. Th yanıtı genellikle enfeksiyonun erken evresinde lokal bir yanıt olarak meydana gelir; enflamatuvar sitokinlerden IFN  $\gamma$ , IL-2, IL-12' nin üretimlerinin artışı ve antifungal efektör hücrelerin makrofaj ve PMNL uyarılması ile birliktelik gösterir. Bu hücrelerin salgıladığı sitokinler ,Th2 tarafından üretilen IL-10 gibi sitokinlerle inhibe edilir(101).

Th2 yanıtı; lenf nodlarında antijenin B hücreleri, dendritik hücreler veya makrofajlarla sunulması sonucu genellikle geç gelişen bir bağışık yanıtıdır(72). Th2 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler de; B hücre farklılaşması, immunoglobulin sınıf seçimi, hafıza B hücreleri ve plazma hücrelerinin oluşumunu uyarmaktadır. Th2 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler; IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$  gibi antiinflamatuvar özellikteki sitokinlerdir. Th2 hücreleri IL-4 ile uyarılırken IFN $\gamma$  ile baskılanmaktadır(19,20,71,90). Bu grup sitokinler Th1 yanıtının gelişimini inhibe eder ve fagositik efektör hücrelerin aktivasyonunu engeller. Th2 yanıtının yüksek olması, konakçının ilerleyici tarzda enfeksiyona maruz kaldığının göstergesidir.

Sitokinler etkilerini sadece sistemik dolaşıma karışarak değil, direk hücre –hücre ilişkisi ile ve çok küçük konsantrasyonlarda da göstermektedir. Sepsiste makrofaj, endotel ve

epitel hücrelerinin lipopolisakkarit veya metillenmemiş CpG DNA fragmanları gibi bakteriyel ürünleri spesifik reseptörleriyle tanımları sitokin kaskadının tetiklenmesiyle (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin salınmasıyla sonuçlanmıştır.

Sitokinler arasındaki sinerjistik etkileşimler doku zedelenmesine yol açabilir. Mikrobiyal toksin gibi bir enfeksiyöz ya da enflamatuvar uyarıcı makrofajları uyarır ve fazla miktarlarda TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 salınımına yol açar. TNF $\alpha$  sepsis patofizyolojisinde en önemli rolü olan ,erken dönemde salgılanan bir sitokindir. TNF- $\alpha$  aracılığı ile olan doku hasarı nötrofiller tarafından sağlanır. Nötrofillerden elastaz, süperoksid iyon, hidrojen peroksid, , PAF, LTB<sub>4</sub>, TXA<sub>2</sub>, IL1, prostoglandin, elastaz ve kolajenaz salınımını ve sentezini uyarır, nötrofillerin transendotelial migrasyonunu sağlar ve endotelial mikrovasküler hücreleri aktive eder ve PAF ve IL-8 salgılanır. IL-1 ve TNF sinerjistik olup, aynı biyolojik etkilere sahiptir. Bunların inhibe edilmesi hayvan sepsis modellerinde mortaliteyi azaltmıştır. IL-6'nın rolü tartışmalıdır. Bazı bilimadamları IL-6'yı anti-enflamatuvar sitokin olarak kabul eder ancak IL-6 nötrofillerden elastaz salınımını artırarak nötrofillerin sitotoksik potansiyellerini artırır. IL-6 salınımı, TNF ile azaltılır. IL-6 diğer sitokinlerle beraber salındığında toksik olmaktadır. IL-8 nötrofil kemotaktik bir sitokin olup, doku enflamasyonunda yer almaktadır(82).

Deneyisel sepsis modellerinde sitokin fırtınasının yani immün sistemin aşırı uyarılmasının ölüme yol açtığı gösterilmiş ve anti sitokin antikorların tedavide mortaliteyi azalttığı saptanmıştır. Oysa klinik çalışmalar bu olguyu desteklememiş ve örneğin meningokoksemi gibi bazı formların dışında sepsiste sitokinlerin yüksekliği ile mortalite arasında korelasyon bulunamamıştır. Sepsis patofizyolojisinde sitokin fırtınası ile ilgili orijinal saptamanın klinikte tam anlamıyla geçerliliğinin olmaması çok önemlidir(33,75).

Deneyisel ve klinik çalışmalarda TNF $\alpha$  antagonistlerinin mortaliteyi artırdıklarının, sadece bazı subgruplarda tedavide yararlı olabileceklerinin gösterilmesi sitokinlerin yararlı etkilerinin olabileceğini ön plana çıkarmaktadır.

Aslında organizmada bir dengenin varlığı ve bu bağlamda doğal sitokin antagonistlerinin olduğu bilinmektedir. Bunların en önemlisi glikokortikoidler olup TNF $\alpha$  ve IL-6'nın mRNA transkripsiyonlarını inhibe ederek etkili olmaktadır. Deneyisel sepsis modellerinde verilmiş zamanına göre etkileri değişebilmektedir. Diğer sitokin antagonistleri içinde sitokinlerin çözünür reseptörleri önemli yer tutmaktadır. Sitokinlerin hücre yüzeyinde bağlandıkları reseptörleri çözünür olup kana karışabilmektedirler. Bu reseptörler için en önemli olan, TNF $\alpha$ 'dır. Kanda sitokinle karşılaşan bu çözünür reseptörler bloke edici işlev görmektedir. Ancak bu işlevlerini ancak yüksek konsantrasyonda olduklarında gerçekleştirirler. IL-1 reseptör antagonistleri ve IL-10'nun kendisi de doğal sitokin antagonistleridir. Öte yandan son yıllarda sitokin toleransından dokuların sitokinlerin tekrarlayan dozlarına dirençli hale geldiklerinden ve toleransın mekanizmasında endojen lipoproteinlerin rolünden bahsedilmektedir(9,79).

### **5-Sepsis patofizyolojisi**

Sepsis enfeksiyonla tetiklenen bir sendromdur. Enfeksiyona karşı normal cevap farklı ve karmaşık bir takım immunolojik olayları içerir. Mikrobial enfeksiyona karşı cevapta immün yanıt çoğu zaman koruyucu olsa da septik şok çoğu zaman , , mantar virus ve bakteriyel toksinlere karşı artmış ya da kontrol altında tutulamayan yanıtta kaynaklanır. Bu kontrolsüz yanıt sonucunda bir takım endojen enflamatuvar mediyatörler salınarak organizmaya daha da zarar verir. Kısaca sepsiste immün yanıt;var olan enfeksiyona karşı konakçının aşırı ve düzensiz yanıtı olarak tanımlanabilir(19,20,21,82).

Septik şokun patogeneğinde pek çok mekanizma yer alır. Bunlar sitokin salınımı, nötrofil, monosit ve mikrovasküler endotel hücre aktivasyonu, nöroendokrin refleksler,

plazma protein zincirlerinin aktiflenmesi (kompleman sistemi, koagülasyonun intrinsik ve ekstrinsik yolları) ve fibrinolitik sistemdir. Kritik hastalarda gastrointestinal sistem septik şok patogenezinde çok önemli rol oynar(104).

İmmün sistemi zayıf kimseler sepsis açısından risk altındadır ancak sepsiste hastanın ölümüne yol açan da çoğu kez enfeksiyona karşı immün sistemin abartılı yanıtıdır(101). Bakteri ya da bakteriyel komponentlerle karşılaşma sonucu bir takım hücreler aktive olur ve enflamatuvar mediyatörler örneğin; sitokin, kemokin, prostaglandin, lipid mediyatörler ve reaktif oksijen radikalleri salınır. Bu bileşikler; vazodilatasyona, adezyon moleküllerinin artmasına ve bunun sonucunda nötrofil, monosit ekstravazasyonuna sebep olur. –

Son yıllarda sepsis fizyopatolojisinin aydınlatılmasında en önemli gelişme koagülasyon kaskadının sepsis sürecindeki öneminin anlaşılmasıdır. Sepsiste sitokinler koagülasyonu tetikleyici bir etki gösterir. Bu tür hastalarda koagülasyon bozukluklarına sık rastlanır Hastaların %30-50 'sinde dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) gibi ileri dönem koagülasyon bozuklukları görülür. Koagülasyon yolları, mononükleer ve endotel hücrelerindeki doku faktörü; LPS ve diğer mikrobiyolojik ürünler tarafından aktive edilir. Doku faktörü daha sonra bir dizi proteolitik kaskadı aktive eder ve protrombini trombine çevirir ve nihayetinde fibrinojenden fibrin oluşumuna neden olur. Eş zamanlı olarak normal fibrinolitik mekanizmalarda da bir yetmezlik söz konusudur. Böylece küçük kan damarlarında fibrin tıkaçlar oluşur, yetersiz doku perfüzyonu ve organ yetmezliği gelişir. Özellikle IL-1 ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinler güçlü bir şekilde koagülasyonu tetikler. IL-10 monositlerden doku faktörü salınımını inhibe ederek koagülasyonu düzenler. Sepsiste koagülasyonu tetikleyici diğer bir neden de antitrombin, protein C ve doku faktörü gibi doğal olarak vücutta var olan antikoagülanların azalmasıdır. Bu doğal antikoagülanlar, pıhtılaşmayı baskılamaları yanında antiinflamatuvar özellikleri ile de dikkati çeker.

Tüm bunlar çoğunlukla sepsisin öldürücü aşamaya geçerek çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanmasına sebep olur. Ayrıca yaygın damar içi koagülasyonun sebep olduğu hipoperfüzyon barsaktaki mukozal bariyere zarar verir ve bakterilerin mezenterik lenf nodlarına geçmesine sebep olur. Yer değiştiren bakteriler dolaşıma karışarak pek çok organa ulaşırlar ve prognoz daha da kötüleşir(18,101,104).

Gram pozitif ve gram negatif bakterilere alınan cevapta anlamlı farklılıklar vardır. Tüm gram negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkarit (LPS) immün yanıtın ana hedefidir. Gram pozitif bakterilerde ise ekzotoksin yapısında hücre duvarında pek çok immunojen yapı bulunmaktadır. Gram negatif bakterilere karşı cevapta lökositler, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 yer almaktadır. Gram pozitif bakteriler tarafından salınan ve çoğu süperantijen olan ekzotoksinler ise T hücrelerini aktive ederek pek çok değişik sitokin profilinin oluşmasına yol açar. IL-8 ,seviyesi artarken, TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6 seviyeleri azalır(9).

Klinik bulguların ortaya çıkışı genellikle sinsidir. Ateş, bilinç bulanıklığı geçici hipotansiyon, idrar miktarında azalma veya nedeni açıklanamayan trombositopeni şeklinde ortaya çıkabilir. Eğer gerekli önlemler alınmaz veya tedavi edilmezse solunum yetmezliği, böbrek yetmezliği, koagülasyon bozuklukları ve tedaviye yanıtız hipotansiyon gelişebilir.

Sepsise neden olan enfeksiyonlar genellikle; pnömoni, intraabdominal nedenler, üriner sistem enfeksiyonu ve bakteriyemidir(25,99). Ancak olguların yaklaşık yarısında mikrobiyolojik etken izole edilebilmektedir(59,97,98,116).

Son yıllarda özellikle apoptozis, nöroendokrin refleks, metabolik ve genetik farklıların sepsis patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir(104).

**-Apoptozis;** genetik olarak programlı hücre ölümüdür. Proteazların aktivasyonu ile hücrede ve çekirdekte dejenerasyon,yoğunlaşma, DNA degradasyonu, hücre kalıntısının fagositozu ile hücre ortadan kalkar. Septik sürecin patogeneğinde ve gelişiminde çok sayıda lenfosit ve gastrointestinal epitel hücrelerinin apoptozisinin yer aldığı bilinen bir gerçektir.

Endojen glikokortikoidlerin salınımı, lenfosit apoptozisinden sorumlu olabilir. Artmış apoptozis T, B, NK hücre popülasyonundaki azalmaya sekonder olarak immün baskılamaya katkıda bulunur. Tüm bunlar sekonder fırsatçı enfeksiyonlara ve çoklu organ yetmezliği gibi komplikasyonlara zemin hazırlar(21,34,55).

**-Nöroendokrin refleks;** immün kökenli sitokinlerden özellikle IL-1, TNF  $\alpha$  ve IL6 LPS'ye karşı nöroendokrin ve metabolik yanıtı başlatır. Ateş, hipotalamopitüiter adrenal aks, kemik iliğinin ve lökositlerin uyarılması karaciğerde akut faz proteinlerinin yapılması, katabolizma, kas proteinlerinin yıkılması akut faz yanıtının parçalarıdır. Özgül immüneyi uyaran hormonlar, sepsis sırasında ya normal ya da daha düşük seviyede bulunurlar(104).

**-Genetik yatkınlık:** Son yıllarda sepsisle ilgili en önemli gelişmelerden biri enfeksiyona enflamatuvar yanıtta bireysel farklılıklarda genetik özelliklerin ve polimorfizimlerin öneminin ortaya çıkmasıdır.. Tek baz çifti değişiklikleri tek nükleotid polimorfizmi, örneğin TNF reseptör, IL-1 reseptör, IL10 reseptör, Fc- $\gamma$  reseptör genleri gibi, mikroorganizmalar karşı enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde genlerin etkili olduğu görülmüştür. Sitokin genlerindeki polimorfizm enflamatuvar ya da anti enflamatuvar sitokin üretimini ve konsantrasyonunu etkileyebilir. Bunun sonucunda hasta artmış ya da azalmış enflamatuvar yanıt verir(59,74,106).

TNF  $\alpha$  ve  $\beta$  genleri IL-1, IL-6, IL-10, CD14, MD-2, ACE, mannoz bağlayıcı lektin, ısı şok proteinleri, TLR-2, TLR-4, PAI-1, faktör 5 ve kaspas-12'yi içeren çeşitli genetik polimorfizimlerin enfeksiyonlara yatkınlık ve septik şoklu hastalarda mortalite artışı ile ilişkili olduğu saptanmıştır.Genetik faktörlerin sepsis fizyopatolojisinde rolünün anlaşılması ile bireysel korunma ve tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi mümkün olacaktır.

**-Metabolik değişiklikler;** sepsiste hastanın metabolik profili oldukça ciddi bir şekilde etkilenmektedir. Sepsise metabolik yanıtta ilk olarak; vücudun karbonhidrat, yağ ve protein depoları yıkılmaya başlar. Bu duruma ‘‘septik otokanabalizm’’ denir. Bu metabolik

değişiklikler TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi enflamatuvar sitokinler aracılığı ile gerçekleşir. Sitokinler tarafından katekolamin, kortizol ve glukagon indüklenmesi de bir diğer önemli mekanizmadır. Bu metabolik değişiklik sonucu ortaya çıkan malnütrisyon hastanın mortalitesini büyük oranda etkilemektedir. Malnütrisyon hastanın immün fonksiyonlarını da oldukça bozar ve mikroorganizmaya karşı yetersiz yanıt ortaya çıkmasına sebep olur. Hücre enerji metabolizmasının sağlanması ilk aşamada mümkünken daha sonra ileri aşamalarda bu da sağlanamaz ,dokulara oksijen taşınımı bozulur ve hipoksi gelişir. Mitokondrial disfonksiyon sonucu, oksidatif hasar ortaya çıkar, buna ‘‘sitopatik hipoksi’’ denir. Hipoksinin ardından reperfüzyon gelişebilir bu da reperfüzyon hasarı ya da oksidatif hasara neden olur(16,18,81,103).

### **6-Sepsis tanısı**

Vücut ısısı, kalp hızı, solunum sayısı ve beyaz küre sayısına dayalı sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) kriterlerinin özgüllüğünün düşük olması nedeniyle, 2001 yılında uluslararası sepsis tanısı konferansında sepsise işaret edebilecek bulgu ve semptomların listesi genişletilmiştir. Ancak yeterince kanıt olmaması nedeniyle, 1991 yılında ortaya atılan tanımlar halen geçerliliğini korumaktadır. 2001 yılında Uluslararası Sepsis Tanısı Konferansında sepsis tanısında kullanılan kriterler kanıtlanmış veya şüphelenilen enfeksiyon varlığı yanında; genel belirleyiciler, enflamasyon belirleyicileri, hemodinamik belirleyiciler, organ disfonksiyonu belirleyicileri ve doku perfüzyon belirleyicilerinden bazılarının bulunması olarak tanımlanmıştır(63).

### **7-Enflamasyon belirleyicileri**

SIRS kriterleri arasında yer alan lökositöz veya formülde sola kaymanın özgüllüğü çok düşük; duyarlılığı ise nisbeten yüksektir. Bunlar gastrointestinal kanama; steroid kullanımı; cerrahi, kan transfüzyonu sonrası ve myokard enfarktüsü gibi enflamatuvar olmayan durumlarda da görülebilmektedir. Yine de çok kolay değerlendirilebilmesi nedeniyle

enfeksiyon izleminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

1991 SIRS kriterlerinde yer alan beyaz kan hücre sayısı ile ilgili kriter yanında C-reaktif protein (CRP) ve prokalsitonin de laboratuvar belirleyicileri olarak 2001 kriterlerine eklenmiştir. Bunlar özellikle enfeksiyona bağlı durumlarda daha çok artış gösteren akut faz reaktanlarıdır.

**-CRP** : C reaktif protein oldukça uzun zaman önce bulunmuş bir belirteçtir.1930 yılında Tillet ve Francis pnömonili hastaların serumlarından izole ettikleri bu maddenin *S.pneumonia* 'nın polisakkarit parçasını presipite ettiğini göstermişlerdir(87).

CRP, enflamasyon ve doku hasarı sonrası karaciğer tarafından salınan bir akut faz proteindir. Çoğunlukla enflamasyon, enfeksiyon, sepsis varlığını ve şiddetini gösteren klinik bir belirleyici olarak kullanılabilir. Ayrıca bakteriyel ve viral enfeksiyon ayırımı yapmakta da etkili olduğu gösterilmiştir.

Ancak özgüllüğü düşüktür, plazma düzeyindeki artış 24 saati bulabilmektedir. Lokal enfeksiyonlarda da artış görülebilmekte ve bazen sepsis şiddetini belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Enfeksiyon tablosu yatışsa da düzeyi günlerce yüksek kalabilmektedir ve enfeksiyon dışı enflamatuvar olaylarda da (otoimmün, romatizmal hastalıklar, myokard infarktüsü, malignansiler, cerrahi sonrası dönem) yükselebilmektedir. CRP düzeyinin 50mg/l olmasının sepsis tanısında %99 duyarlılık ve %75 özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir(1,29,83,87,92,107).

**-Prokalsitonin (PCT):** Kalsitonin öncülü peptid olup, normalde tiroid C-hücrelerinden salgılanmaktadır. Ciddi enfeksiyon varlığında, mononükleer lökosit ve karaciğer hücresi gibi ekstra tiroidal dokulardan endotoksin ve proenflamatuvar sitokinler aracılığı ile de salgılanmaktadır.

Prokalsitonin, SIRS' da da yükselebilmektedir, ancak bu durumdaki düzeyi, ciddi sepsis veya sepsik şoktaki kadar yüksek olmamaktadır. Lokal enfeksiyon varlığında

yükselmediği, viral ve bakteriyel enfeksiyon ayrımında yararlı olduğu öne sürülmektedir. Örneğin; bakteriyel menenjitli olgularda artarken, viral menenjitlerde artmaz. PCT, antibiyotik tedavilerinin düzenlenmesinde de gösterge olarak kullanılabilir. CRP' ye göre 20 saat kadar erken yükselmekte ve tedaviye yanıt varlığında daha kısa sürede düşmektedir. CRP' ye göre maliyeti daha yüksektir. Ayrıca prokalsitonin düzeylerinin CRP' ye nazaran sepsis ciddiyeti ve mortalite ile daha yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir. Normal düzeyi 0,5 ng/ml olarak kabul edilmektedir. SIRS 'de 0,5-2ng/ml, sepsis başlangıcında 2ng/ml, ciddi sepsis, septik şok ve çoklu organ yetmezliğinde ise 10 hatta 100ng/ml'nin üzerine çıktığı belirtilmektedir. Sepsis tanısında 1,5 ng/ml eşik değerinin %100 duyarlılık ve %72 özgüllük oranına sahip olduğu bildirilmiştir.

PCT ve CRP'nin tek bir ölçümden ziyade seri ölçümleri, avantaj ve dezavantajları dikkate alınarak sepsis tanı ve tedavisinde kullanılabilir(6,27,36,49,71,90).

**IL-6 :** Enflamatuvar yanıtın ciddiyetini gösterir. Bakteriyel enfeksiyona özgü değildir. Viral enfeksiyon, transplant reddi, otoimmün hastalıklar ve cerrahi girişim gibi durumlarda da yükselir. İmmün supresyon durumlarında azalır. Kinetiği oldukça hızlı olup, 1-2 saat içinde yükselip kısa sürede düşer. Tanıya yardımcı olması konusunda prokalsitonine üstünlüğü yoktur. Neonatal sepsisin erken tanısında değeri düşük geçerlilikte olsa da hızlı bir gösterge olduğundan yenidoğan kliniklerinde kullanılmaktadır. Ancak yine de bir çok klinik çalışmada prokalsitoninin daha üstün olduğu belirtilmektedir(6,14,31,45,73,77,82,92).

**-Neopterin:** aktive monosit- makrofajlar tarafından guanozin trifosfattan üretilen bir pteridin derivativesidir. Üretimi  $\gamma$  interferon ile indüklenir, TNF  $\alpha$  ve endotoksinle artar. Vücut sıvılarına dağıldıktan sonra aynı formda böbreklerden atılır(113).

Serum normal seviyesi 10nmol/L olup enflamasyon ve bakteriyel enfeksiyonun klinik göstergesi olarak kullanılır. Özellikle gram negatif sepsislerde ve ARDS 'ye bağlı sepsislerde seviyesi yükselir. Bakteriyel sepsis ve septik şoktaki serum düzeyleri, mortaliteyi

göstermesi açısından PCT ile kıyaslanabilir düzeydedir(76). SIRS 'ta tesbit edilen neopterin düzeyleri septik şoka göre daha düşük olduğundan neopterin enfeksiyonun iyi bir göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Ancak neopterin sepsis dışında maligniteler, otoimmün hastalıklar, kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı ve allograftın reddi gibi non-enfeksiyöz durumlarda da yükselmektedir.

Neopterin; CRP ve PCT 'den farklı olarak viral enfeksiyonlarda ve özellikle HIV' da da çok yükselir ve takipte kullanılır(11,102).

Neopterin NO sentezi ile de ilişkilidir. Yüksek seviyede neopterin, sepsisteki organ disfonksiyonlarını başlatan hücrel apoptozisi uyarır(49,91).

**-Endotoksin;** endotoksin uzun zamandır sepsis göstergesi olması açısından incelenen bir parameter olmakla birlikte klinikte alınan sonuçların tutarsız olması nedeniyle kullanımı oldukça sınırlıdır. Ancak son zamanlarda yeni bir biyolojik araştırma yöntemi olan EAA (endotoksin activity assay) ile tam kandan oldukça duyarlı ölçümler yapılabilmektedir.

Özellikle klinikte gram negatif enfeksiyon ve sepsis tanısı için yüksek pozitif prediktif değere sahiptir. Sepsis ve enfeksiyon için iyi bir gösterge olmasına karşın, endotoksin konakçı yanıtını iyi yansıtmamaktadır. Bu durumda EAA 'nın klinik kullanımı; yoğun bakım hastalarında enfeksiyon ve sepsisin ayrılması ile sınırlı kalmaktadır.Ciddi sepsise yanıtın düşük olması da tedavide rehber olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır(68,70).

**-MIF(Macrophage migration inhibition factor):**Sepsis ve stress gibi uyarıların ortamda bulunmasını takiben T hücreleri ve makrofajlardan salınmaktadır. SIRS, sepsis ve septik şoklu hastalarda MIF düzeyinin yükseldiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda MIF'in akut kritik hastalar için bir gösterge olmadığı saptanırken, septik şok ve SIRS' lı hastalarda yüksek MIF oranlarının kötü prognozla bağlantılı olduğu gösterilmiştir(94).

\* Araştırılmakta olan yeni parametreler;

**-Koagülasyon parametreleri;** Sepsisli hastalarda koagülasyon anormalliklerine erken dönemde sıkça rastlanır, ancak bu parametrelerin enfeksiyon olasılığı ve enflamasyonun ciddiyetini göstermemektedir. Ayrıca koagülasyon parametreleri normal sınırdada olsa hastaların mortalitesi yüksek bulunmuştur. Bu ve benzeri nedenlerle klinik sonuç ile olan bağlantı yeterince duyarlı ve geçerli değildir(8).

**-TREM-1(triggering receptor expressed on myeloid cells-1):** Nötrofiller, makrofajlar ve olgun monositler üzerinde tanımlanmış bir hücre yüzey belirteçidir. Gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve mantarların sebep olduğu enfeksiyonlarda cilt, biyolojik sıvılar ve dokularda salınımı belirgin olarak artar. Tersine immün kompleksler tarafından oluşturulan enfeksiyöz olmayan enflamatuvar hastalıklarda düzeyi yükselmez. Non enfeksiyözlerde kan seviyesi 0-144 ng/ml iken sepsiste 30-428 ng/ml dir. %96 duyarlı %89 özgüldür(8).

**-Midproatrial natriüretik peptid;** Aslında primer olarak konjestif kalp yetmezliğinin bir göstergesidir. Ancak sepsiste kullanılabilmesi de düşünülmektedir. Henüz alınan sonuçlar yeterli olmadığından daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır(8).

**-Lipopolisakkarit bağlayıcı protein(LBP);** LBP endotoksin aracılı immün yanıtta yer alan bir akut faz proteindir. LBP, endotoksin kompleksi, TLR 2 ve TLR 4' ü aktive ederek enflamatuvar yanıtı tetikler. Ancak kinetik induksiyonunun yavaş olması enflamatuvar yanıtın ciddiyetinin belirlenmesi ve ortadan kaldırılması için engel oluşturmaktadır(8).

## **8-Sepsis tedavisi**

Sepsiste genel tedavi stratejisi pek çok diğer enfeksiyonda da olduğu gibi etkenin tesbit edilip ortadan kaldırılmasına yöneliktir. Gerekli antibiyotik tedavisi vakit geçirilmeden verilmeli ve hemodinamik açıdan hastayı desteklemek amacıyla hastanın kişisel özelliklerine uygun olarak gerekli sıvı desteği verilmelidir(9,104).

## **Sepsiste yeni tedavi yaklaşımları(**

Konağın immün yanıtını azaltmayı hedefleyen pek çok adjuvan terapi üzerinde çalışılmaktadır. Ancak immünolojik savunma mekanizmalarının son derece karmaşık olması, enflamatuvar süreçte pek çok etkileşimin olması gibi sebeplerle farmakolojik ilerlemeler oldukça zor ilerlemektedir(9,23,104,111).

### **Antisitokin tedaviler;**

**Anti-TNF  $\alpha$  antikorları:** TNF $\alpha$  sepsis patogeneğinde anahtar mediyatördür. Rekombinant humanize edilmiş fare Anti-TNF antikor preparatı (Remicade veya infliximab) ve TNF-R: Fc füzyon proteini (Enbrel veya etanercept) sepsis tedavisinde denenmiştir. Ancak klinik denemelerde bu preparatların etkili olduğuna dair bir veri elde edilememiştir. Bu preparatların Chron hastalığı ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda ise oldukça etkili olduğu görülmüştür(35).

**Rekombinant IL-1 reseptör antagonisti** Sepsis ve enflamasyonda diğer önemli sitokin IL-1dir. Rekombinant IL-1 reseptör antagonisti iki adet büyük faz 3 çalışmaya katılmış olup, etkili bulunmamıştır. Halen üzerinde çalışmalar devam etmektedir(78,79).

### **Kullanımda olan immünomodülatör tedaviler**

**1-Kortikosteroidler** yıllardır sepsis tedavisinin vazgeçilmezi olmuşlardır. Ancak yüksek dozlardan daha çok fizyolojik dozların kullanılmasının daha iyi olacağı sonucu çıkmıştır. Sepsis tedavisinde kortikosteroidlerin kullanımı uzun yıllardır tartışılan bir konudur. Kortikosteroidler pek çok immün yanıtı bloke ederler. (lökosit infiltrasyonu, sitokin üretimi, NO sentezi inhibisyonu) Ancak yapılan çalışmalarda sepsisin erken döneminde kortikosteroid kullanımının prognoza olumlu etkisi olmamıştır. Yapılan son çalışmalarda adrenokortikal yetmezliği olan hastalarda prognozun daha kötü gittiği görülmüştür. Bu hipoteze dayanarak hastalarda daha ileri evrelerde düşük doz kortikosteroid kullanımının ümit verici olduğuna dair veriler vardır(9,88).

**2-Drotrecogin-A** 2001 yılında FDA tarafından onaylanarak erişkin hastalarda kullanıma girmiştir. Amerika' da kabul edildikten çok kısa bir süre sonra Avrupa'da ve tüm dünyada kullanılmaya başlanmış ve özellikle ölüm riski yüksek hastalarda kullanılmaktadır. Aktive olmuş protein C nin rekombine edilmiş bir şeklidir. Erişkinlerde sepsis tedavisindeki en son gelişme PROWESS (Human Activated PROtein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) çalışmasıdır. Bu çalışma geniş çift kör bir çalışma olup aktive protein C nin etkinliği araştırılmıştır. 1520 hastanın tedavi edilmesinin ardından tedavi edilen grupta sağkalımda belirgin bir artış olmuştur. Aktive protein C hem trombozu önler hem de enflamasyonu baskılar(13,23,94). Pahalıdır, ciddi kanama yan etkisi olabilir aktif kanaması olan hastalara verilmez..Bu nedenle tedavinin uygulanmasında hasta seçimi önemli rol oynar.

#### **-Gelecekte gündeme gelmesi beklenen yaklaşımlar**

**1-Yeni antiendotoksin tedavileri;** endotoksin sepsiste kilit rolü oynamaktadır. Endotoksin dolaşımında lipopolisakkarit bağlayan proteine(LBP) bağlanır, bu protein endotoksini CD14'e (hücre aktivasyonu ile sonuçlanır) ya da lipoproteinlere (endotksin inaktivasyonu ile sonuçlanır) aktarır. Normalde bu endotoksini bağlayacak yeterli miktarda lipoprotein kanda bulunurken sepsisteki hastalarda lipoprotein seviyesi düşer. Gönüllülerde ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki yüksek HDL seviyeleri, endotoksin nötralizasyonunda olumludur. HDL'nin içindeki major parça olan fosfolipidle yapılan faz 2 çalışmalar devam etmektedir(9).

**2-Apopitozis inhibisyonu:** Apopitozis hücre hemostazisini sağlamak amacıyla çok önemlidir. Ancak sepsiste dengeler bozular. Lenfosit ve epitelyal hücre apopitozisi artar. Hayvan sepsis modellerinde caspas inhibitörleri ile apopitozisin kontrol altına alındığı durumlarda sağ kalımın uzadığı görülmüştür.Bu nedenle insanlarda da gelecekte tedavi seçeneklerinin arasına girebilir(94,111).

**3-HMGB 1(High mobility group box-1)inhibisyonu** Bu sistemik enflamatuvar yanıtın geç salınan bir mediyatörü olup endotoksinle uyarılmış makrofajlardan erken sitokinler saldıktan 8-12 saat sonra salınarak aktive olmuş makrofalardan TNF  $\alpha$  ve IL-1 salınımına neden olur. Sonuçta da nötrofil aktivasyonu ve epitelyal hücre geçirgenliğinin artmasına sebep olur. Hayvan modellerinde etil piruvatın verilmesi sonucu HMG-1 in azalması ve endotokseminin yarattığı yan etkilerden korunulduğu görülmüştür.Ancak sepsisin ilk 24 saatinde verilmesi önemlidir(94,104,111).

**4-PARP/PARS, (Poly ADP Ribose Polymerase/Synthetase) inhibisyonu** Bunlar NF-Kappa  $\beta$  aracılığı ile salgılanan İ-NOS ve ICAM gibi enflamatuvar mediyatörlerin kontrolü amacıyla kullanılır. Hayvan modellerinde sağ kalımı artırdığını gösteren veriler mevcuttur.Ancak henüz klinik çalışmaları yapılmamıştır(111).

**5-TREM-1: (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) inhibisyonu**Yeni bulunan immünglobulin ailesine ait bir reseptördür.DAP12 denilen bir adaptor molekül aracılığı ile monosit makrofaj aktivasyonu yapar.Mikroplara karşı TLR aracılığı ile verilen cevabı artırır.Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerin sentezini ve salınımını artırır.Bu nedenle gelecekte tedavi için iyi bir hedef olabilir(104).

Sepsisle ilgili klinik ve deneysel çalışmalardan elde edilen bilgilerden tek bir tedavi yöntemi ya da bireysel farklılıkların göz ardı edildiği standart tedaviler ile sepsis patogenezinde rol oynayan karmaşık olayların tümünün baskılanması yolu ile etkin bir tedavinin mümkün olamayacağı açıktır. Ancak sepsis patogenezi ile ilgili bilgilerimizin artması patojen ve patogeneze spesifik rejimlerin geliştirilmesi ve genetik çalışmalar ile sepsis organ disfonksiyonları ve ölüm gelişmesi bakımından risk altında olan ve spesifik bir tedaviden fayda görebilecek hastaların belirlenmesi ile yakın gelecekte sepsisin daha iyi tedavi edilmesinin mümkün olacağı düşünülmektedir (90)

Dolayısıyla etkin ve kişiye özgül bir tedavinin geliştirilebilmesi sepsis patogenezinde rol oynayan mekanizma ve araçların tam olarak anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda gram negatif ve gram pozitif sepsisli hastalarda oluşan immünolojik değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla kan kültüründe mikroorganizmanın üremesini takiben sepsis tanısı konmuş hastaların periferik kan örneklerinden izole edilen mononükleer hücrelerde hücre yüzey belirteçlerinin (marker) tesbit edilmesi ve serum örneklerinde sitokin düzeylerinin belirlenerek, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmasının yapılması amaçlanmıştır.

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **I-Gereçler:**

#### **-Laboratuvar araçları**

- 1- EDTA lı tüp
- 2- Enjektör
- 3- Santrifüj (HERME Z 380,Almanya)
- 4- Grainer(Grainer)
- 5- Vorteks (Heidolph,Reax control)
- 6- Mikropipetler ve uçları(Isoterm,USA)
- 7- 96' lık V tabanlı plate
- 8- Güvenlik kabini(Nauire class II tip A/B3 USA)
- 9- Distile su cihazı(Seralpur pro 90 C)
- 10- Buzdolabı(BOSCH)
- 11- Derin dondurucu(Sanyo,Japonya)
- 12- ELİSA okuma cihazı (Elx800,Biotek,ABD)
- 13- Işık mikroskobu(Olympus,Japonya)
- 14- Ependorf(RNAazdan yoksun)(Trefflab,İsviçre)
- 15- ELİSA (Biosource)
- 16- Akan hücre ölçer (flow cytometry,Coulter FC500)(Coulter)
- 17-Neubauer lamı
- 18-Pasteur pipeti

#### **-Kimyasallar**

- 1- Fetal calf serum(FCS)(PAA Laboratories GmbH,Avusturya)
- 2- Monoklonal antikorlar(E-bioscience)

3- Tripan mavisi(Applichem,Almanya)

4- Serum fizyolojik

5- RPMI 1640(L-Glutaminli ,bikarbonatsız,penisilinli,merkaptetanollü)(KIBBUTZ BEIT HAEMEK,İsrail)

6- Gradient solüsyonu(Ficoll-Hypaque ,Pharmacia Biotech,St Alban's Herts ,UK)

7- PBS (Phosphate buffered saline solution)

### **-Hasta grubu**

Bu prospektif çalışma, gerekli etik kurul raporunun da alınmasının ardından Mayıs 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında yapılmıştır. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi nöroloji yoğun bakım, anestezi yoğun bakım, dahiliye yoğun bakım, genel cerrahi yoğun bakım, beyin cerrahisi yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan ,sepsis tanısı almış 26 hasta çalışma kapsamına alınmıştır. Hastaların yaş aralığı 35-65 (yaş ortalaması 51.19) idi. Hastaların 12si erkek 14 ü kadın hastaydı. Kontrol grubu 25 yaş üstü herhangi bir hastalığı olmayan 15 sağlıklı erişkin gönüllüden oluşturulmuştur. Enfeksiyon patojen mikroorganizmanın kandan ya da diğer steril vücut bölgelerinden izole edilmiştir. Mikroorganizma tanımlaması BACTALERT( bioMerieux, ABD) otomotize kan kültür sistemi kullanılarak yapılmıştır. Altta yatan kronik bir hastalık, anestezi, cerrahi stres gibi faktörler bulunmayan, antibakteriyel ilaç uygulanmamış, nötrofil sayısı normal değerlerde olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.10 yaş altı veya 80 ya üstü olmak, immunmodulasyon tedavisi almak HIV/AIDS, malign hastalık, sepsis tanısının üzerinden 24 saat geçmiş olması çalışma dışı bırakılma kriterleridir.

Sepsis tanısı CDC ve 2001 uzlaşılı toplantısı kriterlerine göre konulmuştur.

Tüm hastalar aşağıdaki SIRS kriterlerinin en az iki tanesine sahiptir.

1-Vücut sıcaklığı >38C veya <36 C

2-Kalp tepe atımı >90/dk

3-Dakika solunum sayısı >20

4-Lökosit sayısı >12000 veya <4000 ya da immatür hücre oranı >%10

## **II-YÖNTEM**

### **-Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu**

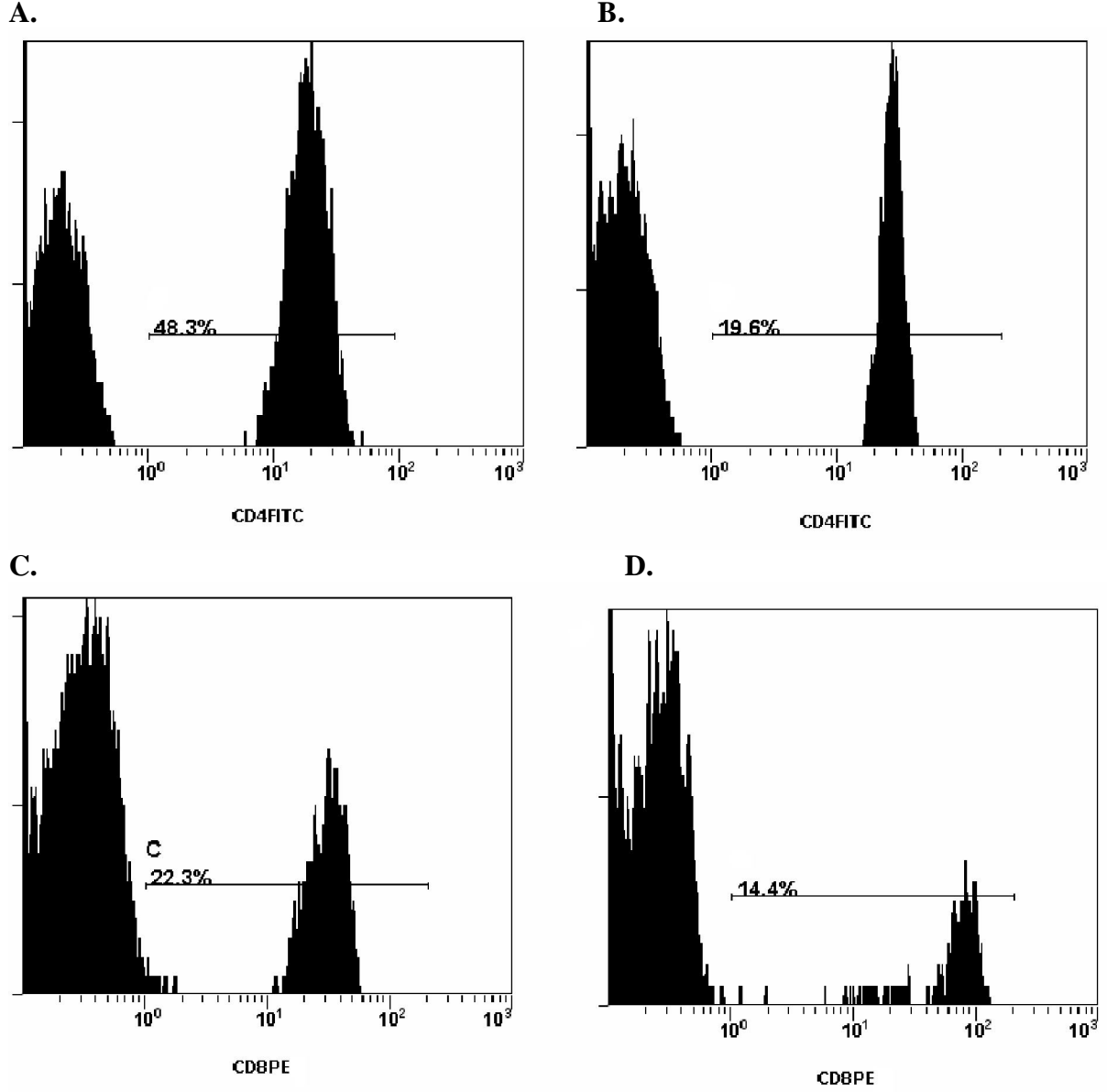
Sepsis tanısı konulmuş olan hastalardan ve kontrol grubundan alınan heparinize kan örnekleri bekletilmeden aynı gün taze olarak çalışıldı. Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu, Ficoll-hypaque density gradient centrifugation yöntemi ile yapıldı. Kan örnekleri oda ısısında 20 dk. bekletildikten sonra 1:1 oranında PBS (Phosphate Buffered Saline) ile santrifüj tüpünde karıştırıldı. Ayrı bir santrifüj tüpü içerisine Ficoll-hypaque konuldu. Üzerine dilüe edilmiş kan örneği, steril pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde, kan ve Ficoll-hypaque birbirine karıştırılmadan yayıldı. 2000 rpm'de 18-20°C'de 30 dk. süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmında bulunan plazma tabakası steril pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde alınarak, ayrı bir tüpe aktarıldı. Lenfositleri içeren buffy coat tabakası ise steril bir pastör pipeti ile ayrı bir temiz santrifüj tüpüne alındı. Bu tabaka alınırken; granülosit, eritrosit ve Ficoll-hypaque içeren tabakanın toplanmamasına özellikle dikkat edildi. Lenfositleri içeren santrifüj tüpüne en az 3 kat olacak şekilde PBS eklendi (lenfosit: PBS=1:3). Pastör pipeti ile hücreler süspanse edildi. 1500 rpm'de 18-20°C'de 10 dk. süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmında bulunan süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan çökeleğin üzerine 10 ml kadar PBS konulup, pastör pipeti ile karıştırıldı. 1500 rpm'de 18-20°C'de 10 dk. süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmındaki süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan ve içerisinde lenfositlerin bulunduğu çökelek, 2mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 0.05 mM 2ME ve %10 FCS (fetal calf serum) içeren RPMI 1640 besiyeri ile süspanse edildi. Neubauer lamında hücre canlılığı Trypan blue boyama yöntemi ile incelendi ve canlı hücre sayımı yapıldı. Sayım sonrasında hücre canlılığı %95 olarak bulundu.

**-Akım sitometrisi analizi için izole edilen hücrelerin yüzey boyanması:**

Ficoll-hypaque density gradient centrifugation yöntemi ile izole edilen hücreler  $20 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde RPMI 1640 besiyeri içinde hazırlandı. Hücre yüzey belirteçlerinin analizi, monoklonal antikor kullanılarak akım sitometrisi yöntemi ile Coulter FC500 akım sitometrisi cihazı kullanılarak yapıldı (Coulter).

Hücrelerin boyanması için FITC (Fluorescein isothiocyanate) veya PE (Phycoerythrin) işaretli monoklonal antikorların 2'li kombinasyonları kullanılarak 2'li boyama yapıldı: CD3-FITC/CD4-PE; CD3-FITC/CD8-PE; CD4-FITC/CD8-PE; CD3-FITC/CD19-PE; CD4-FITC/CD25-PE; CD8-FITC/CD25-PE; CD4-FITC/CD69-PE; CD8-FITC/CD69-PE; CD14-FITC/TLR2-PE; CD14-FITC/TLR4-PE,; CD3 FITC /CD56CD16PE (E-bioscience). İzotipik kontrol olarak IgG1-FITC/IgG2-PE kullanıldı.

Yapılacak boyama sayısı kadar ependorf tüp içerisine her birinde  $1 \times 10^6$  hücre içeren lenfosit süspansiyonundan 50'şer  $\mu$ l dağıtıldı. Her bir ependorf tüp içine sırasıyla yukarıda belirtilen monoklonal antikor kombinasyonlarından 10'ar  $\mu$ l eklendi. Hücre ve monoklonal antikor içeren tüpler vortekslendikten sonra, 30 dk. süre ile  $+4^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler 2000 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Tüp dibinde bulunan çökeleğe 100  $\mu$ l %1'lik staining buffer (%1 FBS+PBS) eklenerek karıştırıldı. Tüpler 2000 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildikten sonra, bir kez daha staining buffer eklenip, santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra, her bir tüpteki çökeleğin üzerine 400'er  $\mu$ l staining buffer eklenip, karıştırıldı. Ependorf tüp içerikleri sırasıyla flow tüplerine aktarıldı. Tüplerin üzerleri kapatılıp, akım sitometri cihazında okuma yapıldı (Şekil 1).



**Şekil 1:** Akım sitometri cihazından alınan ölçüm örnekleri

### -Serum sitokin düzeyleri;

Sepsis tanısı konulmuş hastalar TNF- $\alpha$  dan alınan kan örnekleri santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı ve sitokin düzeylerinin belirlenmesi için yapılacak çalışmaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Serum örneklerinde TNF  $\alpha$  (Tümör nekrozis faktör-  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (İnterlökin-1  $\beta$ ), IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) sitokinlerinin düzeyleri ELISA (Enzyme-linked

immunosorbent assay) yöntemi ile firmanın önerileri doğrultusunda kit içerisindeki talimatlara uygun şekilde belirlendi (Biosource).

Serum örnekleri ve sitokinlere ait standartlar 96 kuyucuklu mikroplyetlerde uygun kuyucuklara yerleştirildikten sonra, inkübasyon tamponu ile inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara Biotin konjugat konulup, plaklar tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkandı ve Streptavidin- Peroxidase (HRP) solüsyonu eklendi. İnkübasyonu takiben, plaklar tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandı. Son aşamada kuyucuklara kromojen solüsyonu konulup, plaklar inkübasyona bırakıldı ve daha sonra kuyucuklarda oluşan reaksiyon, stop solüsyonu ile durduruldu. Kuyucuklarda oluşan absorbans değerleri, ELISA okuyucusunda 450 nm'de okutularak değerlendirildi (BioTek). Standart eğri, her plak için uygun olan ve miktarı bilinen rekombinant insan sitokin standartları ile oluşturuldu. Örneklere ait sitokin düzeyleri, standart eğri üzerinde işaretlenerek, serum örneklerine ait sitokin düzeyleri pg/ml cinsinden belirlendi.

#### **-İstatistik analizi**

Lenfosit yüzey belirteçlerinde oluşan değişikliklerin gözlenmesinde ve serum sitokin düzeylerinin karşılaştırılmasında ANOVA testi (one-way analysis of variance) kullanıldı. Post Hoc analiz için The Bonferroni test yapıldı.  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### 1-Hastaların kan örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar

5 örnekte *Acinetobacter baumannii*

4 örnekte *Klebsiella spp*

7 örnekte *Pseudomonas aeruginosa*

5 örnekte *Stafilococcus aureus* (MRSA)

3 örnekte koagülaz negatif stafilokoklar

2 örnekte *Enterococcus spp*

### 2-Deney grupları

Grup 1: Gram negatif sepsisli hastalar (16 hasta)

Grup 2: Gram pozitif sepsisli hastalar (10 hasta)

Grup 3: Sağlıklı kontrol grubu (15 sağlıklı kişi)

### 3-Lenfosit yüzey belirleyicilerinin ifadenmesi

Gram pozitif ve gram negatif hasta gruplarında ve kontrol grubunda incelenen hücre alt grupları aşağıda belirtilmiştir.

**Total T lenfosit yüzdesi (CD3<sup>+</sup>):**CD3 ifadenmesi açısından kontrol grubu ile gram pozitif ve gram negatif sepsisli hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde fark bulunmuştur. Sepsisli hasta gruplarda CD3 ifadenmesi belirgin olarak azalmıştır., (p <0,001).CD3 ifadenmesi açısından gram negatif ve gram pozitif sepsisli gruplar arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05) (Şekil 2).

**CD4<sup>+</sup> T lenfosit yüzdesi (Yardımcı T hücre,Th):** Yardımcı T hücre belirteci olan CD4 ifadenmesi sağlıklı kontrol grubu ile her iki sepsis grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeylerde fark oluşturmuş ve CD4 ifadenmesi belirgin olarak azalmıştır (p<0,001). Ancak gram pozitif ve gram negatif sepsisli hasta grupları arasında CD4 ifadenmesi anlamlı bir fark oluşturmamıştır (p>0,05) (Şekil 3).

**CD8<sup>+</sup> T lenfosit yüzdesi (Sitotoksik T hücresi, Tsit):** CD8 ifadenmesi gram negatif ve gram pozitif sepsis grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde fark bulunmamıştır. ( $p>0,005$ ). Sağlıklı kontrol grubu ile her iki sepsis grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuş olup hasta grupta belirgin olarak azalmış bulunmuştur ( $p<0,005$ ) (Şekil 4).

**Total B lenfosit yüzdesi (CD19<sup>+</sup>):** B lenfosit yüzey belirleyicisi olan CD19 ifadenmesi gram negatif ve gram pozitif sepsis grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark oluşturmamıştır. ( $p|>0,05$ ). Kontrol grubu ile her iki sepsis grubu arasında CD19 ifadenmesi anlamlı düzeylerde farklı bulunmuştur. ( $p<0,001$ ). Buna göre sepsisli hasta grubunda ,kontrol grubuna göre CD19 ifadenmesi artış göstermiştir (Şekil 5) .

**Monosit yüzdesi (CD14<sup>+</sup>):** CD14 ifadenmesi gram negatif ve gram pozitif sepsis grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde fark bulunmamıştır. ( $p>0,005$ ). Sağlıklı kontrol grubu ile her iki sepsis grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. ( $p<0,005$ ). Sepsisli hasta gruplarında CD14 ifadenmesi azalmışolarak tesbit edilmiştir (Şekil 6).

**NK hücre yüzdesi (CD3-CD16<sup>+</sup>/ CD56<sup>+</sup>):** Sepsisli hastalarda dolaşımdaki NK hücre (CD3 – CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) yüzdeleri; kontrol grubuna göre her hangi bir fark göstermemiş, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 7).

#### **4- Aktivasyon ve düzenleyici belirteçlerin belirlenmesi**

CD4<sup>+</sup> T lenfositlerde bir aktivasyon belirteci olan CD25'in ifadenmesi açısından gram negatif ve gram pozitif sepsisli hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. ( $p>0,005$ ). Sağlıklı kontrol grubu ile her iki sepsis grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuş olup sepsisli hastalarda belirgin olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0,005$ ) (Şekil 8).

CD8<sup>+</sup> T lenfositlerde yine bir aktivasyon belirteci olan CD69 ifadenmesi; gram negatif ve gram pozitif sepsis grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde fark oluşturmamıştır. ( $p>0,005$ ). Sağlıklı kontrol grubu ile her iki sepsis grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. CD69 ifadenmesi hastalarda artmış olarak belirlenmiştir ( $p<0,005$ ) (Şekil 9).

CD4<sup>+</sup> T lenfositlerde CD69 ifadenmesi açısından gram negatif ve gram pozitif sepsis grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir fark belirlenmemiştir. ( $p>0,005$ ). Sağlıklı kontrol grubu ile her iki sepsis grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. ( $p<0,005$ ). Hastalarda belirgin olarak artmış olarak tesbit edilmiştir (Şekil 10).

#### **5- CD 14<sup>+</sup>monositlerde TLR -2 ve TLR -4 ifadenmesi**

TLR-2 ifadenmesi; gram pozitif sepsisli hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış göstermiştir( $p<0,001$ ). Benzer şekilde; gram pozitif sepsisli grupta TLR-2 ifadenmesi, gram negatif sepsisli hasta grubundan da istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde fark oluşturmuştur( $p<0,001$ ) TLR-2 ifadenmesi açısından gram negatif sepsisli grup ile sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir( $p>0,05$ ) (Şekil 11).

Monosit yüzeyinde ifadenmesi incelenen diğer bir TLR; TLR-4'tür. TLR-4'ün ifadenmesi her üç grup arasında anlamlı düzeylerde fark oluşturmuştur ( $p<0,001$ ). Buna göre ,TLR-4 ifadenmesinde sepsisli grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeylerde artış görülmüştür, ancak bu artışın gram negatif sepsisli grupta daha belirgin olduğu gözlenmiştir( $p<0,001$ ) (Şekil 12).

#### **6- Serum sitokin düzeyleri**

Çalışmamızda serum düzeyleri incelenen TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 ve IL-10 sitokinlerinde IL-2 hariç diğer tüm sitokinler, hasta grubunda sağlıklı kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde farklılık göstermiştir.

Düzeyleri incelenen proenflamatuvar sitokinlerden TNF $\alpha$  gram negatif ve gram pozitif sepsisli hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre artış göstermiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Gram pozitif ve gram negatif sepsisli hasta grupları arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 13).

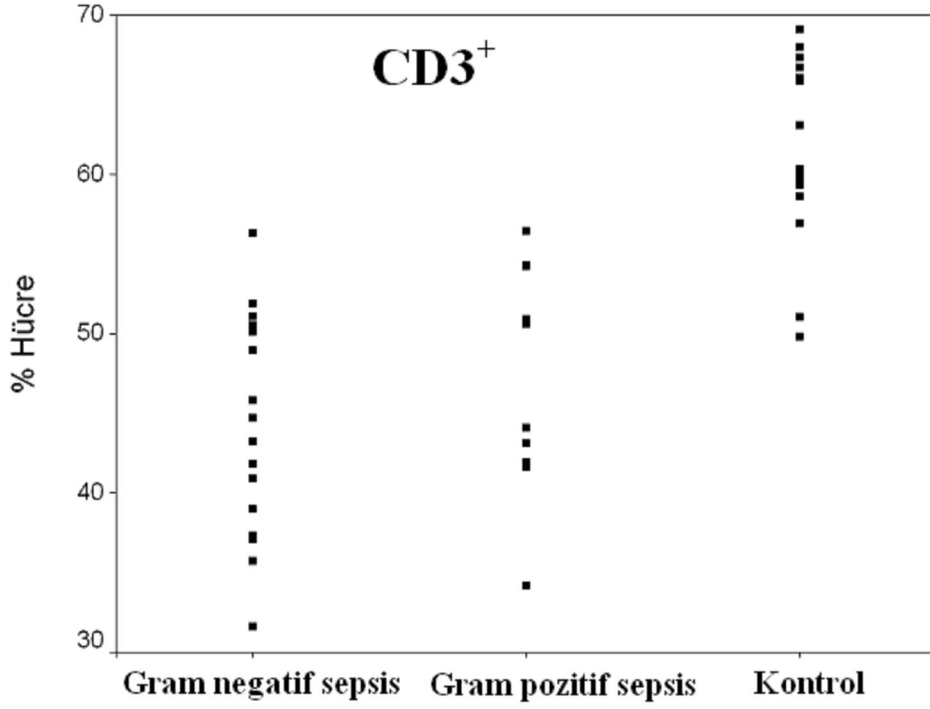
IFN $\gamma$  düzeyi hem gram pozitif hem de gram negatif sepsisli hastalarda artmış olarak bulunmuştur. Bu artış kontrol grubuna kıyasla sepsisli hasta gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p<0,001$ ) (Şekil 14).

IL1- $\beta$  düzeyleri sepsisli grupta kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ( $p<0,001$ ) Ancak gram negatif ve gram pozitif sepsisli hastalar arasında serum IL-1 $\beta$  düzeyleri herhangi bir fark oluşturmamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 15).

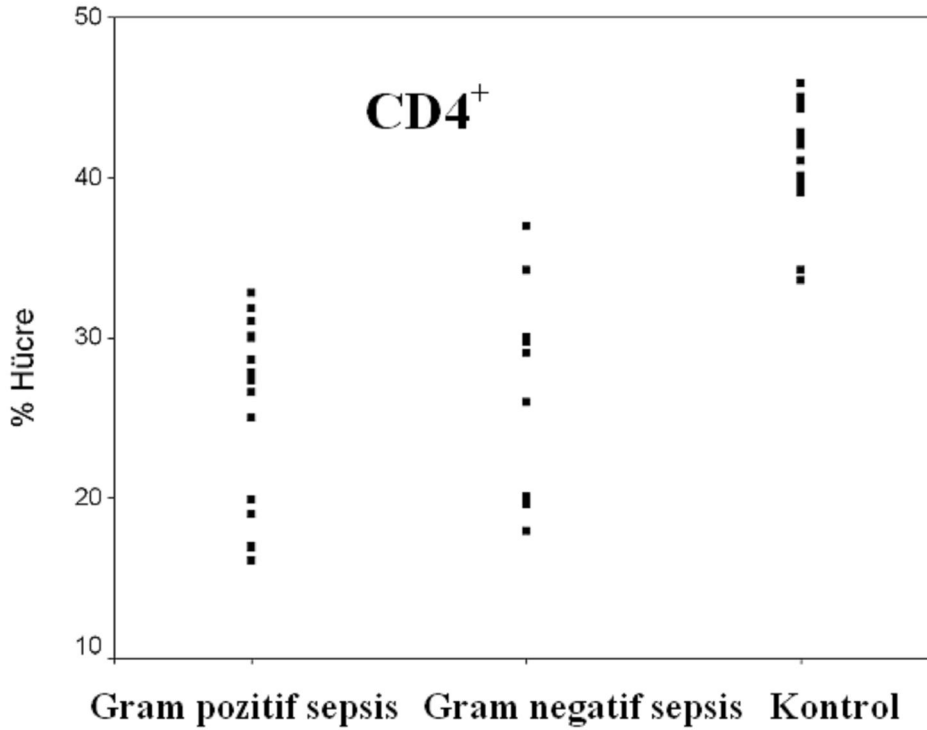
IL-2 gram pozitif, gram negatif sepsisli grupta ve sağlıklı kontrol grubunda yüksek düzeylerde olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,001$ ) (Şekil 16).

Çalışmamızda serum düzeyi incelenen sitokinlerden olan IL-6 sepsisli grupta kontrol grubuna göre oldukça belirgin olarak artmıştır. ( $p>0,01$ ) Her iki sepsis grubu arasında ise IL-6 düzeyi açısından fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 17).

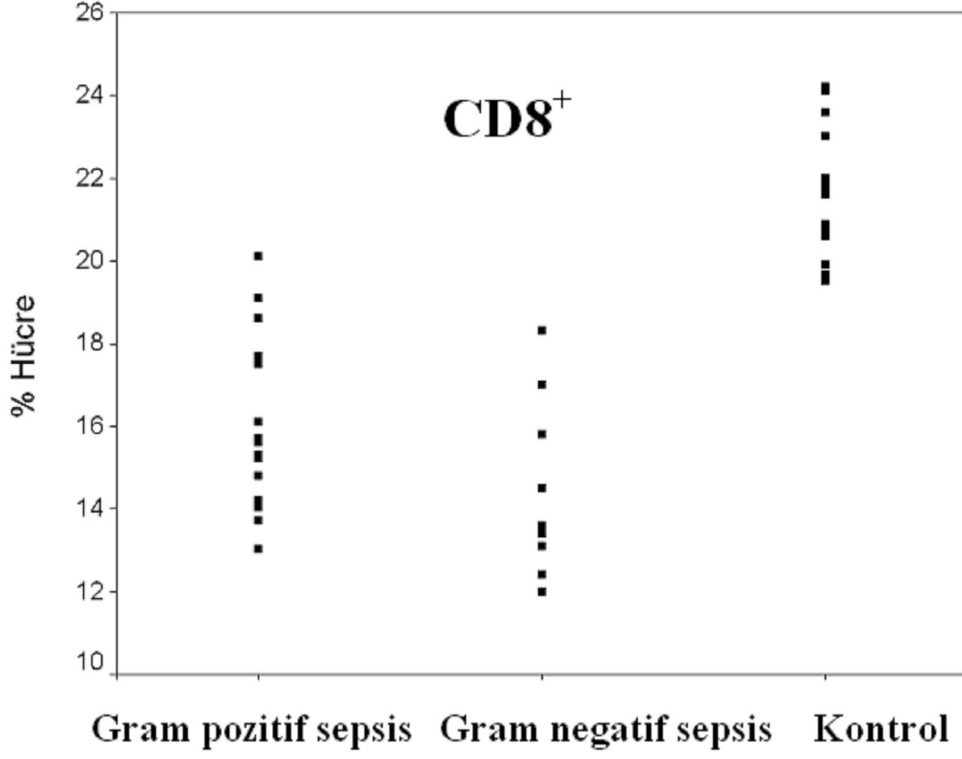
Antiinflamatuvar özellikte bir sitokin olan IL-10 düzeyleri sepsisli grupta kontrol grubuna göre farklı olarak belirlenmiştir ( $p<0,001$ ). Buna göre sepsisli grupta IL-10 düzeyleri artış göstermiş, gram pozitif ve gram negatif sepsis grupları arasında ise istatistiksel açıdan fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 18).



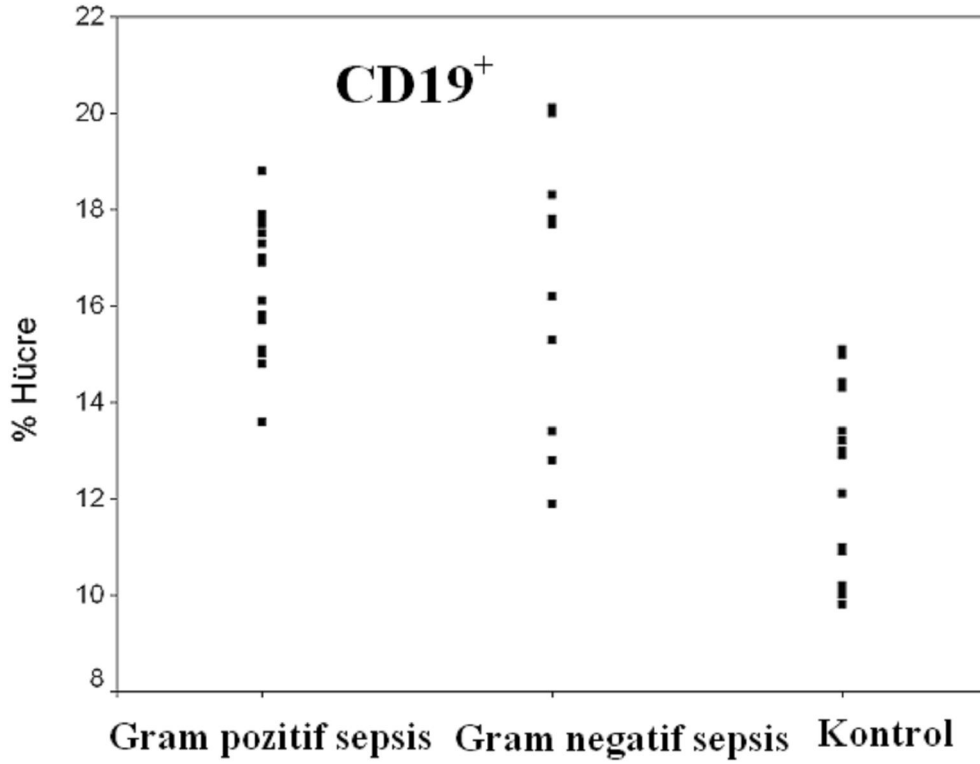
Şekil 2: Gram negatif ,gram pozitif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD3 ifadenmesi



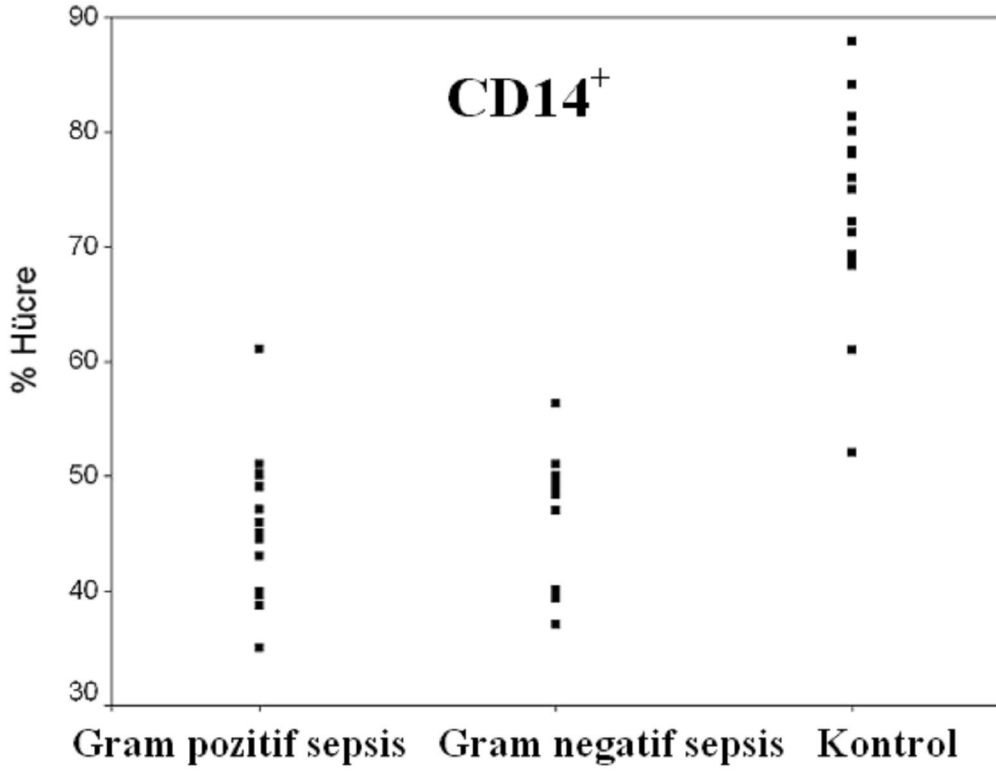
Şekil 3: Gram negatif ,gram pozitif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD4 ifadenmesi



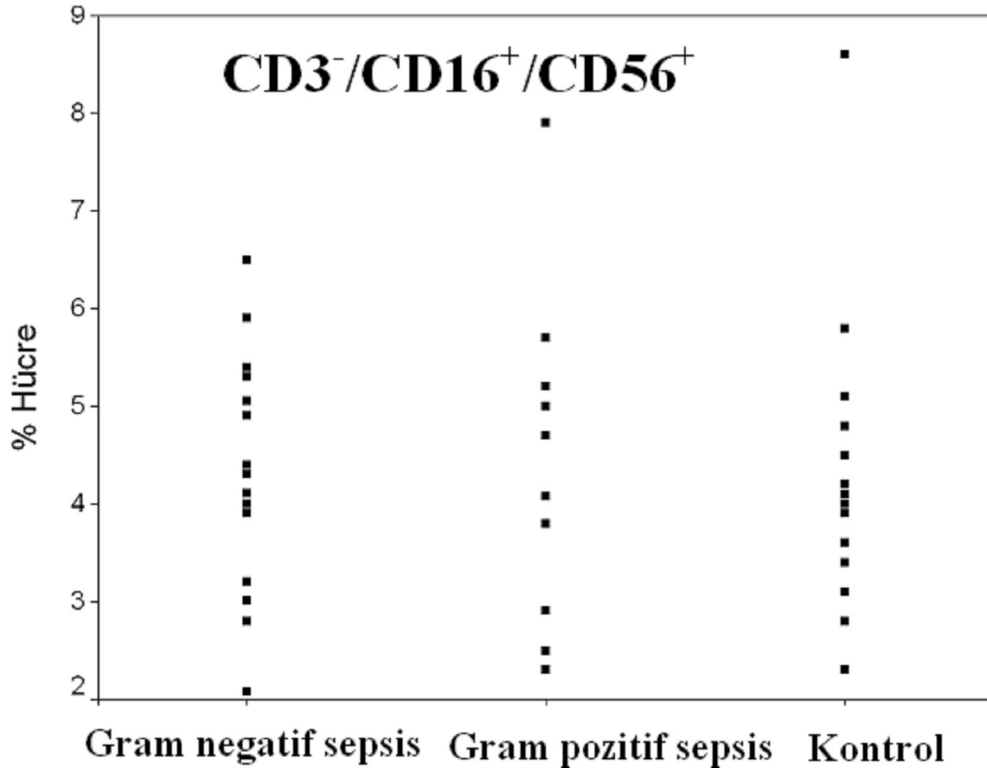
Şekil 4: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD8 ifadenmesi



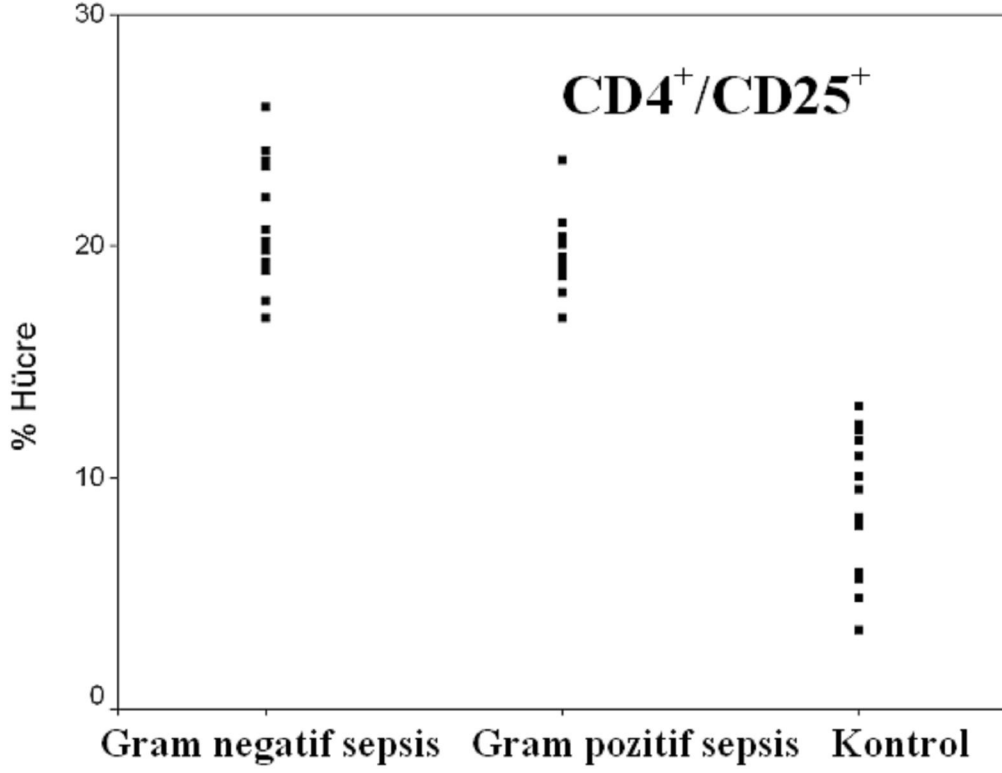
Şekil 5: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD19 ifadenmesi



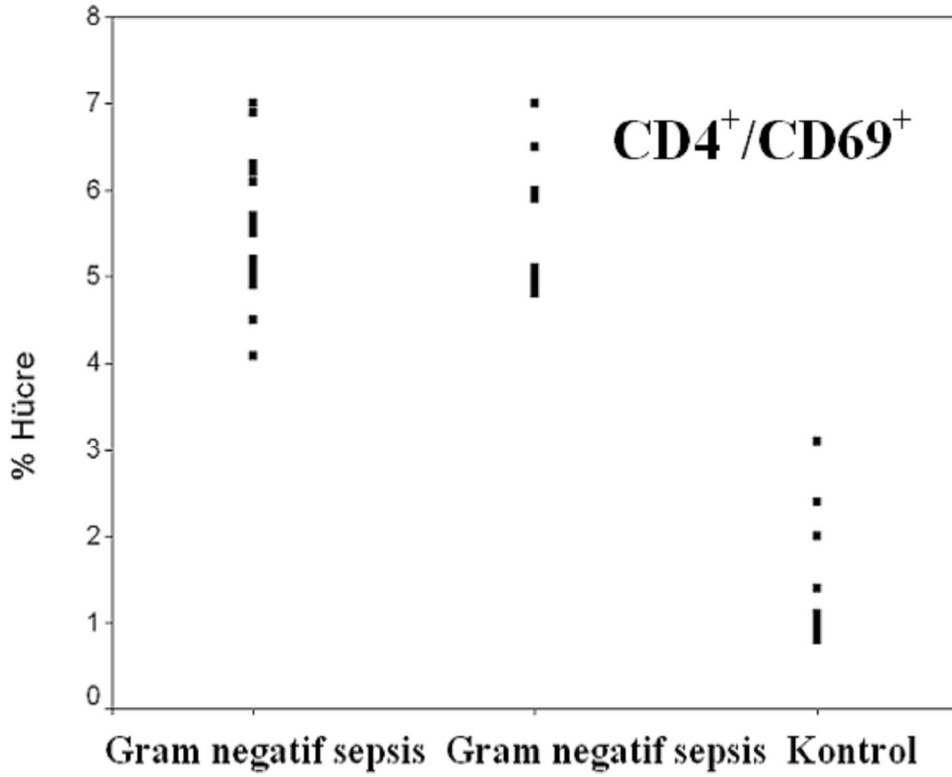
Şekil 6: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD14 ifadenmesi



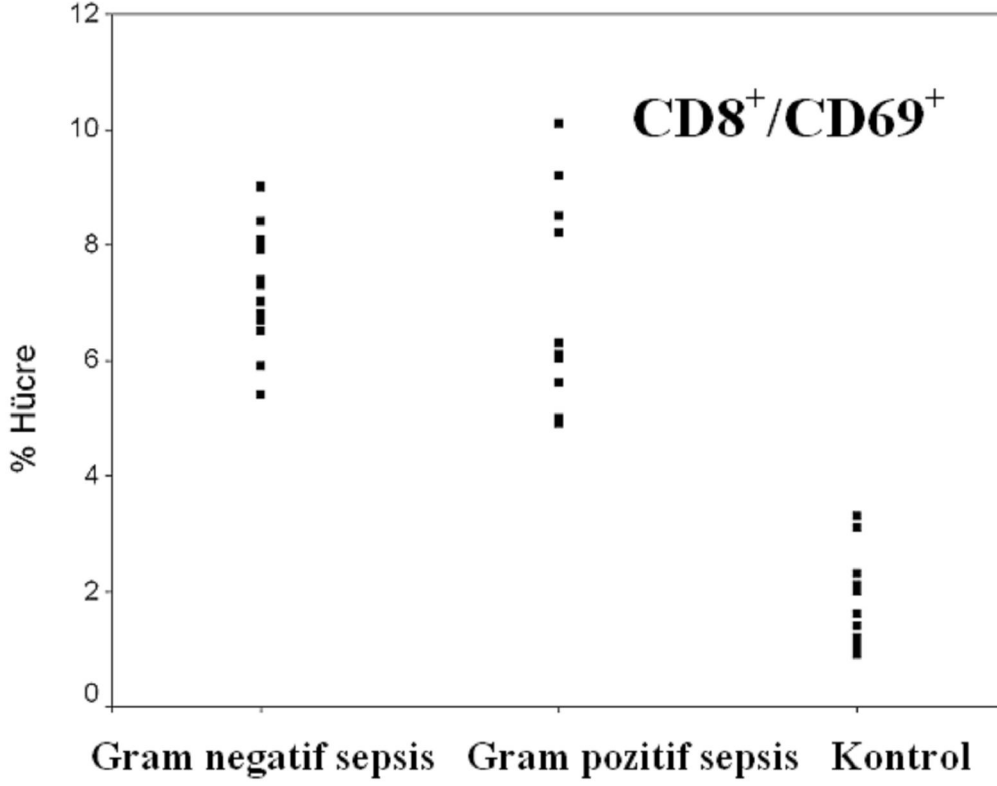
Şekil 7: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> ifadenmesi



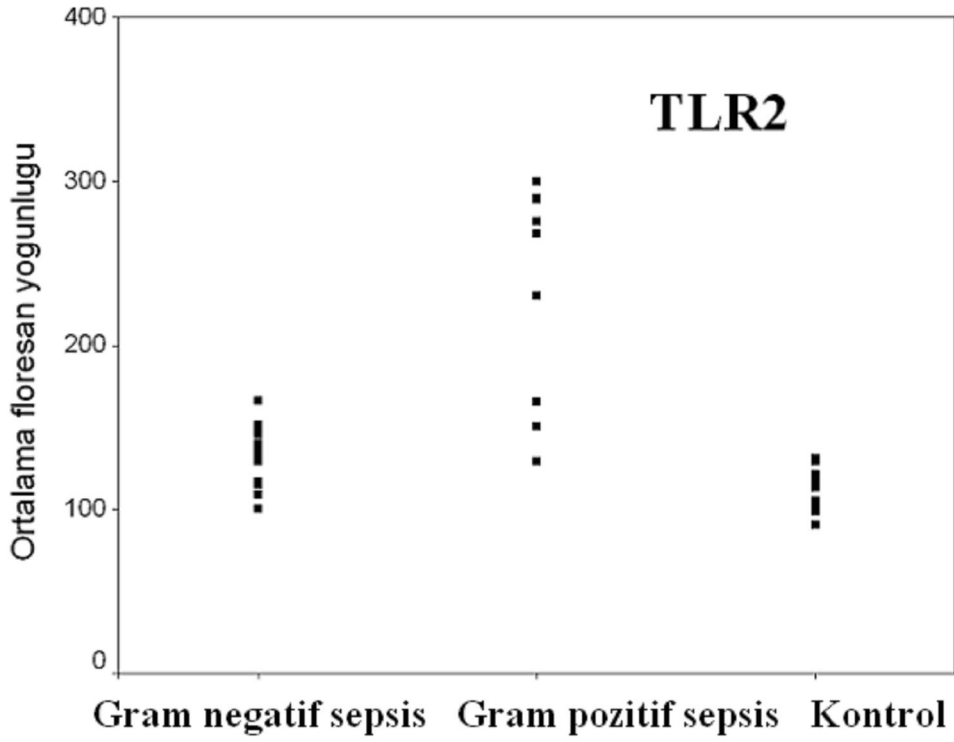
Şekil 8: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD4/CD25 ifadenmesi



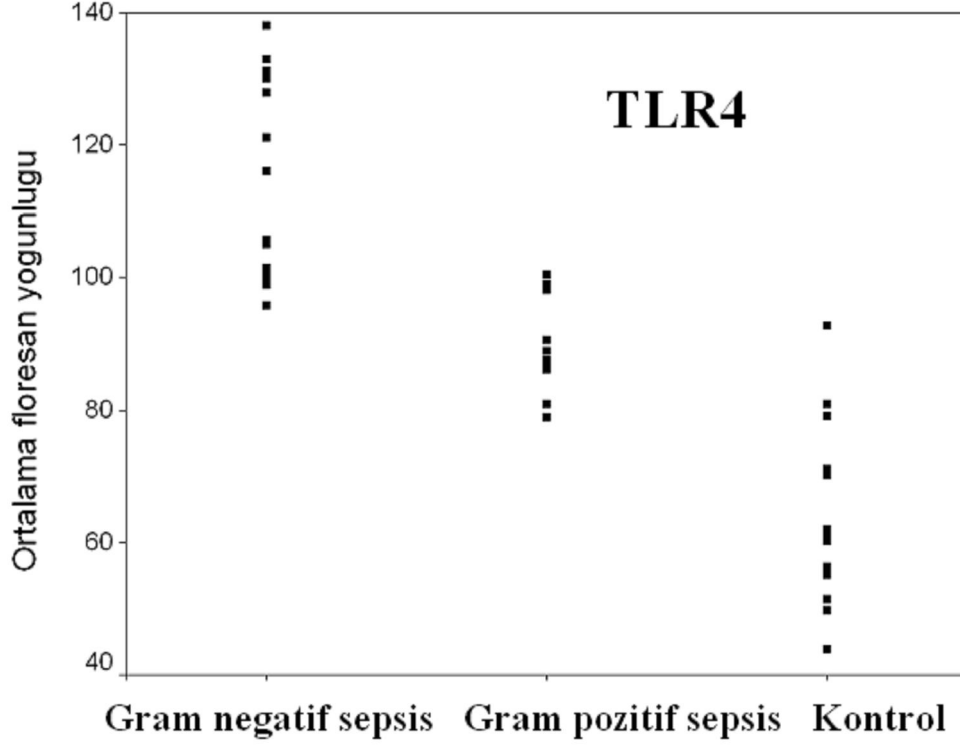
Şekil 9: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD4/CD69 ifadenmesi



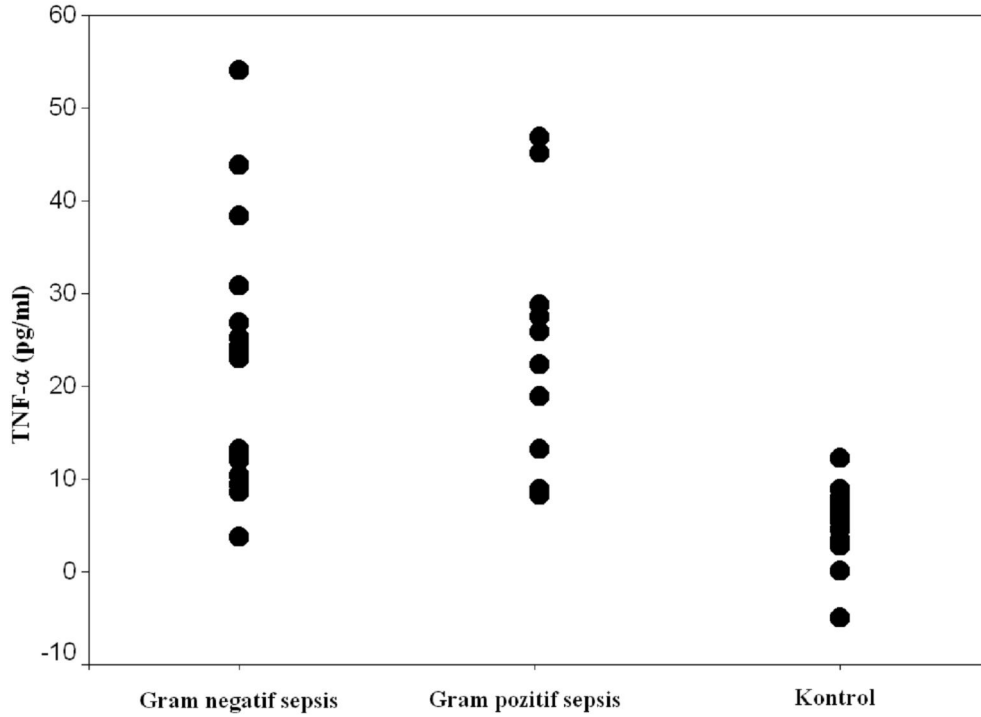
Şekil 10: Gram pozitif, gram negatif sepsisli ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde CD8/CD69 ifadenmesi



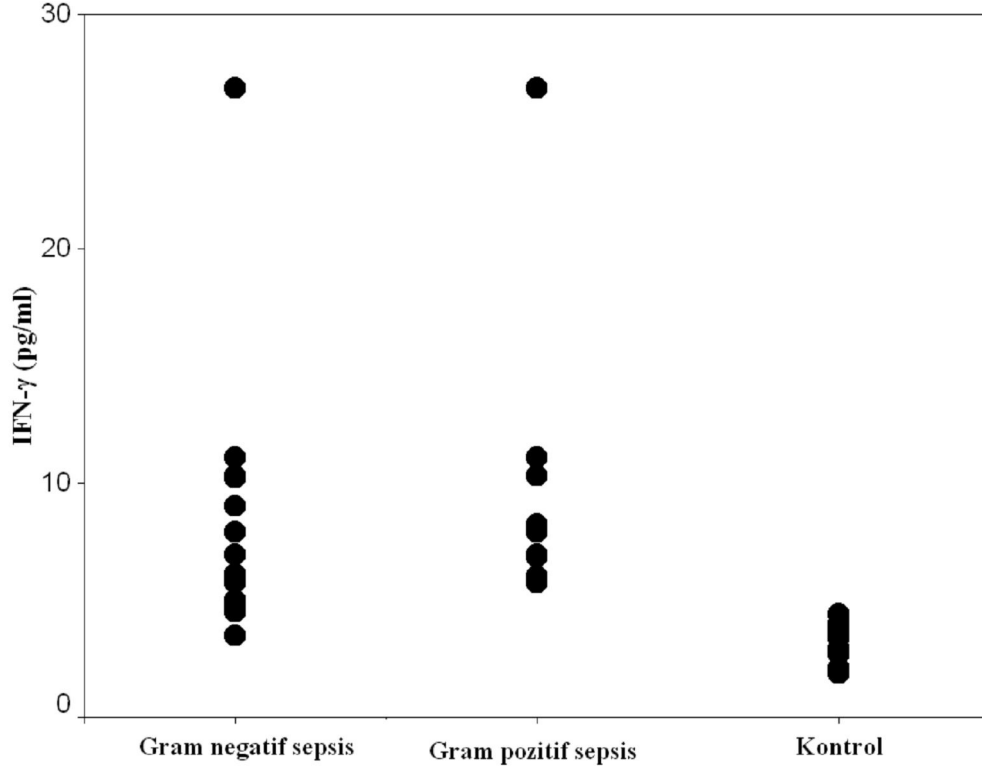
Şekil 11: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde TLR2 ifadenmesi



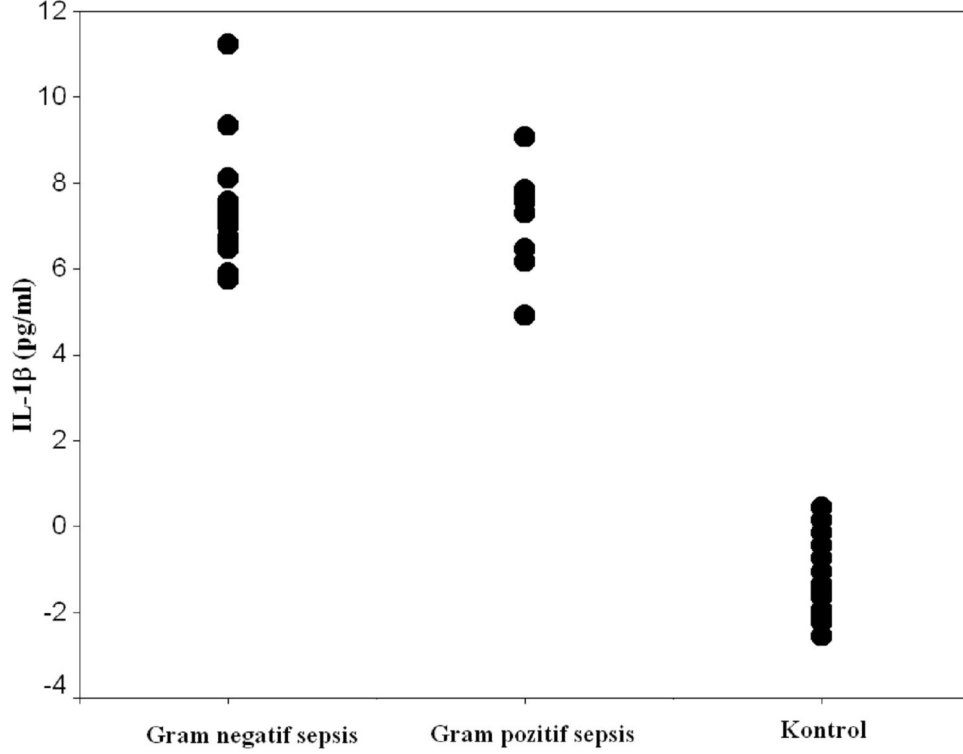
**Şekil 12: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda hücre yüzeyinde TLR4 ifadenmesi**



**Şekil 13: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda serum TNF-α düzeyleri**



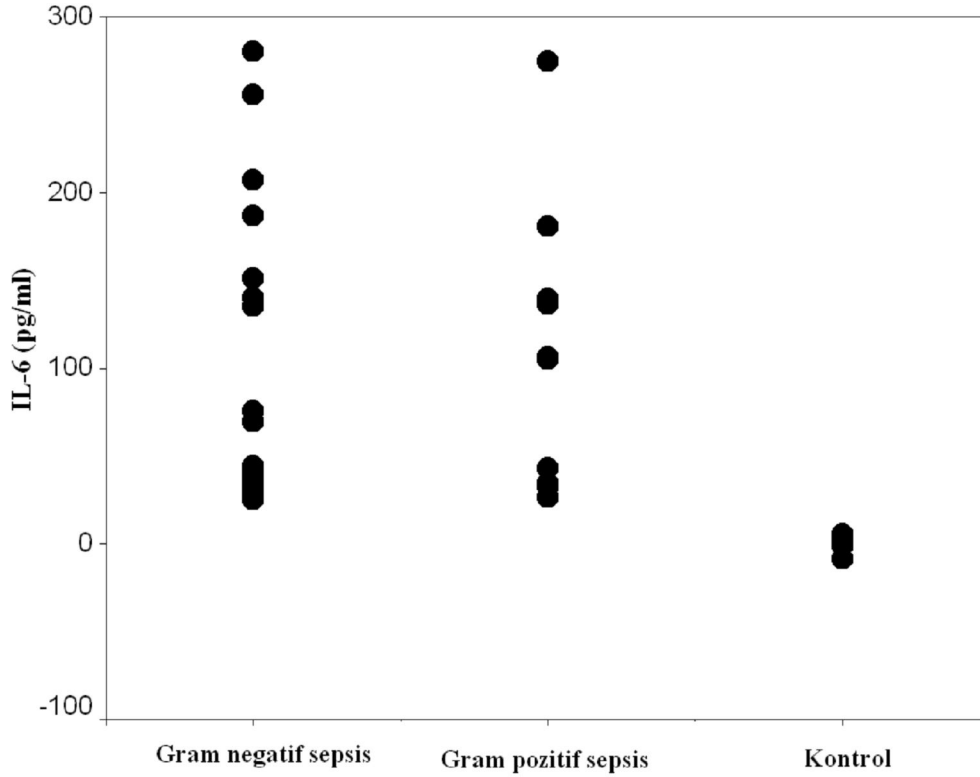
Şekil 14: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda serum IFN- $\gamma$  düzeyleri



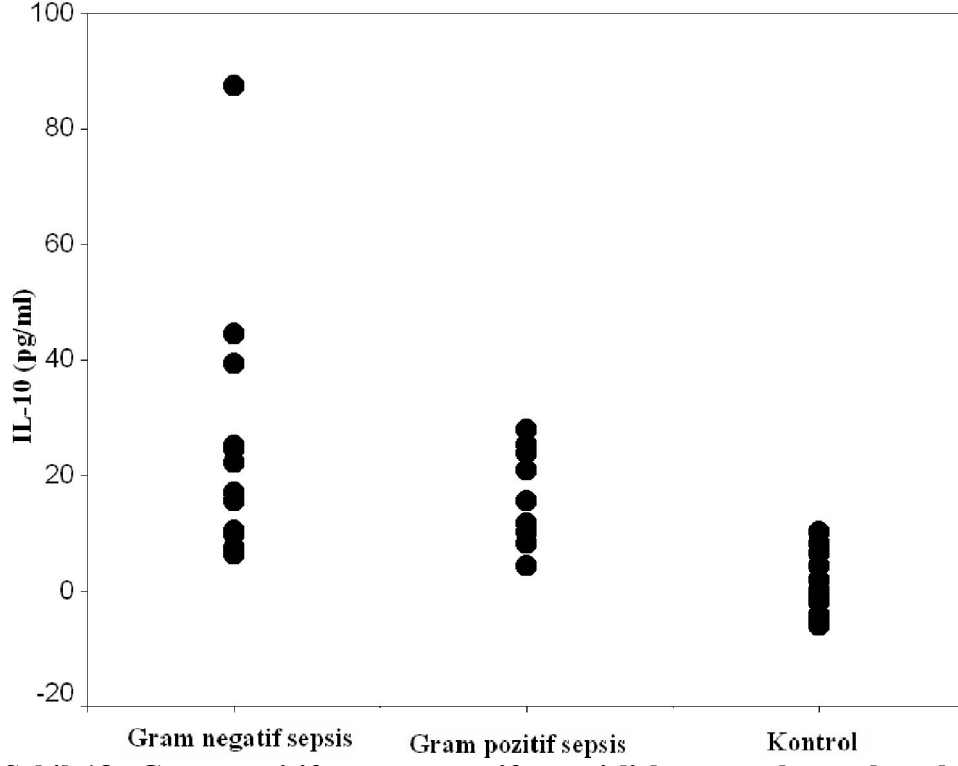
Şekil 15: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda serum IL-1 $\beta$  düzeyleri



Şekil 16: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda serum IL-2 düzeyleri



Şekil 17: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda serum IL-6 düzeyleri



**Şekil 18: Gram pozitif, gram negatif sepsisli hasta ve kontrol grubunda serum IL-10 düzeyleri**

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Sepsis; mortalite ve morbidite açısından oldukça önemli bir hastalık olup; sadece Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 750 000 yeni olgu görülmekte ve 215 000 ölüme sebep olmaktadır(54).

Ağır sepsis ve septik şoklu hasta sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu durum insanların daha uzun süre yaşamasına, hastalara yapılan girişimlerin (allojenik kan transfüzyonu, endotrakeal entübasyon, invazif santral venöz katater kullanımı, uzamış ventilasyon), agresif kanser tedavisine bağlı gelişen immün supresif durumların ve HIV prevalansının artmasına bağlıdır.(78).

Sepsis; myokard enfarktüsü, inme gibi toplumda sık olarak görülen hastalıklardan daha fazla görülür. Bu açıdan da oldukça önemli bir sağlık sorunudur(67,109).

Sepsis, enfeksiyonla birlikte SIRS varlığıdır. Ayrıca pankreatit, iskemi, travma, doku hasarı, hemorajik şok, yanık, ekzojen TNF $\alpha$  kullanımı gibi bazı non enfeksiyöz durumlarda da septik şok görülmektedir(89).

Sepsise karşı gelişen immün yanıtın bütün ayrıntıları tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin birarada bu savunmada yer aldığı bilinmektedir.

Sepsis immünpatogenezinin açıklığa kavuşması, olası terapötik hedeflerin belirlenmesi ve kişiye özgül tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Sepsisin immunopatogenezine baktığımızda nötrofil, monosit, makrofaj serisi gibi immün hücrelerin ve endotel, epitel gibi parankimal hücrelerin aktivasyonu temel nokta olarak rol oynamaktadır(110). Proenflamatuvar mediyatörlerin ve sitokinlerin salıverilmesi kompleman yolağının, koagülasyon-fibrinolitik sistem aktivasyonu ve nöroendokrin reflekslerin devreye girmesinin sepsis fizyopatolojisindeki karmaşık yapıyı oluşturduğu görülmektedir(104).

Enfeksiyon odağı çoğu kez solunum yolları, abdomen ve üriner sistemdir(25,99). Katater takılı, parenteral nütrisyon tedavisi alan, kan nakli hastaları, cerrahi diren takılı hastalar, yanık ve travma hastaları sepsis açısından riskli gruplardır. Tüm bu hastaların ortak özellikleri çoğunlukla yoğun bakımda yatan hastalar olmalarıdır.

1980'li yıllarda sepsiste en sık izole edilen etken gram negatif bakterilerken özellikle nozokomiyal enfeksiyonların artmasından sonra gram pozitif bakteriler ön plana çıkmaktadır(2,66,85). Mikrobiyolojik etkenlerin belirlenmesi hem fizyopatolojinin daha iyi anlaşılması bunun sonucunda da yeni tedavi yaklaşımlarının bilinmesi açısından önemlidir. Buna rağmen olguların ancak yarısında mikrobiyolojik etken ayırt edilip tanımlanır.(104) Etyolojiye baktığımızda etkenin %90 oranında bakteriler olduğunu görmekteyiz. Ancak immüsupresyon gibi bazı durumlarda mantarlarda etken olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamıza sepsis tanısı almış 26 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların kan kültürlerinde; on altı tanesinde gram negatif, on tanesinde ise gram pozitif bakteri izole edilmiştir. Buna göre sepsisli hastalarda %61,5 oranında gram negatif, %38,4 oranında gram pozitif mikroorganizma etken olarak izole edilmiştir.

Hastaların klinik durumu etken olan mikroba ve hastanın daha önceki klinik durumuna bağlı olarak da değişebilir. Yapılan çalışmalarda mortalitenin gram pozitif sepsisli hastalarda gram negatif sepsisli hastalardan biraz daha yüksek olduğu bulunmuştur(25,,85,99).

Olası tesbit edilecek etkene yönelik antibiyotik tedavisi, kaynağın kontrolü açısından lokal enfeksiyon odağının kontrol altına alınması, enfeksiyon kaynağının bir katater olduğu düşünülüyorsa, kataterin en kısa sürede değiştirilmesi amaçlanmalıdır.

Günümüzde yoğun bakımda yatan sepsis hastaları için geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi, hematolojik, kardiovasküler, metabolik ve solunum yönünden destekleyici standart bir tedavi paketi vardır. Ancak bu standart tedaviler ile alınan sonuçlar farklılık gösterebilmektedir(88,111).

Sepsisin patofizyolojisi mikroorganizma ve ya endotoksin gibi bazı sinyal moleküllerine karşı konağın verdiği yanıttır. Enfeksiyona yeterli immün yanıt, doğal ve özgül immün sistem arasındaki etkileşimi gerektirir.

TNF  $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinlerin baskın olduğu dönemin ardından IFN  $\gamma$ 'nın azalması IL-10 ve TGF  $\beta$  gibi antienflamatuvar sitokinlerin arttığı bir başka döneme geçilebilir. IL-10 antienflamatuvar sitokinlerin en tipik örneğidir. Bu yanıtlara ek olarak metabolik aktivitede belirgin bir artış (kortizol üretiminde artma, katekolamin salınımında artma), akut faz proteinlerinin uyarılması endotel aktivasyonu, adezyon moleküllerinin artışı, prostanoidler ve trombosit aktive edici faktörün salınımı da meydana gelir. Burada olay sepsisle indüklenen sistemik enflamatuvar yanıt sendromunun karşı enflamatuvar mekanizmalarla kontrol altında tutulmasıdır. Bu karşı enflamatuvar yanıt 'kompansatuvar karşı enflamatuvar yanıt sendromu' denir (CARS) (compensatory anti inflammatory response syndrome) Bu cevaptaki amaç; artmış konak enflamatuvar yanıtından organları korumaktır.. Bu immünsupresif etki sonucu doğal immün yanıtın parçaları olan fagositoz, proenflamatuvar sitokin üretimi, monosit ve makrofajlarca antijen sunumu, adezyon ve migrasyon, nötrofillerde oksidatif patlama ve dolaşımdaki NK hücreleri azalır. Dolaşımdaki CD4<sup>+</sup> T lenfositlerin azalması Th2 fenotipine dönmeleri, hücre aracılı immün yanıtın baskılandığının bir göstergesidir. Sepsiste sadece T lenfositler değil B lenfositlerde de azalma görülebilir. Septik hastalarda bağışıklığın baskılanmasının önemli bir nedeni de lenfosit apoptozisidir. İlginç olarak lenfosit apoptozisinde benzer artış yoğun bakımda yatan ancak sepsis olmayan hastalarda da görülür. Sepsisli hastalar genelde lenfopeniktir. Ek olarak bu hastalarda B ve CD4<sup>+</sup> lenfosit subgruplarında da azalma görülür. Sonuç olarak bu karşı enflamatuvar yanıt, immün yanıtın baskılanmasına sebep olarak sekonder enfeksiyonlara zemin hazırlayabilir. Bu durum aynı zamanda daha sonra ortaya çıkabilecek organ

yetmezliğinin oluşumuna da neden olabilir.Özellikle kötü prognozla giden sepsisli hastalarda CD4<sup>+</sup> T ve aktive CD3<sup>+</sup> T lenfositlerin azaldığı görülmüştür(54,56,57,58,60,101).

Sepsisli hastalarda oluşan immünojik değişiklikleri belirlemek için yaptığımız çalışmada; sepsisli hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunda periferik kandan mononükleer hücre izolasyonunu takiben, total T hücre belirteci olan CD3; yardımcı T hücre belirteci olan CD4; sitotoksik T hücre belirteci olan CD8; B hücre yüzey belirteci olan CD19; monosit belirteci olan CD14; NK hücre yüzey belirteci olan CD16 ve CD56; düzenleyici T hücre belirteci olan CD4/CD25' in ifadenmesi incelenmiştir. Ayrıca sepsis sırasında T hücrelerinde aktivasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla CD69 yüzey belirtecinin ifadenmesi incelenmiştir.

Çalışmamızda hem total T hücre yüzdesinde hem de yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücre yüzdesinde sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde bir azalma olduğu görülmüştür (p<0,001).Yani sepsis sırasında T hücre yüzdesinde genel bir azalma olduğu belirlenmiştir. Ancak T hücre yüzdesi açısından gram pozitif ve gram negatif sepsisli hasta grupları arasında fark gözlenmemiştir (p>0,05).

Holub ve ark yaptığı bir çalışmada sepsisin başlangıcında T hücre sayısındaki azalmanın geçici olduğu ve hastanın klinik durumunun ciddiyeti ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Hastalığın akut fazındaki bu lenfosit azalması apoptozise bağlanmıştır. Total CD4<sup>+</sup> T, CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin tekrar normale dönmesi; doku ve lenfatik sistem arasındaki yoğun trafiği yansıtmaktadır(53).

Dolaşımdaki T lenfositlerinin azalması, bakteriyel sepsisin veya enfeksiyonun erken dönemindeki strese bağlı olarak organizmadan salınan yüksek doz kortikosteroid ve TNF $\alpha$ 'ya da bağlı olabileceği düşünölmektedir.

Dolaşımdaki T lenfositlerin ve bunların alt gruplarının tekrara normale dönmesi sepsisin bakteriyel kökeniyle ilişkilidir. T lenfosit sayısının ve alt gruplarının normale

dönmesi ve CD4<sup>+</sup> T lenfositlerde normalin üstünde bir artış, genellikle gram negatif mikroorganizmaların sebep olduğu sepsislere özgü bir durumdur. Gram negatif sepsisin patogenezesinden, başlıca endotoksin sorumludur. Endotoksin antijenik peptidlerle sinerjik etki yaparak T lenfosit proliferasyonunu artırır ve kana karışmasını sağlar. Bazı gram pozitif sepsisli hastalarda da T hücrelerinde poliklonal artış saptanırken bunların oranının gram negatiflere göre daha az olduğu bildirilmiştir(54).

Biz çalışmamızda; CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T hücre yüzeylelerinde sepsis sırasında bir azalma olduğunu ancak gram pozitif ve gram negatif sepsisli hasta grupları arasında anlamlı bir farklılaşmadığını belirledik.

CD3/CD56/CD16 bir NK hücre yüzey belirteçidir Holub ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada NK hücre sayısındaki azalmanın sepsisin bakteriyel kökeniyle ilişkili olduğu tesbit edilmiştir. Gram pozitif sepsisli hastalarda dolaşımda bulunan NK hücre sayısının gram negatif sepsisli hastalara kıyasla daha fazla düştüğü görülmüştür. Bunun sebebinin ağır gram pozitif sepsisin sebep olduğu enfeksiyonun ortadan kaldırılması için daha organize bir cevap verilmesi olduğu düşünülmektedir. Gram negatif bakteriler ise kompleman ve antikorlarla kolayca ortadan kaldırılabilirler. NK hücreleri aktive olduktan sonra apoptozisle ortadan kaldırılırlar. Böylece fazla IFN $\gamma$  üretimi önlenmiş olur. IFN $\gamma$  aktivasyon sonrası ortadan kaldırılmazsa; IFN $\gamma$  monosit aktivasyonuna sebep olarak IL1- $\beta$ ve TNF- $\alpha$  gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olur. Diğer taraftan da NK hücrelerinin apoptozisinin artmış olması dolaşımdaki NK sayısının da düşmesine yol açarak immün supresyonun önemli bir belirteci olarak karşımıza çıkmaktadır(54).

Hotchkiss ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada septik hastalarda, post mortem alınan dalak hücrelerinde NK hücre artışı görülmüştür. Ancak bu artış kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmamıştır(55).

Streptokoklarla yapılan deneysel hayvan çalışmalarında NK hücre sayısındaki artışın hızla ölüme gidişe sebep olduğu görülmüştür. İki çalışma arasındaki bu farkın bakteriyel köken farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir. Bourboulis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hastalarda etken olarak gram negatif bakteriler izole edilmiştir(22).

Biz çalışmamızda NK hücre sayısını sağlıklı kontrollerle kıyasladığımızda anlamlı bir fark gözlemedik. Ancak sepsis sırasında oluşan genel immün supresyon nedeniyle hastalığın ileriki dönemlerinde alınacak örneklerde NK hücrelerinde bir azalma görülebileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmada sepsis sırasında T lenfosit yüzdelerinde sağlıklı kontrollere göre belirgin azalma saptanmış olmasına rağmen B hücre yüzey belirteci olan CD19 ifadenmesinde bir artış gözlenmiştir. CD19 bir çok B hücresinde bulunan Ig süperailisine ait bir hücre yüzey belirtecidir.

Holub ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sepsisli hastalarda T lenfosit hücre yüzey belirteçlerinden CD3, CD4 ve CD8' in ifadenmesinin azaldığı, B lenfosit belirteci olan CD19' un ise belirgin olarak arttığı, NK hücre yüzey belirteci olan CD3/CD16/CD56'nın, bizim çalışmamızda gözlemediği gibi değişmediği görülmüştür. Araştırmacılar total T hücrelerindeki bu düşüşün büyük olasılıkla CD4<sup>+</sup> T lenfositlerin resirkülasyonuna bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu durum sepsis sırasında salınan stres hormonları, sitokinler, PgE2, kortizol, IL-10 gibi diğer humoral faktörler tarafından oluşturulmuş olabilir. Bu çalışmanın sonuçları da bizim bulgularımızı destekler niteliktedir(53).

Bu hipotez deneysel olarak endotoksinin verilmesinin ardından SIRS'lı hastaların dolaşımındaki CD4<sup>+</sup> T lenfositlerin azalarak duktus torasikustaki konsantrasyonunun arttığına da gözlenmesi ile desteklenmiştir(61). T lenfositlerdeki bu azalma IL-2'nin azalmış üretimi ile ilişkili olabilir. Yanık ve cerrahi sonrası IL-2 üretimi azalır. IL-2 T lenfosit proliferasyonunu düzenler. Yetersiz IL-2 üretimi T lenfosit proliferasyonunda ve

aktivasyonunda azalmaya neden olabilir .Sonuçta T ve B lenfosit arasındaki iletişim bozulduğunda kazanılmış immün yanıtta bir gecikme söz konusu olur. B lenfositlerdeki belirgin artış bu hücrelerin daha iyi antijen sunmasına sebep olarak dolaylı bir feed back mekanizma ile antikor üretiminde artışa sebep olur. T ve B lenfosit oranlarındaki bu değişiklik PGE2 aktivitesinin bir sonucu olabilir. PGE2 aynı zamanda T lenfosit mitogenezi inhibe eder ve Th2 cevabını artırır. Th2 lenfositlerde prensip olarak B lenfositlerin antikor üretimini artırır. Ancak bu lenfosit alt gruplarının sepsis immünopatogenezindeki etkilerinin belirlenmesi için fonksiyonlarının daha detaylı incelenmesi gerekmektedir (53).

CD69<sup>+</sup>; T lenfositlerde ve NK hücre yüzeyinde ifadelenen en erken hücre yüzey belirteçidir (activation inducer molecule, AIM). 28 ve 32 kilodaltonluk homodimerik zinciri olan C-tipi bir lektindir. Temel kaynağı aktive olmuş lökositlerdir. Sinyal iletiminden sorumludur(2). Bu nedenle CD69, erken aktivasyon için bir indeks olarak kullanılır. Çünkü TCR'nin uyarılmasının ardından iki saat içinde CD69, T hücre yüzeyinde ifadelenir. Akut enflamatuvar hasarda, T lenfosit yüzeyinde CD69 ifadelenmesi artar. CD69'un hücre yüzeyinde ifadelenmesi sadece bakteriyel enfeksiyonda değil bazı viral enfeksiyonlarda da artış gösterir(43).

Scott ve arkadaşları farelerde oluşturdukları polimikrobiyal sepsiste NK hücrelerinde CD69 düzeyini artmış bulmuşlardır(100). Çalışmamızda hem CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde hem de CD8<sup>+</sup> T hücrelerinde aktivasyon belirteci olan CD69 yüzdelерinin sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak artış olduğu gözlenmiş ve dolayısıyla hem gram pozitif hem de gram negatif sepsis sırasında T hücrelerinde bir aktivasyon olduğu düşünülmüştür.

Bakteriyel tanıma ve artmış hücresel aktivasyon, enfeksiyonun konak tarafından kontrolünün sağlanmasında en önemli basamaklardır. Bu tanıma CD14 ve TLR aracılığı ile olur. Bu nedenle CD14 immün yanıtın önemli bir mekanizmasıdır. CD14 pozitif gram negatif, gram pozitif ve fungal yapılara karşı savunma yanıtı oluşturan bir monosit yüzey belirteçidir.

CD14 monosit, makrofaj ve granüositlerde hücre yüzeyinde; serumda ise çözünür formda bulunur. LPS ve LPS bağlayıcı protein kompleksine bağlanır.LPS ile başlatılan makrofaj aktivasyonu için gereklidir. Brunialti ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada sepsisli hastalarda monosit yüzeyinde CD14 ekspresyonunu azalmış olarak, serumdaki çözünür CD14' ü ise artmış olarak bulmuşlardır(26).

Werra ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada septik şoktaki hastalarda monositlerin mikrobiyal ürünlere (LPS, gram negatif, gram pozitif) karşı refraktör bir yanıt sergilediklerini ve bu fonksiyonel yanıtınlığın dolaşımında yüzeyinde CD14 ifade eden monositlerdeki azalmayla ilişkili bulunduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar CD14 ile birlikte TNF- $\alpha$  düzeyini de düşük bulmuşlardır. Araştırmacılar TNF- $\alpha$  düşüklüğün CD14 azalmasıyla ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdi(115). Çalışmamızda biz de yukardaki çalışmayla uyumlu olacak şekilde CD14 ifadenmesinde sepsisli hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeylerde bir azalma belirledik.Şok sırasında monosit apoptozisinin tetiklendiği bildirilmiştir.. Ayrıca antienflamatuvar yanıtın CD14 ifadenmesini azalttığı ve monosit apoptozisine yol açtığı öne sürülebilir(115).

Septik şoklu hastaların tersine bakteriyel pnömonisi olan ve kardiojenik şoklu hastalarda ise monosit sayısı ve CD14 ifadenmesi normal bulunmuştur.(İ) Ancak bu hastalarda LPS'ye karşı azalmış yanıt dikkat çekmiştir. Sonuç olarak LPS, peptidoglikan, gram pozitif ve gram negatif bakteriler CD14 bağımlı sinyalizasyon mekanizmasını kullansalar da monositlerdeki fonksiyon bozukluğunu CD14 azalması dışında açıklayacak başka bir mekanizma olmalıdır. Bu hastaların katekolaminlerle tedavi ediliyor olması ve katekolaminlerin monosit aktivasyonunu azaltması bir neden olarak gösterilebilir(115).

Sepsisli hastalardaki lenfosit popülasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda pek çok farklılık göze çarpar. Bu değişiklikler çoğunlukla yardımcı T ve B lenfositlerin azalması şeklindedir(53).

Bu değişikliğin sepsisin hangi aşamasında geręekleřtięini tesbit etmek m¼mk¼n olmasa da; bu değişiklikler hastayı başka enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale getirdiğinden oldukęa ¼nemlidir. Bourboulis ve arkadaşlarının yaptığı ęalıřmada CD3 ve CD4'¼n azaldığı, NK h¼cre sayısının arttığı; hatta bunun hastaların mortalitesini de oldukęa etkilediği g¼r¼lm¼řt¼r. NK h¼cre populusyonununun %20 den daha fazla olduğu hastalarda sağ kalım daha fazla bulunmuştur. Bu hastalarda CD4 sayısı azalmış bulunmuştur. Bunun sebebinin de artmış apoptozis olduğu d¼ř¼n¼lm¼řt¼r. Ayrıca bu ęalıřma CD4<sup>+</sup> lenfopenisini g¼steren ilk ęalıřma olmuştur. Yine bu ęalıřmada CD19 ifadelenenmesinin değişmediği bulunmuştur(22).

CD4/CD25 T h¼creleri pek ęok farklı dokuda tanımlanmış olup periferdeki CD4 T<sup>+</sup> h¼crelerinin %5-10 unu oluşturur. Antijenle karşılaştıktan sonra imm¼n yanıtı veren h¼creler aktivasyon, farklılaşma (TCR affinitesi, apoptoz) ęeřitli kostim¼lat¼r molek¼lerle (membrana bağlı ya da ęöz¼n¼r) ve CD4<sup>+</sup> T lenfositlerin farklı sitokinleri ifade eden alt gruplara farklılaşması gibi pek ęok yoldan geçerler(47).

İlk defa 1960' lı yıllarda baskılayıcı fonksiyonları olan CD8<sup>+</sup> T h¼crelerinin bulunmasıyla T h¼crelerin imm¼n yanıtta sadece aktivat¼r değil aynı zamanda da inhibit¼r olabileceği ortaya konmuştur. 1980' li yıllarda CD8'lerden bağımsız olarak CD4 T lenfositlerinde supres¼r fonksiyonları olabileceği ortaya ęıkmıřtır. Bu gelişmelerden on yıl sonra Sakaguchi ve arkadaşları bu supresyonu CD4<sup>+</sup> T lenfositlerin de bir alt grubu olan CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T h¼crelerinin yaptığını bulmuştur. T¼m bunlarla birlikte Treg yani T reg¼latuar h¼crelerle ilgili araştırmalar yoğunlaşmıştır(108).

Treg'ler yapısal olarak y¼zeylerinde y¼ksek miktarda IL2R  $\alpha$  zincirini, CTLA4 ve glikokortikoitle ind¼klenmiř TNFR ifade eden h¼crelerdir.  $\alpha$  zinciri IL-2 için y¼ksek affiniteli bağlanma b¼lgesidir(47).Ancak yine de Tregleri aktive CD4<sup>+</sup> ya da Th3 h¼crelerinden ayırmaya yarayan bir spesifik y¼zey resept¼r¼ mevcut değildir. CD25 molek¼l¼ aktivasyon sonrası t¼m aktif CD4<sup>+</sup> h¼crelerinde artar. Son yıllarda 'Foxp3' denilen yeni bir molek¼l

bulunmuştur. Bu molekül DNA bağlayan transkripsiyon faktörlerinden Forkhead ailesinin bir üyesi olup sadece aktif CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T hücrelerinde bulunur. Naiflerde yoktur. Bunun sonucunda Foxp3 ifadenmesinin Treg'lerin supresif aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Son yıllarda CD127 ifadenmesinin de Treg'leri diğer efektör T hücrelerden ayırmada yararlı olabileceği düşünülmektedir(117).

Treg'ler doğal ve adaptif immun cevabın kontrolünde önemli görevlere sahiptir. Bu hücreler in vitro antijenik uyarıya cevapsız olup, in vivo olarak çoğalarak CD4<sup>+</sup> ve CD8 T<sup>+</sup> hücreler tarafından oluşturulan cevabı baskırlar. Bu baskılamada dört farklı mekanizma düşünülmektedir. İn vitro olarak bakıldığında bunların supresif etkileri hücre-hücre temasına bağlı olup bu temas CTLA4, GITR (Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor) ya da hücreyle ilişkili TGF  $\beta$  ekspresyonu ile olmaktadır. Bunun sonucunda hedef hücrede IL-2 ifadenmesi azalır. Tregler aynı zamanda bu supresör fonksiyonlarına katkı amacıyla IL-10, TGF  $\beta$ , IL-4, IFN  $\gamma$  gibi immünoreglatuvar sitokinler salgırlar. Son olarak Tregler sitotoksik etkili olabilirler ve hedef hücrede apoptozisi arttırabilirler.

Tregler enfeksiyon hastalıkları kadar; otoimmünite, kanser, allerji ve transplantasyonda da bazı rollere sahiptir. LPS'ler Tregleri TLR aracılığı ile nonspesifik olarak uyarırlar. Enfeksiyonun tipine, aktivasyonun zamanlamasına, yeterli bir antienfeksiyöz immun yanıtın varlığına bağlı olarak Tregler enfeksiyon hastalıklarında olumlu ya da olumsuz sonuçlara sebep olabilirler. Treglerin etkisinde en önemli olan faktör Treg sayısının efektör T hücrelerine oranıdır. Monneret ve arkadaşları ilk defa septik şoklu hastalarda kan dolaşımında Treglerin yüzdesinin artmış olduğunu göstermişlerdir.

Decker ve arkadaşları, abdominal cerrahi geçiren hastalarda; dolaşımında ve periton sıvısındaki Treg'lere bakmışlardır. Sonuçta periton mayisinde daha fazla miktarda Treg bulunmuştur. Bu da Treg'lerin özellikle inflamasyonun olduğu bölgeye göç ettiklerini göstermiştir. Tregler ayrıca yanıklardan sonra Th1 cevabını baskırlar(108).

Yapılan çalışmalarda  $CD4^+/CD25^+$  T reglerin bu fonksiyonuna IL-10'la uyarılmalarının katkıda bulunduğu gösterilmiştir. IL-10 ile uyarılmış Tregler immun supresyonda çok önemli role sahiptir. Aynı zamanda IL-10 artışı sepsiste mortaliteyi de artırır. Bu bulguların tersine  $CD4^+/CD25^+$  T reglerin azalması bazı durumlarda koruyucu da olabilmektedir. Ancak yapılan hayvan çalışmalarında Treg'lerin azaltılmasının sağkalm üzerine bir etkileri olmamıştır.

Wisnoski ve arkadaşları  $CD4^+/CD25^+$  T hücrelerin immüsupresif etkilerini incelemek amacıyla farelerde sepsis modeli oluşturarak kanda ve dalak hücrelerinde fenotipik ifadelenmelerine bakmışlardır. Ayrıca IL-10 ile bu hücrelerin immüsupresif etkileri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Sonuçta IL-10 'nun Treg'lerin immüsupresyonuna katkıda bulunduğu ancak Treglerin ortadan kaldırılmasının yaşam süresine olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır(117).

Biz çalışmamızda hem  $CD4/CD25$  hem de  $CD8/CD25$  ifadelenmesini artmış olarak bulduk. IL-10 düzeylerini de her iki sepsis grubunda artmış bulduk.

Son yıllarda pek çok bakteriyel antijenin (endotoksin dahil) tanınmasından sorumlu olan yüzey molekülleri bulunmuştur. Toll benzeri reseptör denen bu yapılar son on yılda biyokimyasal ve hücre düzeyinde araştırılmaktadır. Toll domain sinyal iletisini sağlayan protein- protein ilişkisi bulunan bir yapıdır.

Memelilerde tanımlanmış on tane TLR mevcuttur. TLR 1 ve TLR 6 tek başlarına sinyal iletmezler ancak TLR 2 ile ortak çalışırlar. TLR3, TLR5, TLR9 en dar ligand özgüllüğüne sahiptirler. TLR 7 için henüz bir ligand bulunmamıştır. Aynı şekilde TLR 8 ve TLR 9 unda fonksiyonları açık değildir(18).

LPS ve diğer bakteri ürünleri hücre yüzeyindeki TLR ifadelenmesini değiştirebilirler(26).

Sepsis sırasında TLR2 ve TLR 4'ün monosit yüzeyinde ifadenmesi bu reseptörlerin bakteriyel ürünler için 'patern tanıyıcı reseptörler' 'PRR' olmalarından dolayı oldukça ilgi çekmektedir. Bu reseptörlerin ifadenmesindeki değişiklikler monosit cevabını da direkt olarak etkilemektedir. LPS'ye karşı tolerans oluşturulmuş farelerde TLR 4 ifadenmesi azalmıştır. Ancak insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar alınmaktadır. Adib-Conquy ve arkadaşları major travma geçirmiş hastalarda TLR4 ifadenmesini azalmış bulurken; TLR2 ifadenmesinde bir değişiklik görememişlerdir. Sepsisli hastalara yapılan diğer bir çalışmada TLR2, TLR 4 düzeylerinde bazı hastalarda artış gözlenirken bazılarında hiç bir değişiklik gözlenmemiştir(26).

TLR 4, LPS için başlıca tanıma reseptörü olarak bilinse de, TLR 2' nin de LPS'ye yanıt verebildiği bilinmektedir

Tsujimoto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sepsisli hastaların periferik kan monositlerinde TLR4' ün arttığı gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar yaygın peritonit oluşturulmuş farelerin dokularında da bu artışın gözlendiği vurgulamışlardır(105).

TLR 4; monosit, makrofaj, solunum yolu epiteli, endotel ve düz kas hücrelerinde ifadenmektedir. Gram negatif bakterilerle enfeksiyon sonrası kan monositleri ve doku makrofajları aktive olur. Bu aktivasyon LPS aracılı TLR 4 reseptör sinyalizasyonu ile olmaktadır. TLR 4'ün hem enflamatuvar hücrelerde hem de endotelde ifadenmesi enflamatuvar yanıtın gelişiminde kritik noktadır. Andonegui ve arkadaşları TLR 4'ün özellikle endotel hücreleri üzerindeki ifadenmesinin endotoksin verilmesinin ardından akciğerlerde nötrofil artışında önemli rolü olduğunu göstermişlerdir. TLR4 ve LPS ilişkisi bilinmekle birlikte TLR4 aynı zamanda fibronektin, fibrinojen, hyalünorik asit gibi endojen ve ekzojen maddelerle de bağlanırlar(105).

Viemann ve arkadaşları ilk kez sağlıklı erişkinlerle kıyaslayarak sağlıklı neonatallerde TLR2 ifadenme eksikliği göstermişlerdir. TLR2'nin bazal ifadenmesi neonatallere ait

fagositlerde azalmış bulunurken, TLR 4 ifadenmesinde bir değişiklik bulunmamıştır. Sepsisli neonatalere bakıldığında ise semptomların başlangıcında TLR 2 ifadenmesinin arttığı ve bu artışın CRP ve IL-6 artışı ile uyumlu olmasının TLR 2'nin bir erken tanı belirteci olarak kullanılabilceğini göstermektedir. TLR 4 ifadenmesine bakıldığında ise belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. TLR2 ve TLR4 ifadenmesi arasındaki bu farkın TLR4'ün daha çok gram negatif bakterilere ait parçalarla bağlanarak sinyal iletmesi ancak neonatallerdeki sepsisin etyolojisinde gram pozitif bakterilerin yer almasından kaynaklanabilir(5).

Harter ve arkadaşları sepsisli hastaların monositlerinde kontrollere göre belirgin olarak TLR2, TLR4'ün ifadenmesinin arttığı görülmüştür. Araştırmacılar yaşayanlarla, yaşamayanlara baktıklarında TLR2 , TLR4 ifadenmesi açısından bir fark görmemişlerdir.

Bizde çalışmamızda sağlıklı kontrollerle karşılaştığımızda TLR4' ün özellikle gram negatif sepsisli hastalarda arttığını; TLR2' nin ise gram pozitif sepsisli hastalarda arttığını bulduk.

TLR ifadenmesinin mekanizması ve hastalığın gidişatı arasındaki ilişki hakkında kesin bir yorum yapmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çoklu organ yetmezliği sendromu, sepsisteki yüksek mortalite düzeyinin en önemli sebebidir. Çoklu organ yetmezliği sendromunun patogenezi henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da pro ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki bir dengesizlikten kaynaklandığı düşünülmektedir(1,100).

Sepsiste organizmada görülen hemodinamik, metabolik ve immün değişiklikler hücreler arası sinyal iletide rol alan mediyatörler ve sitokinler aracılığı ile olmaktadır. Sitokinler etkilerini sadece sistemik dolaşıma karışarak değil direk hücre -hücre ilişkisi ile ve çok küçük konsantrasyonlarda da ortaya koymaktadırlar. Her ne kadar sitokinler sepsis sürecinde kötüye gidişin etkeni olarak düşünülse de sitokin salınımının bu patofizyolojik süreçte olumlu etkilerinin de olduğu gösterilmiştir(100).

Aktive olmuş T hücreleri sitokin salgırlar. Salgıladıkları sitokinler ya Th1 hücrelerden salınan enflamatuvar özellikteki TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2 ya da Th2'den salgılanan antienflamatuvar özellikteki IL-4 ve IL-10 gibi sitokinlerdir . Harris ve arkadaşlarının pediatrik yoğun bakımda yatan sepsisli infantlarda yaptıkları bir çalışmada hem proenflamatuvar hem de antienflamatuvar sitokinlerin arttığını göstermişlerdir(46). Aktive olmuş makrofajlardan diğer hücre tiplerini aktive eden bir takım çözünür mediyatörler salınır. Bu mediyatörler içinde en iyi tanımlanmış olanlar proenflamatuvar etkileri ile TNF $\alpha$ , IL-1  $\beta$  ve IL-6 dır. Bu sitokinler direk ya da dolaylı olarak önce hücresele düzeyde daha sonrada dokularda bir takım değişikliklere sebep olurlar(18).

IL-10 Aktive makrofaj ve dendritik hücrelerin inhibitörüdür.Doğal bağışıklık olaylarının ve hücresele bağışıklığın kontrolünde rol oynar.,Th2, NK ,B hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanır .Th1,NK ve antijen sunucu hücrelerin üretimini inhibe eder,hücresele bağışıklığı baskılayarak. antienflamatuvar ve immünsupresif yanıtta rol alır(4,15,50,28). IL-10, IL-12 ve IL-18 gibi proenflamatuvar sitokinlerin makrofajlardan salınımını azaltarak proenflamatuvar yanıtın etkilerini antagonize eder(100).

Çalışmamızda ayrıca gram pozitif ve gram negatif hasta gruplarında serum sitokinlerinden TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL1  $\beta$ , IL-2 , IL-6 ve IL10' düzeyleri de incelenmiştirBuna göre ;hem Gram pozitif hem de Gram negatif sepsisli hasta gruplarında kontrol grubuna göre incelenen sitokinlerden TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL1  $\beta$ , IL-2 , IL-6 ve IL10' düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artmış olarak bulunmuştur.Ancak serum IL-2 sitokin düzeyleri sepsisli hasta grubunda ve kontrol grubu arasında farklı olarak bulunmamıştır.

TNF $\alpha$  ve IL-1 proenflamatuvar yanıtı başlatan başlıca sitokinlerdir. Deneysel olarak bu sitokinlerin vücuda verilmesi sepsis benzeri sendroma yol açar. Yine deneysel olarak anti-TNF $\alpha$  verilmesi diğer sitokinlerin uyarılmasını ve sepsis gelişimini önler(82).

TNF  $\alpha$  sıklıkla aktif mononükleer fagositler tarafından üretilen bir sitokindir. Bununla birlikte antijenle uyarılmış T ve B hücreleri, NK hücreleri, mast hücreleri, nötrofiller, fibroblastlar, keratinositler ve tümör hücreleri de bu proteini salgılayabilirler.

TNF  $\alpha$ ; mononükleer fagositer hücrelerden hücre içi amino terminalleri ve geniş hücre dışı karboksil terminalleri olan glikolize olmamış membran proteinleri olarak sentezlenir.

TNF $\alpha$  ve TNF $\beta$  biyolojik etkiler açısından birbirine benzerdir fakat TNF $\beta$  sadece T hücreleri tarafından üretilir. Memelilerde her ikisi de aynı MHC lokusu içinde bulunmaktadır.

TNF  $\alpha$  enfeksiyon alanındaki monositlerin ve nötrofillerin aktivasyonunda ve bu immün hücrelerin mikroorganizmaları eradike edilmesinde önemlidir. TNF  $\alpha$ 'nin çok fazla miktarlarda üretilmesi ateş yükselmesi, karaciğer hepatositlerinden bazı proteinlerin sentezinin artmasına sebep olur. Uzamış TNF  $\alpha$  sekresyonu sonucu çizgili kas ve yağ hücrelerinin zayıflaması sonucu kaşeksi ortaya çıkar. TNF  $\alpha$  nin serum konsantrasyonu daha yüksek düzeylere çıkacak olursa myokard ve düz kas kasılmasını inhibe ederek; kan basıncında azalma, şok, tromboz ve kan glikoz düzeyinde düşme gibi metabolik bozukluklara sebep olabilir. TNF  $\alpha$  genellikle gram negatif bakteriler tarafından oluşturulan septik şok tablosunun başlıca aracısıdır(39).

Erişkinlerde ve çocuklarda yapılan pek çok klinik çalışmada TNF- $\alpha$  ile hastalığın prognozu arasındaki ilişkiye bakılmıştır. TNF- $\alpha$  düzeyiyle mortalitenin doğru orantılı olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi pek çok çalışmada da aralarında bir ilişki bulunamamıştır(82).

TNF- $\alpha$  düzeylerindeki bu farklılıklar TNF- $\alpha$ 'nın endokrin bir hormon olmasından çok parakrin etkili olmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle plazma konsantrasyonları, lokal doku cevabını yansıtmayabilir. Ayrıca hastalardan yapılan tek bir ölçüm, gerçek klinik tabloyu çok yansıtmayabilir. Çalışmalar arasındaki sonuçların uyumsuzluğunun bir diğer sebebi de örneklerin alınma zamanlarındaki farklılık olabilir.

TNF- $\alpha$  sepsisin önemli bir uç mediyatörü olmakla birlikte tanı sırasında dolaşımda bulunan TNF- $\alpha$  düzeyleri hastalığın ağırlığı ile ilişkili bulunmamaktadır(82).

Biz çalışmamızda hem gram negatif hem de gram pozitif sepsisli hastalarda TNF- $\alpha$ 'yı artmış olarak belirledik.Bu durum TNF- $\alpha$  'nın sepsis oluşumundaki etkinliğini göstermektedir.

IL-1 reseptörünün bir Toll domaini vardır, bu nedenle önceleri TLR grubunun içinde değerlendirilmiştir(18).

IL1- $\beta$  sepsis ve septik şoklu hastaların kanında az miktarda bulunur.Ancak dolaşımda gösterildiğinde hastalığın ciddiyeti ile ilişkilidir.Yapılan çeşitli çalışmalarda hastaların IL1- $\beta$  yüzdeleri %21 ile %100 'oranlarında dolaşımda tesbit edilmiş olup ,sadece iki çalışmada mortaliteyle uyumlu olduğu saptanmıştır(82)..Biz de çalışmamızda IL1- $\beta$  düzeylerini sepsisli hasta grubunda artmış olarak belirledik.

Doksanyedi hastanın dahil edildiği bir başka çalışmada sepsisli hastaların sadece %37 sinde IL1- $\beta$  tesbit edilmiş olup bunlarda da yaşayanlarla yaşamayanlar arasında bir fark bulunmamıştır. IL1- $\beta$  dolaşımda nadiren tesbit edildiğinden gidişle ilgili ilişkinin çok açık olmayışından dolayı dolaşımdaki IL1- $\beta$ 'nın sepsiste mortaliteyi tahmin etmek yönünden değeri çok düşüktür(82).

Sonuçlar arasındaki bu uyumsuzluk TNF- $\alpha$ 'daki sonuçların uyumsuz olma sebebi ile aynı olabilir. Hem TNF- $\alpha$  hem de IL1- $\beta$ 'nın dolaşımdaki yarı ömürleri çok kısadır. Protein taşıyıcılara, inhibitör bileşiklere bağlanmaları, lokalize olarak dokularda ya da membranlara bağlı üretimleri de buna katkıda bulunur(82).

Farklı bir çok çalışmada hastalardaki IL-6 düzeyleri %50-%100'oranında artmış olarak tesbit edilmiş olup ,hastalığın ağırlığı ile de ilişkilendirilmiştir. IL-6' nın TNF- $\alpha$  tarafından ve erken dönemde indüklenmesi sepsisin başlangıcında serumdaki IL-6 düzeyinin TNF- $\alpha$ 'nın gücünün bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. IL-6 sağlıklı bireylerde

dolaşımında çok nadiren bulunsa da sepsis, otoimmün hastalıklar, akut doku reddi, iskemi-reperfüzyon hasarı ve pankreatitte düzeyleri belirgin olarak artar(6,26,82).

Gerçekten biz de çalışmamızda IL-6 serum düzeylerini sepsisli hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeylerde yüksek olarak belirledik.Sepsisli hastalarda dolaşımdaki IL-6 konsantrasyonu hastalığın ciddiyeti ile ilişkili bulunmuştur. Ancak IL-6 tek başına sepsise neden olmaz, tek başına hastalara verildiğinde sepsis benzeri belirtilerin görülmediği dikkati çekmiştir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda IL-6' nın nötralizasyonu mortaliteyi bazen artırmış bazen de azaltmıştır. Hem antienflamatuvar hem de proenflamatuvar etkileri olduğundan IL-6 sepsiste bir alarm hormonudur. IL-6 hem otokrin hem parakrin hem de endokrin etkilere sahiptir. T lenfositleri aktive eder. ACTH salınımını uyarır, koagülasyonu artırır, hematopoezi uyarır ve akut faz cevabını uyarır. IL-6'nın esas görevi akut faz yanıtını artırmak gibi gözükse de aynı zamanda IL-1 reseptör antagonistinin salınımını artırarak çözünür TNF- $\alpha$  reseptörünün salınımını uyarır . Bireyler arasında farklar olabilmesi ile birlikte yüksek IL-6 konsantrasyonu çoğunlukla hastalıkta kötü gidişle ilişkilidir. IL-6 konsantrasyonunun  $>1000\text{pg/mL}$  olmasının mortaliteyi artırdığına yönelik çalışmalar vardır(82).

Tip 2 interferon olarak bilinen IFN $\gamma$ ; NK hücreleri, CD4<sup>+</sup> Th1, CD8<sup>+</sup>sitotoksik Tc hücreler tarafından üretilen homodimerik bir proteindir. Th hücrelerinin Th1 alt grubunun belirleyicisi olan sitokindir. IFN $\gamma$  reseptörü tip 2 sitokin ailesine ait homolog iki yapısal polipeptidten oluşmaktadır. Bir parçasına sitokin bağlanır diğer parça sinyal iletiminde rol oynar.

.IFN - $\gamma$  makrofajların uyarılmasında anahtar sitokindir.NK hücreleri ,CD8<sup>+</sup> veCD4<sup>+</sup> pozitif T hücrelerinden salınır.Th1 hücrelerinin Th1 alt grubunun belirleyici sitokindir. Kazanılmış immünitinin olduğu kadar doğal immünitinin de mediyatörlerinden biridir IFN - $\gamma$  nın Th1 indükleyici etkisi indirekttir.IFN - $\gamma$  ile aktive olan makrofajlarda immünglobulinlerin

Fc parçalarına karşı reseptör oluşumu artar. Böylece immün komplekslerin ve antikorla kaplanmış enfeksiyöz etkenlerin ortadan kaldırılması hızlandırılır. Antijen sunucu hücrelerin üzerindeki sınıf 1 ve sınıf 2 MHC moleküllerinin salınımını artırır. Th1 alt grubunun farklılaşmasını uyarırken Th2 alt grubunun farklılaşmasını inhibe etmektedir(38). Th2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederler. NK hücrelerinin sitolitik etkilerini ve nötrofilleri uyarırlar(4,15,28,50,69). Bu sitokinin ana hedefi monosit- makrofaj ve polimorfonükleer lökositlerdir (PMNL). Bununla birlikte bu sitokinin etki alanı trombositler, endotelial ve epitelial hücreler, fibroblastlar, hepatositler, astrositler ve mikroglial hücreler gibi profesyonel olmayan immün sistem bileşenlerini de içine almaktadır. Makrofajların mikroorganizmaları öldürme etkisini reaktif oksijen ara ürünlerini ve nitrik oksit sentezini uyararak artırır. Hücre içi mikroorganizmalara karşı gelişen hücre aracılı bağışıklıkta önemlidir(38).

Çalışmamızda hem gram pozitif hem de gram negatif sepsisli hastalarda IFN $\gamma$ ' düzeyi kontrol grubuna göre artmış olarak bulunmuştur. IFN  $\gamma$  CD4<sup>+</sup>Th1 in ana sitokini, IL10 da Th2 grubu bir sitokindir.

İnsan çalışmalarında IL-10 seviyesindeki artışın sepsisin ağırlığı ve olası şok gelişimi açısından bir indikatör olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda serum IL-10 düzeyleri gram pozitif ve gram negatif sepsis grubunda yüksek olarak bulunmuştur. IL-10 'ün proenflamatuvar yanıtı yeterince kontrol edememesi sepsiste prognozu kötüleştirir. IL-10 bu proenflamatuvar yanıtı kontrol altında tutabilirse çoklu organ yetmezliğinin sebep olduğu morbidite ve mortalite oranı azalır. IL-10'un bakteriyel sepsisteki tedavi edici olası yararı hakkında ise bilgiler çelişkilidir. Farelerde yapılan çalışmalarda IL-10 ile yapılan tedavinin sağ kalımı artırdığı gözlenmiştir. Ancak başka çalışmalardaki sonuçlar bu bulguları desteklememiştir(10).

Serum düzeyi incelenen sitokinlerden sadece IL-2 sepsisli grup ile kontrol grubu arasında fark göstermemiştir. Bu durumun nedeni olarak sitokinlerin serumda kısa yarı ömürlü olması ve hızla yıkılarak serumdan temizlenmeleri rol oynuyor olabilir. Diğer bir faktör de hastadan farklı zamanlarda alınan serum örnekleri ile IL-2 sitokin düzeylerinin takip edilmesi durumunda sitokin düzeylerinde bir değişiklik olabileceği gerçeğidir.

Deneyisel sepsis modellerinde sitokin fırtınasının yani immün sistemin aşırı uyarılmasının ölüme yol açtığı gösterilmiş ve anti sitokin antikorların tedavide mortaliteyi azalttığı saptanmıştır. Oysa klinik çalışmalar bu olguyu desteklememiş ve örneğin meninokoksemi gibi bazı formların dışında sepsiste sitokinlerin yüksekliği ile mortalite arasında korelasyon bulunamamıştır. Sepsis patofizyolojisinde sitokin fırtınası ile ilgili orjinal saptamanın klinikte tam anlamıyla geçerliliğinin olmaması çok önemlidir(33,75).

Çalışmamızda elde edilen verilere göre sepsisli hastalarda TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL1  $\beta$ , gibi proenflamatuvar özellikteki Th1 tip sitokin düzeylerinde hem de IL-6, IL-10 gibi antienflamatuvar özellikteki Th2 tip sitokin düzeylerinde bir artış tesbit edilmiştir. Bu durumda sepsis sırasında Th1 ve Th2 yanıtı arasında karşılıklı bir etkileşim olduğu düşünülmektedir. Muhtemelen sepsisin farklı dönemlerinde bu yanıtlardan biri daha baskın olarak karşımıza çıkacaktır. Ancak sepsis sırasında Th1 ve Th2 tip sitokin profilinde oluşan değişikliklerin sepsis immünopatogenezinde etkin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; sepsis sırasında lenfosit alt gruplarında bir azalma olduğu ve sitokin profilinde önemli değişikliklerin görüldüğü belirlenmiştir ve bu sürecin sepsiste rol oynayan önemli bir mekanizma olduğu düşünülmüştür. Ancak oluşan bu değişikliklerin belirli mikroorganizmalara karşı oluşan bir sonucun özgül konak yanıtının olduğu veya sepsisin patofizyolojisinde etkin rol oynayıp oynamadığının belirlenmesi için daha detaylı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu araştırmalar ,sepsisin tanısında ve tedavisinde çok daha etkili yöntemlerin bulunmasına olanak sağlayacaktır.

**ÖZET****YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN SEPSİS HASTALARINDA LENFOSİT YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN İFADELENMESİ VE SERUM SİTOKİN DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sepsis enfeksiyonla birlikte sistemik enflamatuvar yanıt sendromunun bir arada bulunmasıdır. Son yıllarda insanların yaşam süresinin uzaması, immünsupresif tedavi yaklaşımlarının daha yaygın kullanımı, HIV enfeksiyonundaki artış gibi nedenlerle sepsis sıklığı giderek artış göstermektedir. Sepsis patofizyolojisinin tam olarak aydınlatılması yeni tanı ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda sepsis patofizyolojisinde etkili faktörlerden biri olan immünolojik değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ;sepsis tanısı konulmuş 26 hastada lenfosit yüzey belirteçleri akım sitometrisi ile incelenerek sepsis sırasında lenfosit alt gruplarında oluşan değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca; bu hasta gruplarında serum sitokin düzeyleri ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Hastalardan elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup> total T lenfosit yüzdeleri gram pozitif ve gram negatif sepsisli hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalmış olarak bulunmuştur. (p<0.001)

CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK hücreleri sepsisli hasta grupları ile kontrol grubu arasında fark göstermemiştir

B lenfosit yüzey belirteci olan CD19 sepsisli hasta gruplarında artış gösterirken ;CD14<sup>+</sup>monosit yüzdeleri her iki sepsis grubunda sağlıklı gruba göre azalmış olarak tesbit edilmiştir. Sepsisli hastalarda CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T lenfosit yüzdelerinin artış gösterdiği belirlenmiştir.

CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinde aktivasyon belirteci olan CD69 da bir artış olduğu belirlenmiştir

TLR'lerden TLR-2 ifadenmesi ,gram pozitif sepsisli grupta ;TLR-4 ise her iki sepsisli grupta da artış göstermiş ancak gram negatif sepsisli grupta daha belirgin bir artış saptanmıştır.

Serum düzeyi incelenen sitokinlerden TNF  $\alpha$ ,IFN  $-\gamma$ , IL-1  $\beta$ ,IL-6 ve IL-10 sepsisli grupta yüksek olarak belirlenirken; IL-2 düzeyleri sağlıklı ve sepsisli grup arasında farklı bulunmamıştır.

Sonuç olarak ;sepsis sırasında özellikle periferik kan T lenfositleri ve monositlerde belirgin bir baskılama olduğu ;hem Th1 hem de Th2 sitokin profilinde değişiklikler olduğu tesbit edilmiştir.Bu durum sepsis sırasında oluşan immünolojik değişikliklerin sepsis patofizyolojisinde etkin rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

**SUMMARY****INVESTIGATING THE EXPRESSION OF LYMPHOCYTE SURFACE MARKERS AND SERUM CYTOKINE LEVELS IN PATIENTS WITH SEPSIS IN INTENSIVE CARE UNITS**

Sepsis is defined as the clinical condition characterized by the presence of both infection and the systemic inflammatory response syndrome together. In recent years, with greater life expectancy and age related defects in the human immune system, increased incidence of HIV infections and wider use of immunosuppressive therapeutic modalities give rise in the rate of sepsis.

A better understanding of the pathophysiology of the sepsis is critically important in the context of developing new, future strategies for the diagnosis and treatment of sepsis. For this reason, aim of our study was to investigate immunological changes that are effective factors in the pathogenesis of sepsis.

Lymphocyte cell surface markers were determined in 26 patients with the diagnosis of sepsis by flow cytometry and alterations in lymphocyte sub-populations were searched during the course of sepsis. Additionally serum cytokine levels were measured by ELISA method in all groups.

Our results indicate a statistically significant decreased rates of total CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with gram positive and gram negative sepsis groups compared with healthy control group.(p<0.001)

There was no statistically significant difference between the patient groups with sepsis and healthy controls in terms of NK cell levels.

CD19, the surface marker of B lymphocyte, levels showed an increase in patient groups with sepsis; whereas CD14<sup>+</sup> monocyte rates were lower in both sepsis groups

compared with healthy control group. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T lymphocyte rates were found to be increased in sepsis patients.

CD69 levels, which are activation marker of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, were found to be increased in both sepsis groups.

TLR-2 expression was increased in gram positive sepsis group. TLR-4 was increased in both gram positive and negative sepsis groups but its level was greater in gram negative sepsis group.

TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 levels were determined higher in both sepsis groups when compared with the control group. There was no statistically significant difference in IL-2 levels between sepsis groups and healthy control group.

As a result, there is a significant suppression especially at the levels of peripheral blood T lymphocytes and monocytes during the course of sepsis; and it is determined that there happens changes in both Th1 and Th2 cytokine profiles. This situation considers immunologic changes that happen during the course of sepsis may play an effective role in the pathogenesis of sepsis.

**KAYNAKLAR**

- 1- Aalto H, Takala A, Kautiainen H, Repo H. Laboratory markers of systemic inflammation as predictors of bloodstream infection in acutely ill patients admitted to hospital in medical emergency. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:699-704.
- 2- Abbas AK, Lichtman AH, editors. *Basic Immunology*, 2nd ed., Philadelphia, Saunders, 2004;241.
- 3- Abbas AK, Lichtman AH, editors. *Basic Immunology*, 2nd ed., Philadelphia, Saunders, 2004;30.
- 4- Abbas AK, Lichtman AH, editors. *Cellular and molecular immunology*, 5th ed., Philadelphia, Saunders, 2003.
- 5- Adrie CH, Pinsky MR. The inflammatory balance in human sepsis. *Intensiv Med* 1999;36:419-428.
- 6- Aikawa N, Fujishima S, Endo S et al. Multicenter prospective study of procalcitonin as an indicator of sepsis. *J Infect Chemother* 2005; 11:152-159.
- 7- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002;28:102-121.
- 8- Altunkan Z. Sepsis tanı yöntemleri ve biyomarkerler. *Türkiye Klinikler* 2006;2(32):24-28.
- 9- Amersfoort ESV, Berkel TJC, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and sepsis shock. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16:379-414.
- 10- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.
- 11- Aziz N, Nishanian P, Taylor JM, Mitsuyasu RT, Jacobson JM. Stability of plasma levels of cytokines and soluble activation markers in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1999;179:843-8.

- 12- Bates DW, Pruess KE, Lee TH. How bad are bacteremia and sepsis? Outcomes in a cohort with suspected bacteremia. *Arch Intern Med* 1995;155:593-598.
- 13- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF. Efficacy and safety of recombinant human activated Protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
- 14- Biffl WL, Moore EE, Moore FA. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg* 1996;131:24-30.
- 15- Bilgehan H., *Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilim*. 10.baskı. İzmir:Barış yayınları;2002.
- 16- Biolo G, Toigo G, Ciocchi B. Metabolic response to injury and sepsis: Changes in protein metabolism. *Nutrition* 1997;13(Suppl):52-57.
- 17- Bochud PY, Glauser MP, Caladra T. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med* 2001;27(Suppl 1):33-48.
- 18- Bojorquez L, Gustavo D, Gustavo T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Archives of Medical Research* 2004;35:465-479.
- 19- Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-469.
- 20- Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 1994;15:26-34.
- 21- Bourboulis E, Routsis C, Plachouras D et al. Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock. *Critical Care* 2006;10: No 3
- 22- Bourboulis E, Tsaganos T, Spyridaki E. Early changes of CD4 positive lymphocytes and NK cells in patients with severe gram negative sepsis. *Critical Care* 2006;10(6):R166.
- 23- Brueckmann M, Hoffmann U, Dvortsak E. Drotrecogin  $\alpha$  (activated) inhibits NF-kappa B activation and MIP-1-alpha release from isolated mononuclear cells of patients with severe sepsis. *Inflamm Res* 2004;53:528-533.
- 24- Brun Buisson C, Doyan F, Carlet J, Dellamonica P. Incidence, risk factors, and outcome

of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenterprospective study in intensive care units. JAMA 1995;274:968-974.

25- Brun Buisson C, Doyan F, Carlet J. Bacteremia and severe sepsis in adults: A multicenter prospective study in ICUs and wards of 24 hospitals. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:617-624.

26- Brunialti M, Martins P, Carvalho. TLR2 TLR4 CD14 CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. Shock 2006;25(4):351-357.

27- Brunkhorst FM, Wegscheider K, Forycki ZF, Brunkhorst R. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. Intensive Care Med 2000;26:148-152.

28- Casadevall A. Acquired immunity against fungi. In: Kaufmann H.E., Sher A., Ahmed R., editors. Immunology of infectious diseases. Washington:ASM Press;2003,223-234.

29- Castelli GP, Pognani C, Cita M, Stuani A. Procalcitonin, C-reactive protein, white blood cells and SOFA score in ICU: diagnosis and monitoring of sepsis. Minerva Anestesiol 2006;72(1-2):69-80.

30- Center for disease control:increase in national hospital discharge survey rates for septicemia: United States, 1979-87. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1990;39:31-34.

31- Chiesa C, PellegriniG, Pandero A. C-rective protein, interleukin-6 and procalcitonin in the immediate postnasal period: influence of illnessseverity, risk status, antenatal and perinatal complications and infection. Clin Chem 2003;49:60-8.

32- Çelikel T.Sepsis:Genel bakış. Yoğun Bakım dergisi 2005;5(2):73-74.

33- Deitch EA. Animal models of sepsis and shock:a review and lessonslearned. Shock 1998; 9:1-11.

34- Dockrell DH. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. Journal of

Infection 2001; 42:227-234.

35- EMEA. Opinion of the committee for proprietary medicinal products on the granting of a marketing authorisation for infliximab. CPMP/1478/99-EN;EMEA/H/C/240, ANNEX 1.

1999;EMEA ,London

36- Ertuğrul Ö, Ertuğrul B. Prokalsitonin ve enfeksiyon. Klinik Dergisi 2005;18:59-62.

37- Esen F. Sepsis patofizyolojisine yeni bakış. Türkiye Klinikleri 2006;2(32):21-23.

38- Farmaki E, Roilides E. Immunoterapy in patients with systemic mycoses: a promising adjunct. Bio Drugs 2001;15(4):207-14.

39- Fierro IM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ, Ferreira SH. The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils. Immunology 1996;89(2):295-300.

40- Gay NJ, Ganglogg M, editors. Structure of toll-like receptors. In Handbook of experimental pharmacology,2008;183:181-200.

41- Geerdes HF, Ziegler D, Lode H, Hund M, Loehr A. Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. Clin Infect Dis 1992;15:991-1002.

42- Gerlach H, Keh D. Recent progress in sepsis epidemiology-have we learned enough? Crit care 2003;7:333-4.

43- Green S, PichyangkulS, Vaughn D. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with Dengue hemorrhagic fever. The journal of Infectious Diseases 1999;180:1429-35.

44- Griensven M, Probst C, Muller K,Hoevel P. Leukocyte-endothelial interactions via ICAM-1 are detrimental in polymicrobial sepsis. Shock 2006;25(3):254-259.

45- Harbarth S, Holeckova K,Froidevaux C. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164:396-402.

- 46- Harris M, D'Angio C, Gallagher P, Kaufman D. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis necrotizing enterocolitis or sepsis syndrome correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pediatr* 2005;147:462-8.
- 47- Harvey RA, Champe PC, editors. *Lippincott's Illustrated Reviews:Immunology*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2008;158.
- 48- Harvey RA, Champe PC, editors. *Lippincott's Illustrated Reviews:Immunology*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2008;43.
- 49- Hensler T, Sauerland S, Lefering R, Nagelschmidt M. The clinical value of procalcitonin and neopterin in predicting sepsis and organ failure after major trauma. *Shock* 2003;20(5):420-426.
- 50- Herring A.C., Huffnagle G.B. Innate immunity and fungal infections. In: Kaufmann H.E.,
- 51- Sher A., Ahmed R., editors. *Immunology of infectious diseases*. Washington:ASM Press;2003,127-137.
- 52- Heyland DK, Hopman V, Coe H, Tranmer J, McColl MA. Long term health related quality of life in survivors of sepsis. *Crit Care Med* 2000;289:3599-3605.
- 53- Holub M, Kluckova Z, Beneda B. Changes in lymphocyte subpopulations and CD3/DR expression in sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:657-660.
- 54- Holub M, Kluckova Z, Helcl M. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:202-211.
- 55- Hotchkiss R, Osmon S, Chang KC, Wagner TH. *The Journal of Immunology* 2005;174:5110-5118.
- 56- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-51.
- 57- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE. Depletion of dendritic cells, but not macrophages in patients with sepsis. *J Immunol* 2002;168:2493-2500.

- 58- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166:6952-63.
- 59- Kieft H, Hoepelman AI, Zhou W. The sepsis syndrome in a Dutch university hospital. Clinical observations. *Arch Intern Med* 1993;153:2241-2247.
- 60- Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002;18:487-494.
- 61- Lemaire LC, van Deventer SJ, van Lanschot. Phenotypical characterization of cells in the thoracic duct of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure. *Scand J Immunol* 1998;47:69-75.
- 62- Levy MM, Fink MP, Marshall JC. SCCM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-6
- 63- Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Intensive Care Med* 2003; 29:530-538.
- 64- Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:569-579.
- 65- Linden P, Pasculle A, Manez R. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or Vancomycin-susceptible *E. Faecium*. *Clin Infect Dis* 1996;22:663-668.
- 66- Llewellyn MJ, Cohen J. Tracking the microbes in sepsis: advancements in treatment bring challenges for microbial epidemiology. *Healthcare Epidemiology* 2007;44:000-000.
- 67- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-1554.
- 68- Meissner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful?. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:473-480.
- 69- Mencacci A, Cenci E, Bacci A, Montagnoli C, Bistoni F, Romani L. Cytokines in

candidiasis and aspergillosis. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2000;1:235-251.

70- Mitaka C. Clinical laboratory differentiation of infectious versus no-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clinica Chimica Acta* 2005;351:17-29.

71- Munoz P, Simarro N, Rivera M. Evaluation of procalcitonin as a marker of infection in a nonselected sample of febrile hospitalized patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2004;49:237-241.

72- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA: *Medical Microbiology*. Dördüncü baskı. Mosby, Missouri, 2002;91-146.

73- Müller B, Becker KL, Schachinger H. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2000; 28:977-983.

74- O'Dwyer JM, Mankan AK, Stordeur P. The occurrence of severe sepsis and septic shock are related to distinct patterns of cytokine gene expression. *Shock* 2006;26(6):544-550.

75- O'Reilly M, Newcomb DE, Remick D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock* 1999;12:4111-20.

76- Oberhoffer M, Karzai W, Meier-Hellmann A, Bogel D, Fabinder J. Sensitivity and spesivity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:1814-8.

77- Oda S, Hirasawa H, Shiga H. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome(SIRD/sepsis). *Cytokine* 2005;29:169-75.

78- Opal SM, Girard TD, Ely EW. The Immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clinical Infectious Diseases* 2005;41(Suppl 7):504-512.

79- Opal SM, Fisher CJ, Dhainaut JF. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Crit Care Med* 1997;25:1115-1124.

80- Oral U. Sepsis: Tarihçe ve epidemiyoloji. *Türkiye Klinikleri* 2006;2(32):1-4.

- 81- Orr PA, Case KO, Stevenson JJ. Metabolic response and parenteral nutrition in trauma, sepsis, and burns. *J Infus Nurs* 2002;25:45-53.
- 82- Panacek E, Kaul M. IL6 as a marker of excessive TNF  $\alpha$  activity in sepsis. *Sepsis* 1999;3:65-73.
- 83- Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: A critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805-1812.
- 84- Perl TM, Dvorak L, Hwank T, Wenzel RP. Long term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA* 1995;274:338-345.
- 85- Pittet D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med* 1995;155:1177-1184.
- 86- Pittet D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med* 1995;155:1177-1184.
- 87- Pova P. C-reactive protein: A valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med* 2002;28:235-243.
- 88- Raghavan M, Marik PE. Management of sepsis during the early 'golden hours'. *The J Emergency Medicine* 2006;31(2):185-199.
- 89- Ranger-Frausto MS, Pittet D, Costigan M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *JAMA* 1995;273:117-123.
- 90- Reinhart K, Carlet J. Procalcitonin-a new marker of severe infection and sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:145.
- 91- Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful?. *Crit Care Clin* 2006;22:503-519.
- 92- Reyes CS, Munoz FG, Reyes D, Gonzales G. Role of cytokines (interleukin-1 $\beta$ , 6, 8, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2003;92:221-227.

- 93- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Crit Care Med* 1999;27:887-892.
- 94- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature Medicine* 2003;9(5):517-524.
- 95- Rivers E, Nguyen B, Hanstad S, resseller J. Early goal directed therapy collaborative group:early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-77.
- 96- Romani L. Overview of the fungal pathogens. In: Kaufmann H.E., Sher A., Ahmet R., editors. *Immunology of infectious diseases*, Washington: ASM Press; 2003, 25-37.
- 97- Sakorafas GH. Multipl organ failure syndrome, Monograph, Diaton Ed, Athens 1990,50.
- 98- Sakorafas GH. Multipl organ failure as an indication for exploratory laparotomy. *Iatriki* 1989;56:37-42.
- 99- Sand KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997;234-240.
- 100- Scott M, Hoth J, Turina M, Woods D. Interleukin -10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. *Cytokine* 2006;33:79-86.
- 101- Smith JM, Gamelli RL, Jones SB. Immunologic responses to critical injury and sepsis. *J Intensiv Care Med* 2006; 21:160-172.
- 102- Stein DS, Lyles RH, Graham NM, Tassoni CJ, Margolick JB. Predicting clinical progression or death in subjects with early-stage human immunodeficiency virus (HIV)infection: a comparative analysis of quantification of HIV RNA, soluble tumor necrosis factor type II receptors, neopterin, and  $\beta$  2-microglobulin. *J Infect Dis* 1997;176:1161-7.
- 103- Trager K, Leverve X, Radermacher P. Metabolism in sepsis and metabolic effects of drug therapy. *Advances in Sepsis* 2003;2:118-126.
- 104- Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock;current

pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 2005;11(3):RA76-85.

105- Tsujimoto H, Ono S, Majima T. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 2005;23(1):39-44.

106- van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphism in infectious disease. *Intensive Care Med* 2000;26(Suppl 1):S98-S102.

107- Vandijck DM, Hoste EA, Blot SI. Dynamics of C-reactive protein and white blood cell count in critically ill patients with nosocomial Gram positive vs. gram negative bacteremia: a historical cohort study. *BMC Infectious Diseases* 2007;7:106.

108- Venet F, Chung C, Monnoiret G. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* 2008;83:000 000.

109- Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E. Reducing mortality in sepsis: New directions. *Crit Care* 2002;6(Suppl 3):1-8.

110- Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173: 256-63.

111- Vincent JL, Clausi CM, Bruhn A. Novel therapies in critically ill septic patients.

112- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL. Sepsis in European intensive care units: results of SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34:344-53.

113- Vrecko K, Staedtler P. Periodontitis and concentrations of the cellular immune activation marker neopterin in saliva and urine. *Clin Chim Acta* 1997;268:31-40.

114- Wenzel R. Nosocomial candidemia: Risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995;20:1531-1538.

115- Werra I, Zanetti G, Jaccard C. CD14 expression on monocytes and TNF  $\alpha$  production in patients with septic shock, cardiogenic shock or bacterial pneumonia. *Swiss Med Wkly* 2001;131:35-40.

116- Wheller AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med*

1999;340:207-214.

117- Wisnoski N, Chung C, Chen Y. The contribution of CD4CD25 T regulatory cells to immune suppression in sepsis. Shock 2007;27(3):251-257.

**ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılında Ankara'da doğdum. Orta ve lise öğrenimimi Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesinde tamamladım. 1996 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım. 2002 yılında mezun oldum. 2003 yılında tıpta uzmanlık sınavını kazandım ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında ihtisasa başladım. Evli ve bir çocuk annesiyim. İyi derecede İngilizce bilmekteyim.