

283946

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN
GRAM-NEGATİF BAKTERİLERDEN ENDOTOKSİN SALINIMINA
ETKİLERİ**

Hakan AKINCIBAY

Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Mikrobiyoloji İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

ANKARA

1998

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN
GRAM-NEGATİF BAKTERİLERDEN ENDOTOKSİN SALINIMINA
ETKİLERİ**

Hakan AKINCIBAY

Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Mikrobiyoloji İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ruhi Alaçam

ANKARA

1998

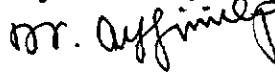
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

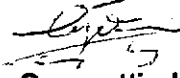
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ruhi Alaçam, Hacettepe Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Ayfer Günalp, Hacettepe Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Tefvik Cengiz, Ankara Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, Hacettepe Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Gülşen Haşçelik, Hacettepe Üniversitesi



ONAY :

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurul'unun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Sezgin ILGI
Enstitü Müdürü

ÖZET

Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının patogeneğine açıklık getirmek ve Gram-negatif bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda antibiyotik seçimini etkileyecek önemli bir etken olmaya aday olan endotoksin salınımını incelemek için, standart E.coli suşu (ATCC 25922) kullanılarak bakteri duvarına etkili β -laktam antibiyotiklerden ampisilin, sulbaktam-ampisilin ile üçüncü kuşak bir sefalosporin olan seftazidimin, endotoksin salınımına etkilerinin in-vitro ve in-vivo olarak incelenmesi amaçlandı. Ampisilin için MIC değeri 2 μ g/ml, sulbaktam-ampisilin için MIC değeri 2 μ g/ml ve seftazidim için de 0.125 μ g/ml olarak bulundu. Çalışılan her antibiyotik için 50XMIC düzeyindeki serbest ve total endotoksin salınımı incelendi. Her antibiyotik grubu için ağırlıkları 20-25 gram arasında değişen 6-10 haftalık, outbred, dişi 16 adet Swiss Albino fare olmak üzere ön çalışmalar ve esas deneyler için toplam 162 fare kullanıldı. Plazma ve besiyerindeki endotoksin düzeyleri kromojenik LAL deneyi ile gerçekleştirildi. Endotoksin düzeyi ile birlikte kullanılan antibiyotiklerin in-vitro ve in-vivo canlı sayımlara etkisi incelendi ve in-vitro koşullarda en çok sulbaktam-ampisilinin, daha sonra ampisilinin, en düşük oranda da seftazidimin bakteri sayısını düşürme yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi. Bu bulguların istatistiksel analizi sonucunda kullanılan 3 antibiyotik arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı (F=75.58, p=0.00). Çalışılan 3 antibiyotikle karşılaştırılan E.coli kültürlerinde 0, 1, 2 ve 4. saatlerde görülen serbest endotoksin miktarlarına göre antibiyotikler arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı saptandı (F=1.218, p=0.41). Total endotoksin çalışmaları sonuçlarına göre antibiyotikler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü (F=4.28, p=0.76). İn-vivo koşullarda en çok öldürme yeteneğine sahip antibiyotiğin ampisilin olduğu ve onu sırasıyla sulbaktam-ampisilin ve seftazidimin izlediği görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=240.9, p=0.00). Serbest endotoksin miktarı açısından istatistiksel olarak fark görülmezken total endotoksin miktarı açısından oluşan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=115.21, p=0.02). Ampisilin, in-vitro olarak canlı sayımları azaltırken total endotoksin miktarında bir artış görüldü ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($r_s=-1$, p=0.00). Diğer antibiyotikler için böyle bir ilişki saptanmadı. İn-vivo olarak da sulbaktam-ampisilinle tedavi edilen farelerde serbest endotoksin miktarı ile canlı sayımlar arasında aynı yönde anlamlı bir ilişki çıktı ($r_s=1.00$, p=0.00). Ayrıca in-vivo ve in-vitro şartlarda oluşan serbest ve total endotoksin miktarı açısından bir farklılık görülmedi.

Anahtar Kelimeler: Ampisilin, Sulbaktam-ampisilin, Seftazidim, Serbest endotoksin, Total endotoksin.

ABSTRACT

It was aimed to clarify the pathogenesis of Gram-negative bacterial infections due to endotoxin release by different β -lactam antibiotics. Standard E.coli ATCC 25922 strain was used to study the endotoxin release by ampicillin, sulbactam-ampicillin and a third generation cephalosporin, ceftazidime which act through inhibition of cell wall synthesis. MICs for ampicillin, sulbactam-ampicillin and ceftazidime were 2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ and 0.125 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Free and total endotoxin release were studied at 50X MIC for each antibiotic. For each group of antibiotics, 6-10 week old, outbred, weighing 20-25 gr, female Swiss Albino mice were used constituting a total of 162 mice for the whole study. In-vitro and in-vivo endotoxin levels were studied by chromogenic LAL assay. Besides endotoxin release, effect of different antibiotics on the level of viable counts were evaluated. It was observed that sulbactam-ampicillin was the most potent antibiotic with its effect on on viable counts followed by ampicillin and ceftazidime under in-vitro conditions. It was found that the difference between 3 antibiotics used was statistically significant ($F=75.58$, $p=0.00$). The difference in free and total endotoxin release in cultures treated by 3 different antibiotics in 0, 1, 2 and 4 hours was not found statistically significant ($F=1.218$, $p=0.41$, $F=4.28$, $p=0.76$). Under in-vivo conditions, ampicillin was found to be the most potent antibiotic to decrease the viable counts followed by sulbactam-ampicillin and ceftazidime. The difference was found statistically significant ($F=240.9$, $p=0.00$). While a statistically insignificant free endotoxin release was found, a statistically significant total endotoxin release was observed ($F=115.21$, $p=0.02$). Ampicillin was found to reduce the viable counts while a significant increase was seen on the level of total endotoxin in-vitro ($r_s=-1$, $p=0.00$). No such correlation was observed for the other antibiotics studied. In mice treated with sulbactam-ampicillin, a significant correlation between endotoxin release and viable counts ($r_s=1.00$, $p=0.00$). Besides, no difference was observed in free and total endotoxin levels between in-vitro and in-vivo conditions.

Key words: Ampicillin, Sulbactam-ampicillin, Ceftazidime, Free endotoxin, Total endotoxin.

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı aşağıda adı geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayfer Günalp, tez çalışmasını yönlendirmiş ve gerçekleşmesi için gerekli ortamı sağlamıştır.

Danışman Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ruhi Alaçam, tez çalışmasının her aşamasında titizlik ve sabırla çalışmalarını izleyip gerekli uyarı ve yönlendirmelerde bulunmuştur.

Deney hayvanları bölümünden Sayın Veteriner Hekim Işıl Ünsal, deneylerde kullanılan farelerin ve gerekli ortamın sağlanmasında destek olmuştur.

TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu, araştırmalarda kullanılan Endotoksin Test Kiti ve kromojenik substrat için gerekli maddi olanakları sağlamıştır. Fako İlaç Firması kullanılan 0.45 µm'lik filtreleri bağışlamıştır.

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Klinik Patoloji Laboratuvarlarından Sayın Doç. Dr. Dürdal Us, CLAL deneylerinin sonuçlarının spektrofotometrede okunmasında gerekli ortamı sağlamıştır.

Sayın Prof. Dr. Ergun Karağaoğlu ile Sayın Doç. Dr. Reha Alpar, çalışmanın istatistiksel olarak planlanmasını yönlendirmişlerdir.

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalının, Başta Sayın Prof. Dr. Ayfer Günalp olmak üzere tüm öğretim üye ve görevlileri ile araştırma görevlileri, doktora süresi boyunca gösterdikleri anlayış, sıcaklık ve dostluk ile daima destek olmuşlardır.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
KONU İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR	3
2.1. ENDOTOKSİNİN YAPISI VE GÖREVLERİ	3
2.2. β -Laktam Antibiyotikler	6
2.3. Serbest Endotoksin	7
2.4. Antibiyotik Kullanımı Sonucu Endotoksin Salınımı	8
2.4.1. In-Vitro Çalışmalar	8
2.4.2. In-Vivo ve Klinik Çalışmalar	12
Hayvan Çalışmaları	12
Klinik Çalışmalar	13
2.5. Endotoksin Saptamada Kullanılan Yöntemler	14
2.5.1. LAL Deneyi	14
LAL Deneyinin Özgüllüğü	15
2.6. Anti-Endotoksin Tedavi Yöntemleri	15

GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Bakteriler	17
3.2. Antibiyotikler	17
3.3. In-vitro Endotoksin Çalışması	18
3.4. In-vivo Endotoksin Çalışması	18
3.5. Serbest ve Bağlı Endotoksinin Ayrılması	19
3.6. Kromojenik LAL Deneyi	20
3.7. İstatistik Yöntemi	21
BULGULAR	22
4.1. In-vitro çalışma	22
4.1.1. Bakteri Canlı Sayım Sonuçları	22
4.1.2. Endotoksin Miktar Çalışması Sonuçları	24
4.2. In-vivo Çalışma	26
4.2.1. Canlı Sayım Sonuçları	26
4.2.2. Endotoksin Miktar Çalışması Sonuçları	27
4.3. In-vitro ve In-vivo Canlı Sayımların Karşılaştırılması	29
4.4. Canlı Sayımlar ile Endotoksin Miktarı Korelasyonunun İncelenmesi	30
4.4.1. In-vitro Korelasyon	30
4.4.2. In-vivo Korelasyon	30
4.5. In-vitro ve In-vivo Endotoksin Miktarlarının Karşılaştırılması	31
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

LPS	Lipopolisakkarid
LOS	Lipooligosakkarid
TNF	Tümör nekroze edici faktör
IL	Interlökin
Ifn- δ	İnterferon gamma
PAF	Platelet aktive edici faktör
LAL	Limulus amebocyte lysate
CLAL	Kromojenik Limulus amebocyte lysate
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyon
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
IV	Intravenöz
LDH	Laktat dehidrojenaz
ATCC	American Type Cultural Collection
MHB	Müller Hinton buyyon
EU	Endotoksin Ünitesi
SAM	Sulbaktam-ampisilin
CFU	Colony forming unit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
3.1. Endotoksin düzeyinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri.	21
4.1. Standart E.coli'nin in-vitro şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle karşılaşması sonucu 4 saat içinde oluşan bakteri canlı sayımlarının karşılaştırmalı grafiği(CFU/ml).	23
4.2. Üç farklı antibiyotikle karşılaşan E.coli kültürlerinin 4 saatlik süre içinde görülen serbest endotoksin miktarlarının karşılaştırmalı grafiği.	24
4.3. Farklı antibiyotiklerle karşılaştırılan E.coli ATCC 25922'nin 4 saatlik süre içinde gözlenen total endotoksin miktarının karşılaştırmalı grafiği.	25
4.4. Standart E.coli'nin in-vivo şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidim ile karşılaşması sonucu 4 saat içinde oluşan bakteri canlı sayımlarının karşılaştırmalı grafiği(CFU/ml).	27
4.5. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde, kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşması neticesinde görülen serbest endotoksin düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği.	28
4.6. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde, kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşması neticesinde görülen total endotoksin düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği.	29

ÇİZELGELER

Çizelge	Sayfa
4.1. Standart E.coli'nin in-vitro şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle karşılaşması sonucu 4 saat içinde oluşan bakteri düzeyleri(CFU/ml).	22
4.2. Standart E.coli'nin in-vitro şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle 4 saatlik kültürü sonucu oluşan serbest ve total endotoksin ile serbest endotoksinin total endotoksin içindeki yüzdesi.	25
4.3. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde, kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşması neticesinde görülen bakteri canlı sayım sonuçları(CFU/ml).	26
4.4. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşmaları sonucu oluşan serbest ve total endotoksin ile serbest endotoksinin total endotoksin içindeki yüzdesi.	28

GİRİŞ

Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlar sistemik iltihabi cevabın en önemli nedenleri arasındadır. Bu enfeksiyonlar klinik olarak hipotansiyon, taşikardi, takipne, yaygın damar içi koagülasyon ve mültipl sistem organ bozuklukları ile karakterizedir. Gram-negatif bakteri duvarının bir bileşeni olan endotoksinin salınımı sonucu yukarıda sayılan klinik olguların meydana geldiği bildirilmektedir(1). Endotoksin salınımının, antibiyotiğin etki mekanizmasına ve hücre duvarının bütünlüğünün devamına bağlı olduğu düşünülmektedir. Hücre duvarını etkileyen antibiyotiklerden bakterisid olanların, ribozomu etkileyen veya bakteriyostatik olanlara göre endotoksinle beraber daha fazla hücre içeriğinin açığa çıkmasında rolü olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, gram-negatif bakteri septisemilerinin tedavisi için uygun antibiyotik seçiminde antibiyotiğin etki mekanizmasının yanısıra, endotoksik şoka neden olup olmayacağını da gözönüne alınmasının gerekli olduğu öne sürülmektedir(2).

Jackson ve Kropp tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada beta-laktam antibiyotikler olan imipenem ve seftazidimin, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarından lipopolisakkarit (LPS) salınımını indüklediği ve seftazidimle karşılaşan kültürlerde ise 10-40 kat daha fazla serbest endotoksin salınımı olduğu saptanmıştır(3). Bucklin ve çalışma grubu da yayımlanan çalışmalarında farklı antibiyotiklerin kullanımı sonucu endotoksin salınımını incelemişler ve antibiyotik tedavisi sonucu endotoksin salınımının gram-negatif bakterilerin oluşturdukları enfeksiyonların patogeneğinde rol alabileceğini öne sürmüşlerdir(1). Arditi ve grubu da 1989 yılında yayımlanan çalışmalarında, *Haemophilus influenzae* menenjitisi olan çocuklarda serebrospinal sıvıdaki endotoksin seviyesine bakmışlar ve gram-negatif bakteri lizisinden sonra serbest LPS ile diğer bakteri bileşenlerinin, gram-negatif bakteri menenjitinin patogeneğine ve serebrospinal sıvı tahribatına yardımcı olabileceğini ve saflaştırılmış *H.influenzae* endotoksininin doza bağlı olarak şiddetli

meningeal iltihaba ve kan-beyin bariyerinin bozulmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir(4).

Günümüze değin yapılan çalışmalara bakıldığında gram-negatif bakteri septisemisine neden olan mikroorganizmalardan başta Escherichia coli olmak üzere enterobakteriler, H. influenzae ile Pseudomonas aeruginosa'nın ve antibiyotiklerden de endotoksin salınımına etkisi incelenmek üzere penisilin, moksalaktam, sefotaksim, aminoglikozidlerden kanamisin ile gentamisin, çeşitli kinolonlar ve kloramfenikolün çalışıldığı görülmüştür(5-8). Ek olarak, son zamanlarda sepsislerin tedavisinde sefuroksim, aztreonam, imipenem gibi beta-laktam antibiyotiklerin yalnız başına veya tobramisin gibi aminoglikozidlerle kombine olarak kullanıldığı ancak bunların endotoksin salınımını nasıl etkilediği bilinmeden tatbik edildiği bildirilmiştir(9).

Yukardaki bulgulardan yola çıkarak gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının patogenezinin açıklık getirmek ve gram-negatif bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda antibiyotik seçimini etkileyecek önemli bir etken olmaya aday olan endotoksin salınımını incelemek için, çalışmamızda standart E.coli suşu kullanılarak bakteri duvarına etkili β -laktam antibiyotiklerden ampisilin, sulbaktam-ampisilin ile üçüncü kuşak bir sefalosporin olan seftazidimin, endotoksin salınımına etkilerinin in-vitro ve in-vivo olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR

Gram-negatif bakteri hücrelerinin dış membranı prokaryotik hücrelere özel bir yapı olup, 700 daltondan büyük moleküllerin hücreye geçişini düzenleyen bir elek fonksiyonu görmektedir. Tipik çift tabakalı lipid olan bu membran diğer tüm biyolojik membranlardan lipid kompozisyonu ve içerdiği proteinlerin sayısı ile ayrılır. İç lipid tabakası, normalde bakteri membranlarında bulunan fosfolipidleri içerir. Dış tabaka ise lipopolisakkarit (LPS) adı verilen ve hem hidrofobik hem de hidrofilik uçları içerdiği için amfipatik olarak isimlendirilen bir molekülden oluşur. Toksik olması ve diğer biyolojik özellikleri nedeniyle bu moleküle endotoksin adı verilmiştir. Sentez aşaması dışındaki LPS molekülleri, dış membranın dış tabakasında bulunurlar ve asla dış membranın iç tabakasına transfer olmazlar. Bu nedenle asimetric bir yapıya sahip olan bu membranın iç tabakasında fosfolipidler ve dış tabakasında da fosfolipidlerin yerini alan LPS bulunur(10).

2.1. Endotoksinin Yapısı ve Görevleri

Gram-negatif bakteri hücre duvarının bir bileşeni olan LPS'nin yapısı üçe ayrılır. Birinci bölümü oluşturan lipid A'nın uzun zincirli yağ asitlerinin bağlı olduğu fosforillenmiş glukozamin disakkarit ünitelerden oluşan kompleks bir lipid olduğu görülür. İkinci bölümünü merkezi bir kor polisakkariti oluşturur. Üçüncü bölümünün ise genellikle doğrusal trisakkaritler veya dallanmış tetra veya pentasakkaritler içeren tekrarlayan ünitelerden oluştuğu görülür. Ondört karbonlu bir yağ asidi olan β -Hydroxymyristic asit lipid A'da daima mevcut olup lipid A'nın bir özelliğidir. Diğer yağ asitleri ise fosfatlar üstündeki değişen gruplarla beraber bakteri türlerine göre farklılıklar gösterirler. Merkezi kor polisakkaridi, LPS içeren tüm Gram-negatif türlerde benzerlik gösterir, ancak her bakteri türü tekrarlayan tek bir ünite içermektedir(10).

Negatif yüklü LPS molekülleri divalan katyonlarla kovalan olmayan çapraz bağlarla bağlıdır. Bu özellik, membranı stabilize ederken hidrofobik moleküllere karşı da bariyer oluşmasını sağlar. Divalan katyonların şelasyon yapan ajanlarla uzaklaştırılması veya polimiksinler veya aminoglikozidler gibi polikasyonik antibiyotiklerle yer değiştirmeleri sonucu, dış membran büyük hidrofobik moleküllere karşı geçirgen hale gelir(10).

Hayvanlar için ileri derecede toksik olan endotoksinler hücre yüzeyine sıkıca bağlıdır ve sadece hücreler lizise uğradığı zaman serbest hale geçmektedir. Bu molekül, lipid A ve polisakkarit kısımlarına ayrıldığı zaman toksisitesinin tamamının lipid A kısmı ile ilgili olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, polisakkarit kısmı ise bakteri hücrelerinin O-Antijeni olarak adlandırılan başlıca yüzey antijenini oluşturur. Antijenik özelliği, hidrofilik polisakkaritlerden bir tabaka oluşturarak bakteri hücrelerini çevreleyen terminal tekrarlayan üniteler tarafından sağlanır. Bu tabakanın çok sayıda farklı antijenik tip oluşturma özelliği vardır. Örneğin sadece Salmonella'nın 1000'in üzerinde antijenik suşu vardır(10,11).

Lipopolisakkarit sitoplazmik membranda sentezlenip son şeklini aldığı dış membrana hidrofobik bağlarla bağlanır ve burada birçok dış membran proteininin fonksiyon görmesi için LPS'nin varlığı gereklidir. Tüm gram-negatif bakterilerin dış membranında, değişen sayılarda tekrarlayan oligosakkarit üniteleri içeren LPS bulunmaz. Neisseria meningitis, N.gonorrhoea, Haemophilus influenzae, H.ducreyi gibi mukozal yüzeylerde kolonize olan bakterilerin dış membran glikolipidleri daha kısa, dallara ayrılmış glikanlar içerir. Daha küçük olan bu glikolipidler, O-Antijeni olmayan ve E.coli gibi enterik bakterilerin pürüklü koloni mutantları tarafından sentezlenen R tipteki kolonilerin LPS yapılarıyla benzerlik göstermektedir. Yapıları memeli hücre membranlarındaki glikosfingolipidlere benzer ve bunlar lipooligosakkarit (LOS) olarak

isimlendirilir. Bu moleküller tek bir suş içerisinde bile antijenik ve yapısal farklılık gösterir. Önemli bir virülans faktörü olan LOS'un diğer bir özelliği de üzerinde konak yapılarını taklit eden epitoplara bulunmasıdır. Sayılan bu özellikleri mikroorganizmaların konağın immün cevabından kaçmasına yardımcı olmaktadır(11).

Lipopolisakkarit molekülünün toksik özelliğini yansıtan lipid A kısmının membrana bağlı olduğu sürece öldürücü olmadığı bildirilmiştir(12). O yan zincirinin kendisi toksik olmamasına rağmen, serbest LPS molekülünün sıvı ortamdaki hidrofilik özelliğini çoğaltarak lipid A'nın öldürücü etkisini artırdığı rapor edilmiştir. Bağlı LPS O yan zincirinin ise, bazı antibiyotiklerin bakterilerin periplazmik mesafelerine penetrasyonlarını inhibe ederek virülansı artırdığı ve aynı zamanda membrana bağlı LPS'ye kompleman bağlanmasını inhibe ederek bakteriyel lizisi azalttığı gösterilmiştir(13).

Bakteriler kanda genelde düşük sayıda bulduklarından ve deneysel çalışmalarda bakterilerin dolaşımdan, retikuloendotelial sistem tarafından hızla temizlendikleri gösterildiğinden; ateş, yaygın damar içi koagülasyon, kompleman aktivasyonu, hipotansiyon ve şok gibi semptomların bakteriler tarafından etrafa yayılan veya bakterinin lizisi sonucu ortaya çıkan endotoksinlerden oluşabileceği düşünülmüştür(6,14). *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria türleri* ile *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram-negatif bakterilerin üreme esnasında dış membran fragmanlarını salgıladıkları ve bu küçük membran fragmanlarının bakteriler tarafından ulaşılamayan doku alanlarına penetre olabildiği bildirilmiştir(15). Bu fragmanların, enfeksiyon sırasında salınan endotoksine, saflaştırılmış LPS'den daha çok benzedikleri gösterilmiştir. Dış membran fragmanlarını etrafa yayabilen bakterilerin LPS içeriklerinin, membranları tam olan bakterilerin LPS içeriklerine nazaran, daha az fosfolipid ve protein içerdikleri bildirilmiştir(16).

Gram-negatif bakteri dış membranının başlıca yapıtaşı olan bakteriyel endotoksik LPS, sepsis sendromunun patogenezinde rol oynayan başlıca etkidir. Saflaştırılmış LPS'nin deney hayvanları veya gönüllülere verilmesi sonucu septik şoklu hastalarda görülen ön iltihabi (proinflammatory) ve patolojik cevapların meydana geldiği gözlenmiştir(17). İn-vitro ve in-vivo çalışmalar LPS'nin mononükleer fagositlerle etkileşimi sonucu; Tumor Necrosis Factor (TNF), İnterlökin 1 ve 6 (IL-1 ve IL-6), İnterferon Gamma (İfn- δ), prostoglandin, lökotrien ve Platelet Activating Factor (PAF) gibi çeşitli biyolojik aktif sitokinler ile, iltihabi mediatörleri indüklediği ve salınımını sağladığı gösterilmiştir(18).

2.2. β -Laktam Antibiyotikler

Bakteri hücre duvarının sentezi; transpeptidazlar, karboksipeptidazlar ve endopeptidazlar gibi spesifik enzimler tarafından katalize edilir. Bu düzenleyici proteinlere penisilin bağlayan proteinler denir(PBP). Çünkü bunlara β -laktam antibiyotikler bağlanır. Üreme aşamasında olan bakteriler bu antibiyotiklerle karşılaştıkları zaman, antibiyotikler hücre membranındaki PBP'lere bağlanarak hücre duvarındaki peptidoglikan tabakanın sentezini inhibe eder ve hücre duvarını parçalayan otolitik enzimler ortama salınarak bakteri hücrelerinin ölümü meydana gelir. Bu nedenlerle β -laktam antibiyotikler genellikle bakterisid ajan olarak işlev görürler. Beta-laktam antibiyotikler başlıca 5 ana grupta toplanırlar. Bunlar; 1.Penisilinler, 2.Sefalosporinler, 3.Karbapenemler, 4.Monobaktamlar ve 5. β -laktamaz inhibitörleridir(19).

Penisilinler, güçlü bakterisid etkileri yanında toksisiteleri nisbeten az olan ve sık kullanılan doğal veya yarı sentetik antibiyotiklerdir. İlik bulunan ve kısa aralıklarla tıbbi kullanılışa sunulması nedeniyle, halen en

hızlı gelişme gösteren antibiyotik grubunu oluştururlar. Sefalosporinler penisilinlerle aynı etki mekanizmasına sahip olmalarının yanısıra daha geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptirler. Ayrıca bunlar birçok β -laktamaza dirençli olup penisilinlere göre daha gelişmiş farmakokinetik özellikleri vardır. Diğer β -laktam antibiyotiklerin biyokimyasal yapıları penisilin ve sefalosporinlerden farklı olmasına rağmen antibakteriyel aktiviteleri benzerlik gösterir. Karbapenemlerin aerobik ve anaerobik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı aktivitesi çok yüksektir. Monobaktamlar ise dar spektrumlu antibiyotikler olup Gram-negatif çomaklara karşı etkilidirler. Beta-laktamaz inhibitörlerinin kendileri inaktif olmalarına rağmen, bazı penisilinlerle kombine olarak β -laktamaz üreten bakterilerin neden oldukları enfeksiyonları tedavide etkindirler. Bu gruptaki antibiyotikler, bakteriyel β -laktamazlara, dönüşümü olmayan bir şekilde bağlanarak onları inaktive ederler. Kombine oldukları antibiyotikle bakteriye girdikten sonra bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederler(19,20).

2.3. Serbest Endotoksin

Endotoksin teriminin, her gram-negatif bakteri hücresinde bulunan ve aktivitesi hücrenin lizisine bağlı bir yapıyı tariflediği, ancak bu tarifi çeşitli nedenlerle yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Limulus amebocyte lysate (LAL) deneyi ile ölçülen endotoksin düzeyinin, logaritmik üreme fazındaki bakteri yoğunluğu ile paralellik gösterdiği ve hücreye bağlı olmayan endotoksinin kendiliğinden ve hücre lizisine bağlı olmaksızın gerçekleştiği öne sürülmüştür(21). Gram-negatif bakterilerin lizis olmaksızın endotoksin salgılamasının, çevre koşullarının ve protein sentezi inhibisyonu yolu ile etki gösteren antibiyotiklerin etkisi gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu rapor edilmiştir(22). Antibiyotiğin etkisini takiben

LPS salınımının, β -laktam antibiyotikler gibi direkt olarak hücre duvarını etkileyen antibiyotiklerle sınırlı olmadığı belirtilmiştir(2). Örneğin kloramfenikol gibi protein sentezi inhibitörlerinin LPS salınımını artırdığı ve bunun da muhtemelen kloramfenikolün LPS üretimini kontrol eden mekanizmalar üzerindeki etkisi sonucu gerçekleştiği bildirilmiştir(22). Endotoksin bakteri hücre duvarında endojen bulunduğundan, hassas teknikler kullanarak yapılan çalışmalar neticesinde bunun, hücre duvarına sabitlenmediği ve hücreden fosfolipid içeren membran kompleksleri, protein ve LPS şeklinde salındığı sonucuna varılmıştır. Bakteri hücreindeki endotoksinin lizis olmaksızın salınımı, ortamda nükleik asit ve diğer hücre içi markerların saptanamaması ile izah edilmektedir(21). Endotoksin serbestleşmesinin çeşitli gram-negatif bakterilerden gerçekleştiği in-vitro ve in-vivo olarak gösterilmiştir(15,21,23). *Neisseria meningitidis* farklı suşlarının hücre yüzeyinde, membran parçaları ve veziküller gösterilmiştir. Bunun, bazı suşların kendiliklerinden endotoksin salgılayabildiklerini göstermesine örnek olabileceği ifade edilmiştir(24).

2.4. Antibiyotik Kullanımı Sonucu Endotoksin Salınımı

2.4.1. İn-Vitro Çalışmalar

Andersen ve Solberg, 1980 yılında yayımlanan çalışmalarıyla *Neisseria meningitidis*'in endotoksin salgılayan iki ve salgılamayan bir suşunu incelemiştir. Benzilpenisilin ve kloramfenikolün Minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) ve 100XMIC düzeylerindeki etkisini, kimyasal, proteinsiz bir ortamda araştırmışlardır. Meningokoklar üzerindeki en hızlı etkiyi benzilpenisilinin en yüksek dozu sağlamış, ancak 20 saat sonra kullanılan her iki penisilin konsantrasyonunun antibakteriyel etkisinin aynı olduğu görülmüştür. Kloramfenikolün antibakteriyel etkisinin ise çok daha yavaş olduğu gözlenmiştir. En yüksek doz penisilin kullanıldığında, antibakteriyellerin kullanımından 2 saat sonra ortamda

endotoksin salgılayan suşlardaki filtre edilebilir endotoksin miktarında artış olduğu ve aynı dönemde ani bir hücre ölümünün gerçekleştiği saptanmıştır. Antibakteriyeller ile muamele edildikten 20 saat sonra, düşük ve yüksek dozda penisilin ile karşılaştırılmış endotoksin salgılayan suşlarda kontrollere ve kloramfenikolle karşılaştırılmış kültürlerle göre filtre edilebilir endotoksin içeriğinde bir azalma gösterilmiştir. Antibakteriyeller ile muamelenin, kültürdeki total endotoksin miktarı üzerindeki etkisinin antibakteriyeller ile muamele edilmemiş kontrollere göre minimal olduğu veya hiç olmadığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak, meningokokların kloramfenikol ile karşılaştırılmalarından 20 saat sonra görülen yüksek endotoksin salınımının, penisilin gibi peptidoglikan oluşumunu bozmadığı ve endotoksini absorbe etmediği için, ortama sürekli endotoksin salınımı sonucunda oluştuğu bildirilmiştir(22).

Connell ve Cohen, siprofloksasinin, bir E.coli suşunun bakteriyolizisine ve kültür ortamına ani bir endotoksin salınımına neden olduğunu saptadıkları çalışmadan yola çıkarak, E.coli H68 üzerinde diğer kinolonların etkilerini incelemişlerdir. Endotoksini kromojenik LAL (CLAL) testi ile ölçerek kinolon antibiyotiklerden enoksasin, ofloksasin, perfloksasin, norfloksasin ve siprofloksasini çalışmışlar ve kültürlerin kinolonlarla karşılaştırılmaları sonunda endotoksin salınımının kontrollere göre önemli oranda yüksek olduğunu ve bunun kinolon sınıfı antibiyotiklerin ortak bir özelliği olabileceğini belirtmişlerdir(25,26). Dofferhoff ve grubu da 1991 yılında yayımlanan araştırmalarında, E.coli'nin 25922 suşuna karşı farklı gruplardaki antibiyotikleri tek tek veya kombine kullanarak 4 saatlik bir zaman sürecinde in-vitro ve in-vivo total ve serbest endotoksin salınımını çalışmışlar ve antibiyotiklerin canlı bakteri sayısı ile morfolojisine etkisini incelemişlerdir(9).

Mattsby-Baltzer ve grubu 1991 yılında yayımlanan makalelerinde gram-negatif bakteri LPS'sinin endotoksin aktivitelerini CLAL testi ile araştırmışlardır. Oniki farklı E.coli ve Salmonella typhimurium suşu

kullanılan bu çalışmada, farklı hücre yüzeyi yapıları gösteren bakteri hücreleri karşılaştırıldığında, en yüksek limulus aktivitesinin E.coli'nin R suşlarında ve S. typhimurium'un mutantlarında bulunduğu saptanmıştır. K antijeni içeren E.coli suşlarının içermeyenlerden farklı olmadığı bulunmuştur. Beta-hydroxymyristic asidin ölçümü sayesinde bakteri hücrelerine bağlı LPS, kültür ortamına dökülmüş LPS ve saflaştırılmış LPS miktarlarının, CLAL aktivitelerine bakarak karşılaştırılmalarının mümkün olduğu gösterilmiştir. Sonuçta, çeşitli durumlarda endotoksin miktarını saptamada uygun standartların önemi ve E.coli ile S. typhimurium bakterilerinin, bulunduğu ortama üreme esnasında önemli miktarlarda endotoksin bıraktığı vurgulanmış, ayrıca LPS'nin bu şeklinin hücreye bağlı veya saflaştırılmış LPS'den daha CLAL aktif olduğu rapor edilmiştir(6).

Jackson ve Kropp, 1992 yılında yayımlanan çalışmalarında, PBP-2 için spesifik imipenem ile, PBP-3 için spesifik seftazidimin, Pseudomonas aeruginosa'nın düz ve pürüklü LPS mutant izolatlarına karşı göreceli olarak in-vitro LPS salınımını incelemişlerdir. E.coli'nin bilinen dozlarda fareler için öldürücü etkisinin in-vitro deney sonuçlarıyla paralellik gösterdiği saptanmıştır. Seftazidimin MIC altı düzeydeki miktarlarının önemli oranda bakteriyel lizis olmaksızın filamentasyona ve LPS salınımına neden olduğu gözlenmiştir. Salınan endotoksin miktarlarının, saftazidimin sadece inhibitör konsantrasyonlardaki miktarına denk gelmediğini (ör. 1, 2 ve 50 MIC değerlerinde) ancak imipenemin 100 MIC değerlerinde de serbestleşen LPS düzeylerini önemli oranda aştığını bildirmişlerdir. İmipenemin MIC altı düzeylerde göreceli olarak düşük miktarlarda serbest LPS serbestleştirdiğini, ancak 2 saat sonunda saftazidime göre koloni sayımlarını yaklaşık 2 log oranından fazla düşürdüğünü gözlemişlerdir. Sonuçta, seftazidim tarafından indüklenen filamentasyon neticesinde, filamentöz olmayan ve hızlı lizise uğratan imipeneme göre, daha fazla miktarlarda biyoreaktif LPS'nin serbestleştiği rapor edilmiştir(3).

Evans ve Pollack, 1993 yılında Journal of Infectious Disease dergisinde yayımlanan çalışmalarında, farklı sınıflardan 6 antibiyotiğin, E.coli üzerindeki LPS serbestleştirme etkisini incelemişlerdir(27). Antibiyotik konsantrasyonlarının 0.0625-512µg/ml arasında değiştiği bu çalışmada LPS serbestleşmesinin, bakterilerin çoğunun veya çoğuna yakın bir miktarının öldüğü bir konsantrasyonda ve kullanılan antibiyotik konsantrasyonunun bir işlevi olarak gerçekleştiği belirtilmiştir. Bakterilerden LPS serbestleşmesinin mekanizması açığa kavuştuğu takdirde, LPS veya diğer toksik maddelerin dışarı çıkması engellenerek öldürülmesini sağlayacak yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinin mümkün olabileceği öne sürülmektedir(27). Diğer bir çalışmada, Bucklin ve grubu, E.coli'nin logaritmik faza getirilmiş kültürlerinin hücre duvarına etkili antibiyotiklerle karşılaştırılması sonunda, LPS'nin immünolojik olarak reaktif lipid A epitoplarının gittikçe artan bir derecede açığa çıktığı ve çözünür LPS'nin kültür süpernatantlarına serbestleştiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada hücre duvarına etkili 2 antibiyotik olan seftazidimle imipenemin göreceli olarak LPS serbestleşmesine etkilerinin kalitatif olmayıp, kantitatif olduğu belirtilmiştir. Bu antibiyotiklerden seftazidimin önemli derecede LPS serbestleşmesine neden olduğu bildirilmiştir. Farelerde bakteriyemi oluşturulması sonucu uygulanan bu antibiyotiğin yüksek derecede koruyuculuk sağladığı gözlenmiştir. Bu yönde yapılan tüm çalışmaların gram-negatif mikroorganizmaların antibiyotiklerle karşılaştırılmaları sonucu endotoksin serbestleştirilmesinin, bu organizmaların yol açtığı enfeksiyonların patogenezinin aydınlatılmasına yardımcı olacağı ümit edilmektedir(1).

2.4.2. İn-Vivo ve Klinik Çalışmalar

Hayvan Çalışmaları

Gram-negatif bakteriyel sepsisin tedavisi sırasında bakteri hücrelerinden endotoksin salınımının kinetiğini incelemek için Shenep ve Mogan tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada E.coli sepsisi oluşturulmuş ve antibiyotik veya plasebo ile tedavi gören tavşanlardan alınan seri kan örneklerinde canlı bakteri sayımı, serbest ve total endotoksin miktarı incelenmiştir(7). Plasebo ile tedavi edilen hayvanlardaki serbest endotoksin miktarının, bakteriyemi düzeyiyle orantılı olarak yükseldiği fakat antibiyotik ile tedavi gören hayvanlarda azalan bakteriyemi düzeyine karşın, serbest endotoksinin plazma düzeylerinin 10-2000 kat artış gösterdiği gözlenmiştir. Antibiyotik tedavisini takiben plazmada görülen serbest endotoksinin, kısmen dolaşımdaki bakterilerin yıkımından kısmen de kan dışındaki dokularda bakterilerin parçalanmasından meydana geldiği öne sürülmüştür. Sonuç olarak, in-vivo antibiyotik kullanımını takiben bakteri hücrelerinden önemli miktarlarda endotoksin salındığı gösterilmiştir. Bu sonuçla paralel olarak, dolaşımdaki serbest endotoksinin konak dokularında hücreye bağlı endotoksine göre daha fazla etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar E.coli tarafından deneysel sepsis oluşturulan bir başka in-vivo çalışmada çeşitli antibiyotik sınıflarının, endotoksin salınım hızına etkilerini incelemiştir(8). Antibiyotik olarak kloramfenikol, gentamisin ve moksalaktam kullandıkları çalışmada tavşanlardan seri kan örnekleri almışlar ve canlı bakteri sayımlarını, serbest ve total endotoksin miktarlarını karşılaştırmışlardır. Kloramfenikol ile tedavi gören tavşanlarda serbest endotoksin geometrik ortalama düzeylerinin, bakteriyeminin geometrik ortalamaları ile orantılı olduğu ve adı geçen antibiyotiğin kullanımı sonucu endotoksin salınımı olmadığı bildirilmiştir. Buna karşın, gentamisin veya moksalaktam kullanımı sonucu serbest endotoksin

düzeyinde ani bir yükseliş görülürken bakteriyemi düzeyinde azalma saptanmıştır. Bakteri öldürme oranlarının benzerlik göstermesine rağmen, moksalaktamla tedavi gören tavşanlarda serbest endotoksin ortalama düzeylerinin gentamisinle tedavi gören tavşanlardaki endotoksin düzeylerine göre 20 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, tedavi sırasında gözlenen endotoksin salınımının antibiyotik sınıfına bağlı olduğu ve ölen bakterilerin sayısı ile orantılı olmadığı bildirilmiştir(8).

Klinik Çalışmalar

Gram-negatif bakteriyel sepsisi olan bazı hastalarda in-vitro, etken organizmaya karşı önemli derecede etkin olan antibiyotikler kullanılmasına rağmen, klinik durumlarının kötüye gitmesinin nedenleri arasında, antibiyotik tarafından bakteri hücrelerinin lizise uğraması sonucu endotoksin ve diğer bakteriyel toksinlerin konak hücrelerine verdiği zarar olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezi doğrulayan çalışmalara bakıldığında, deneysel yolla enfekte edilen hayvanlardaki endotoksinin etkili antibiyotik tedavisi sonunda plazma seviyelerinin sadece aynı düzeyde kalmayıp artış gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak klinik çalışmaların yetersiz olduğu görüşünden yola çıkarak, Shenep ve çalışma grubu 1988 yılında gram-negatif sepsisli hastalarda yaptıkları klinik çalışmada, ilk doz antibiyotik verilmeden hemen önce plazma endotoksin düzeyini ve bakteriyemi ölçmüşler ve bakteri hücre lizisini incelemek için hücreye bağlı ve serbest endotoksin düzeylerini ayrı ayrı araştırmışlardır(5).

Arditi ve grubu tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Haemophilus influenzae mehejiti olan 22 çocuğun BOS'daki total, serbest, bağlı endotoksin ve bakteriyel yoğunluk ölçülmüştür. Aynı zamanda, 8 hastanın BOS'daki endotoksin düzeyine seftriaksonun etkisi, başlangıç dozundan 2-6 saat sonra ölçülerek incelenmiş ve başlangıçtaki BOS bakteriyel yoğunluk ile BOS endotoksin düzeyleri arasında bir korelasyon

saptanmıştır. Seftriaksonun BOS'da önemli oranda serbest endotoksin artışını indüklediği ve bu artışın BOS'da ölü bakteri sayısı ile pozitif bir ilişki gösterdiği belirtilmiştir. Serbest endotoksin miktarındaki bu artışın, BOS'daki laktat, LDH ve glukoz düzeyindeki artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bulguların ışığında araştırmacılar, yüksek derecede bakterisidal antibiyotiklerin; başlangıçta gram-negatif organizmalardan BOS'a serbest endotoksin salınmasına yol açtığı ve bunun da konaktaki artan iltihabi cevabı geliştirebileceği sonucuna varmışlardır(4).

2.5. Endotoksin Saptamada Kullanılan Yöntemler

Endotoksin tayini için 20'den fazla test olduğu, ancak bunların arasında yüksek duyarlılıkta endotoksin miktarını saptayabilmesi, biyolojik aktif komponent olan lipid A ile reaksiyona girebilmesi ve işlemin göreceli olarak kolaylığı nedeniyle LAL deneyinin en çok tercih edilen metod olduğu Hurley tarafından ileri sürülmüştür(28).

2.5.1. LAL Deneyi

Deniz suyundaki vibrio türleri endotoksininin, horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) için patolojik olduğu ve ölümcül damar içi koagülasyona yol açtığı belirlenmesinden sonra, bu koagülasyonun, yengecin kan hücrelerinin pıhtılaşan bir proteininin enzimatik çevrimine neden olan endotoksin tarafından başlatılmış reaksiyonun sonucu olduğu bildirilmiştir. Bu biyolojik ajanın, teşhise yönelik bir potansiyeli olduğu anlaşıldıktan sonra özellikleri açığa kavuşturulmuştur. En önemli özelliğinin endotoksinin, varlığına karşı amebocyte lysatının ileri derecede duyarlılığı olduğu öne sürülmüş ve LAL deneyinin üç ayrı şekilde yapılabileceği gösterilmiştir. Bunların jel pıhtılaşması LAL deneyi,

koagülojen LAL deneyi ve kromojenik LAL deneyi olduğu bildirilmiştir(28,29).

LAL Deneyinin Özgüllüğü

LAL Deneyinin Özgüllüğü ile ilgili olarak birbiriyle çelişen raporlar olduğu ve bazılarında mantarların hücre duvarı ürünleriyle, gram-pozitif bakterilerle ve polinükleotidlerle reaksiyona girdiği ileri sürülmüştür. Ancak LAL deneyinin ileri derecedeki özgüllüğünün zihinleri karıştırdığını ve örneğin *Candida albicans*'ın bir bölümünün LAL deneyi ile pozitif sonuçlar verme nedeninin, mikrobiyal üreme ortamının sonradan endotoksinle kontaminasyonu sonucu, bahsedilen pozitifliği oluşturduğu rapor edilmiştir. Genel olarak sadece LAL'in, LPS'nin mililitrede pikogram düzeyi kadar düşük düzeylerde olduğunda dahi pozitif sonuç verebileceği belirtilmiştir. Diğer mikrobiyal ürünlerle reaksiyona girmesi söz konusu olunca, örneğin gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarından elde edilmiş peptidoglikan veya (1-3) β -D-glukanların reaksiyona girebilmeleri için, endotoksin saptanmasında gerekli konsantrasyonun 1000-400.000 katı olması gerektiğine işaret edilmiştir. Aynı şekilde, peptidoglikanın % 0.00025 endotoksin ile kontaminasyonu sonucu pozitif LAL sonucunun çıkabileceği, ancak bu ihtimalin ortadan kaldırılmasının zor olduğu bildirilmiştir(28).

2.6. Anti-Endotoksin Tedavi Yöntemleri

Endotoksinin sepsis tedavisinde önemli bir hedef olduğu ve çalışmaların bu konuda yoğunlaştığı bildirilmiştir. Sepsisin mekanizmasında, endotoksin en kuvvetli ve en geniş spektrumlu uyarıcı olup sepsisin hem başlatılmasında hem de oluşumunda yer aldığı belirtilmiştir.

Sepsis ve gram-negatif bakteriyemi hastalarında antibiyotik tedavisine ek olarak endotoksine karşı monoklonal antikorların kullanımının etkili olabileceği ileri sürülmüş ancak korumada etkili olan mekanizmanın endotoksin aktivitesini nötralize edici etkisinden mi yoksa kısmi antibakteriyel etkidenmi olduğu anlaşılamamıştır. Hayvan çalışmalarındaki anti-endotoksin immünoterapi koruyucu etkisinin seçilen organizmaya, doza, zaman ve antikor verilim hızına ve ek olarak da antibiyotik tedavisine bağlı olduğu belirtilmiştir.

İnsanlarda yapılan tedaviye yönelik çalışmalardan sağlıklı sonuç alınabilmesi için yüzlerce hastanın dahil edildiği çalışmalar planlanmasının gerekliliğine işaret edilmiş ve bunun nedeninin gram-negatif bakteri sepsisinin ve verilecek tedavinin karmaşıklığı olduğu bildirilmiştir(28).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteriler:

Deneylerde standart E.coli suşu (ATCC 25922) kullanıldı. Stoktan alınıp kanlı agara ekildi ve 37°C'de 1 gece süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 5ml Mueller Hinton buyyon (MHB) içeren steril cam tüplere tek koloni inoküle edildikten sonra 4-6 saat süreyle 37°C'de inkübe edilerek logaritmik üreme fazına getirildi. Aynı zamanda E.coli suşunun doğrulanması için IMVIC testi ve ek olarak API 20E testi yapıldı ve kullanılan standart suşun E.coli olduğu bir kez daha doğrulandı.

Logaritmik üreme fazına getirilen buyondaki bakteriler 0.5 McFarland'a ve bundan 100 kez dilüe edilerek konsantrasyonu 10^6 CFU/ml'ye ayarlandı. Her seferinde daha sağlıklı 0.5 McFarland bulanıklık tüpü hazırlayabilmek için spektrofotometrede 530 nm dalga boyundaki optik dansitesi 0.08 olarak belirlendi. Daha sonra tüm deneylerde, 0.5 McFarland'a ayarlamak için logaritmik üreme fazına getirilen E.coli'nin miktarı başlangıçta kalibre edilen spektrofotometrede belirlenen optik dansiteye ayarlandı ve her deneyde uygun miktarda MHB ile sulandırılarak 5×10^5 CFU/ml'ye düşürüldü.

3.2. Antibiyotikler:

Çalışılması planlanan hücre duvarına etkili antibiyotiklerden; ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimin E.coli için MIC (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değerleri Agar Dilüsyon ve Tüp Dilüsyon (Makro) yöntemleri ile saptandı. Ampisilin için MIC değeri 2µg/ml, sulbaktam-ampisilin için MIC değeri 2µg/ml ve seftazidim için de 0.125 µg/ml olarak bulundu. Her deney kontrollü olarak ve en az 2'şer kez tekrarlandı ve literatür bilgilerine uygunluğu saptandı(30).

3.3. In-Vitro Endotoksin Çalışması

Çalışılan her antibiyotik için 50XMIC düzeyindeki serbest ve total endotoksin salınımının incelenmesi amaçlandı(9). Ampisilin ve sulbaktam-ampisilinin MIC değerleri aynı çıktığı için her ikisinin de 50MIC değerleri 100µg/ml olacak şekilde ayarlandı. İkiser adet endotoksin içermeyen steril cam tüpe 3.5 ml MHB, 10⁶ CFU/ml'ye ayarlanmış 3.5 ml bakteri ile 3.5 ml istenen konsantrasyonun 2 misli antibiyotik konarak bakteri sayısı 5X10⁵ CFU/ml'ye ve antibiyotik de 50MIC'e ayarlandı. Kontrol tüplerine ise antibiyotik yerine 3.5 ml MHB eklendi. Her deney dublike çalışıldı. Daha sonra her tüpten 1'er ml alındı ve 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek serbest endotoksin miktarını saptamak için steril ependorf tüplere konarak -70°C'de donduruldu. Total endotoksin miktarını saptamak için, alınan 1'er ml'lik örnekler filtre edilmeden tüplere kondu ve -70°C'de saklandı. Bakteri sayımı için tüplerden alınan 50µl'lik örnekler seri sulandırılmalar yapıldıktan sonra kanlı agar içeren petri kutularına dublike olarak 50µl'lik ekimler yapıldı ve bir gecelik inkübasyondan sonra canlı sayımlar gerçekleştirildi. Aynı işlemler 1., 2. ve 4. saatlerde tekrarlandı. Seftazidim için MIC değeri 6.25 µg/ml olarak ayarlandı ve yukarıda anlatılan işlemler aynen tekrarlandı. Literatürdeki bilgiler ışığında toplanan tüm örnekler endotoksin tayinine kadar -70°C'de saklandı.

3.4. In-Vivo Endotoksin Salınım Çalışması

Farelerde E.coli bakteriyemisi olup olmadığı test edildi ve yapılan ön çalışmalar sonucu farelerde bakteriyemi oluşması için 0.5 ml serum fizyolojik içinde 10⁸ CFU/ml E.coli'nin intraperitoneal yolla verilmesinin gerekli olduğu saptandı. Farelere saptanan miktarda bakteri verildikten sonra 3 gün süreyle izlendi ve bakteriyemi nedeniyle ölüm olmadığı görüldü. Farelerdeki bakteri düzeyinin, in-vitro çalışmada başlangıçta verilen 5X10⁵ CFU/ml düzeyine inmesi için gerekli sürenin 2 saat olduğu

saptandı. Bu nedenle farelere antibiyotik verilmeden 2 saat önce 0.5 ml serum fizyolojik içinde 10^8 CFU/ml E.coli verildi. Yapılan bioassayler sonucuna göre, farelerin plazmasında antibiyotiklerin 50MIC düzeye ulaşabilmeleri için 18600 µg/ml ampisilin, 9600 µg/ml sulbaktam-ampisilin ve 1800 µg/ml seftazidimin verilmesi gerektiği saptandı. Her antibiyotik grubu için fareler 4'lü gruplara ayrıldı ve her birine saptanan miktarlarda antibiyotik 0.2 ml serum fizyolojik içinde intraperitoneal yolla enjekte edildi ve 3 gün süreyle izlendi. Üç gün sonunda farelerin ölmedikleri görüldükten sonra deneylere geçildi. Her deneyde ampisilin grubu için 16, sulbaktam-ampisilin grubu için 16, seftazidim grubu için 16 ve kontrol grubu için de 16 adet olmak üzere toplam 64 adet fare kullanıldı. Deneyler 2 kez yapıldı ve ağırlıkları 20-25 gram arasında değişen, 6-10 haftalık, outbred, dişi Swiss Albino fareler seçildi (31,32). Ön çalışmalar ve esas deneyler için toplam 162 fare kullanılmış oldu.

Her antibiyotik için 16 fareye 10^8 CFU/ml E.coli 0.5 ml serum fizyolojik hacim içinde verildi ve ardından 0. saat için 4 farenin kalbinden 0.6-1'er ml kan alınarak 50 ünite prezervatifsiz heparin içeren ajirojenik tüplere konuldu ve hemen buz üstüne yerleştirildi(33). Kalan 12 fare 1., 2. ve 4. saatler için kullanıldı. Tüplerden alınan 50'şer µl'lik örneklerden seri sulandırılmalar hazırlanarak kanlı agar içeren petri kutularına 50'şer µl'lik ekimler yapıldı ve 37°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra canlı sayımlar gerçekleştirildi.

3.5. Serbest ve Bağlı Endotoksinin Ayrılması

Her kan örneğinden alınan 1'er ml'lik alikotlar 1000g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek elde edilen plazma 0.45µm'lik fitreden geçirildi ve serbest endotoksin ayrıldı. Filtre edilmiş plazma 1:3 oranında ajirojenik su ile dilüe edilip 100°C'de 10 dakika süreyle tutulduktan sonra plazmadaki LAL inhibitörü inaktive edildi(7). Diğer 1ml'lik alikot ise buz

üstünde tutularak eritrositlerin çökmesi sağlandı ve kalan plazma toplandı. Trombositten zengin bu plazma hem serbest hem de total endotoksin içermekteydi. Plazma 1:3 oranında aprotjenik su ile sulandırıldıktan sonra 75°C'de 5 dakika süreyle tutuldu her iki örnek de kullanılabilece kadar -70°C'de saklandı.

3.6. Kromojenik LAL Deneyi

Plazma ve besiyerindeki endotoksin düzeyleri kromojenik LAL deneyi ile ve üretici firmanın (Sigma) tarifine uygun olarak gerçekleştirildi. Kitin içerdiği sulandırım sıvısı ile dilüsyonlar hazırlandı. Önce, 20000 ünite standart endotoksin (E.coli0.55:B5 lipopolysaccharide) içeren şişeye tarifine uygun olarak 5ml endotoksinsiz su eklenerek vortekslendi. 4000 EU/ml standart endotoksin elde edildikten sonra kullanılabilece kadar buzdolabında bekletildi ve aynı gün kullanıldı.

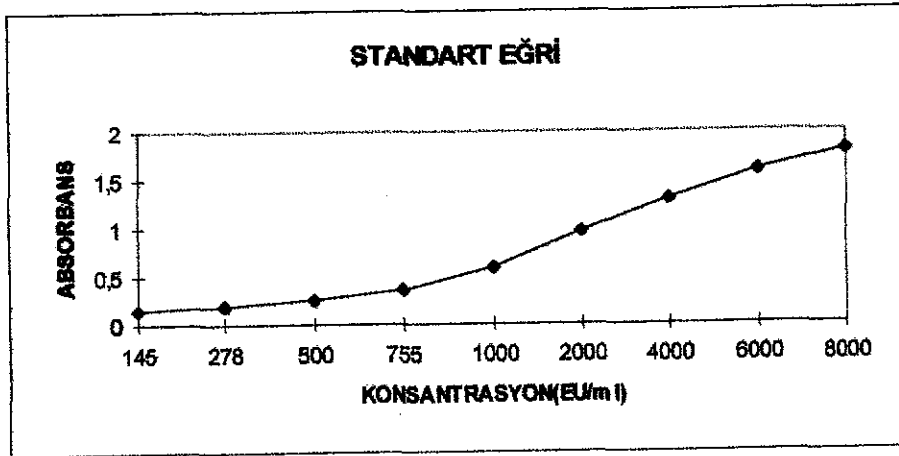
Ondört tane tüp alınarak standart endotoksinin aprotjenik su ile 400; 40; 4; 2; 1; 0.75; 0.50; 0.25; 0.15; 0.10; 0.08; 0.05; 0.02; 0.01EU/ml sulandırılmaları hazırlandı. Her bir tüpten 90µl alınarak başka tüplere aktarıldı. Sonra üzerlerine normal fare plazması (10µl) eklendi. Hazırlanan bu karışımın her birinden U tabanlı, steril mikrotitrasyon plaklarına 50'şer µl aktarıldı.

Dondurularak saklanmış olan örnekler eritildikten sonra 50'şer µl aynı mikrotitrasyon plaklarına kondu ve 37° C'de 5 dakika inkübe edildi. Sonra hepsine 50µl E-toxate solüsyonu eklendi. 37° C'de 16 dakika bekletildi. Inkübasyondan sonra her bir çukura 1:1 oranında tris bufferla karıştırılarak hazırlanan kromojenik substrat (N-Acetyl-Ile-Glu-Ala-Arg-p-nitroanilide, Sigma Catalogue # A0180) solüsyonundan 100'er µl eklendi. 37° C'de 8-10 dakika bekletilerek standart endotoksin sulandırılmalarındaki

kademeli sarı renk oluşumu gerçekleştikten sonra 40µl %50'lik asetik asit ile reaksiyon durduruldu(34).

Daha sonra 405nm dalga boyundaki spektrofotometrede renk absorbansı ölçüldü. Önce standart endotoksin sulandırılmalarından elde edilen standart eğri çıkarıldı. Eldeki örnekler sonra bu eğriye göre hesaplandı(Şekil 3.1). Standartların altındaki ve üstündeki değerler için formül kullanılarak endotoksin değerleri hesaplandı. Spektrofotometrenin saptadığı standart eğrinin çiziminde cihazın verdiği değerler temel alınarak ($A = 0.344$, $B = 0.151$) aşağıdaki formülden hesaplamalar yapıldı.

$$y = Ax + B \text{ (y: optik dansite, x: endotoksin konsantrasyonu)}$$



Şekil 3.1. Endotoksin düzeyinin hesaplanmasında kullanılan standart kalibrasyon eğrisi.

3.7. İstatistik Yöntemi

Endotoksin konsantrasyonları ve canlı sayımlarla ilgili bulgular Çift Yönlü Varyans Analizi ve Mann U Whitney testi ile analiz edildi. Sonuçlar, bulunan ortalama değerler ile bunların standart hataları olarak ifade edildi(35).

BULGULAR

4.1. İn-Vitro Çalışma

4.1.1. Bakteri Canlı Sayım Sonuçları: Ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle karşılaştırılmış E.coli ATCC 25922 standart suşunun 0., 1., 2. ve 4. saatlerdeki canlı sayımları önemli derecede düşüşler gösterdi (Çizelge 4.1).

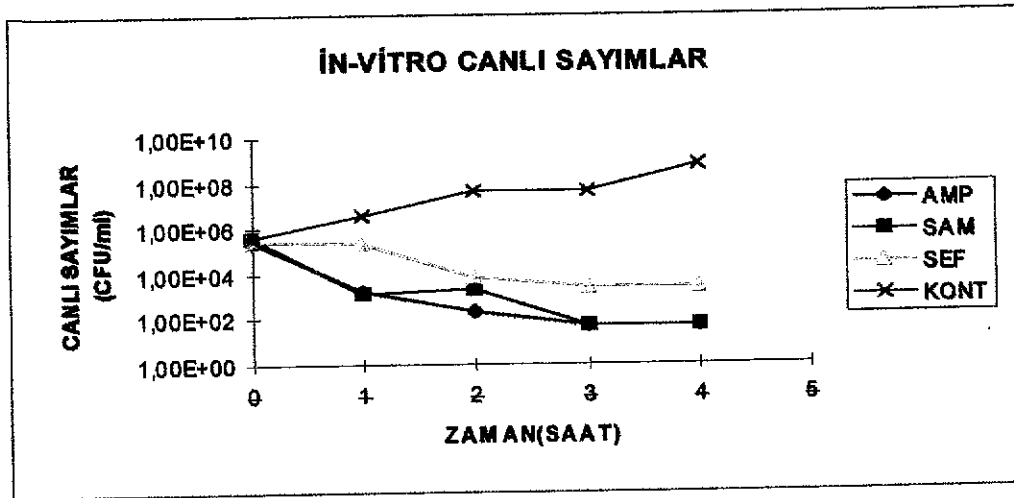
Çizelge 4.1. Standart E.coli'nin in-vitro şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle karşılaşması sonucu 4 saat içinde oluşan bakteri düzeyleri (CFU/ml).

	Ampisilin	SAM*	Seftazidim	Kontrol
0. Saat	2.3×10^5	3.8×10^5	2.7×10^5	3.9×10^5
1. Saat	1.6×10^3	1.1×10^3	2.0×10^5	2.9×10^6
2. Saat	0.2×10^3	1.2×10^2	6.0×10^3	1.6×10^7
4. Saat	1.0×10^3	0.8×10^2	2.9×10^3	2.3×10^9

SAM: Sulbaktam-ampisilin

MIC testinde kullanılan bakteri sayısının 3.9×10^5 CFU/ml olduğu bulundu. Bakterilerin 100°C 'de 10 dakika ısıtılmaları sonucunda tüm bakterilerin öldüğü saptandı. Birinci saat sonunda ampisilinle karşılaştırılan bakteri sayısında yaklaşık 144 kat ve sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılan bakteri sayısında yaklaşık 345 kat düşüş saptanırken seftazidimle karşılaştırılan kültürlerde bu düşüşün yaklaşık 1.5 kat olduğu gözlemlendi. Birinci saatteki en dramatik düşüşün sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılan kültürlerde gerçekleştiği görüldü. İkinci saatte ampisilinle karşılaştırılan bakteri sayısında birinci saate göre yaklaşık 8 kat, sulbaktam-ampisilinde 9 kat ve seftazidimde yaklaşık 33 kat düşüş görüldü. Dört saatlik süre sonunda ampisilinle karşılaştırılan kültürlerde

sıfırncı saate göre 230 kat , sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılanlarda bakteri sayısında 4750 kat düşüş görüldü. Seftazidimle karşılaştırılan bakteri sayısında ise sadece 93 kat düşüş gözlemlendi. Sonuç olarak, ortalamalar incelendiğinde en çok sulbaktam-ampisilin, daha sonra ampisilin, en düşük oranda da seftazidimin bakteri sayısını düşürme yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi. Bu bulguların istatistiksel analizi sonucunda kullanılan 3 antibiyotik arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı (F=75.58, p=0.00). Antibiyotiklerin 0,1,2 ve 4. saat dilimlerindeki düşüşleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu (F=31.3, p=0.00) ve zamanlar arasındaki değişimin de istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu saptandı (Şekil 4.1). Bu şekilde E, Exponential'ın kısaltılmışı olup 10 üzeri anlamına gelmektedir. Örneğin, $1,00E+02=1 \times 10^2=100$ 'dür.



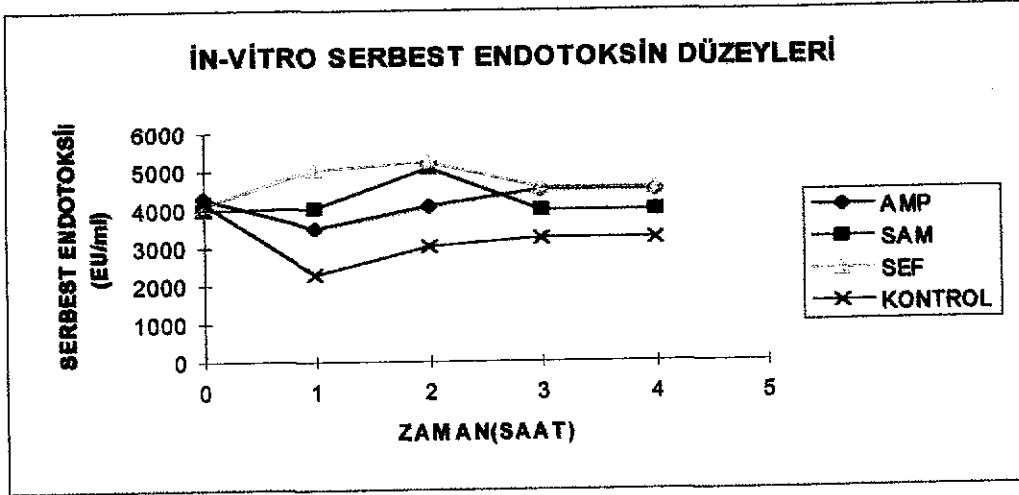
Şekil 4.1. Standart E.coli'nin in-vitro şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidim ile karşılaşması sonucu 4 saat içinde oluşan bakteri canlı sayımlarının karşılaştırmalı grafiği (CFU/ml).

Kontrol kültürlerinde ise 1. saat sonunda yaklaşık 8 kat artış saptanırken bu artışın 2. saatte 1. saate göre yaklaşık 6 kat ve 4. saatte 0. saate göre 6000 kat artış görüldüğü saptandı. Kontrol kültürlerindeki artışın başlangıca göre en fazla 4. saatte gerçekleştiği izlendi. Kontrol kültürleri ile farklı antibiyotiklerin canlı sayımları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p=0.05).

4.1.2. Endotoksin Miktar Çalışması Sonuçları: Çalışılan 3 antibiyotikle karşılaştırılan E.coli ATCC 25922 kültürlerinde 0, 1, 2 ve 4. saatlerde görülen serbest endotoksin miktarlarına göre antibiyotikler arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı saptandı (F=1.218, p=0.41, Çizelge 4.2).

In-vitro serbest endotoksin miktarının en çok seftazidim ile karşılaştırılan kültürlerde gerçekleştiği ve onu sırasıyla sulbaktam-ampisilin ve ampisilin izlediği görüldü.

Antibiyotiklerin çeşitli zaman dilimleri arasında serbest endotoksin miktarı açısından izledikleri yol incelendiğinde zamanlar arasındaki istatistiksel açıdan fark olmadığı (F=0.727, p=0.56) ve çeşitli zaman dilimlerinde görülen değişimin paralellik gösterdiği saptandı (F=0.557, p=0.76, Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Üç farklı antibiyotikle karşılaşan E.coli kültürlerinin 4 saatlik süre içinde görülen serbest endotoksin miktarlarının karşılaştırmalı grafiği.

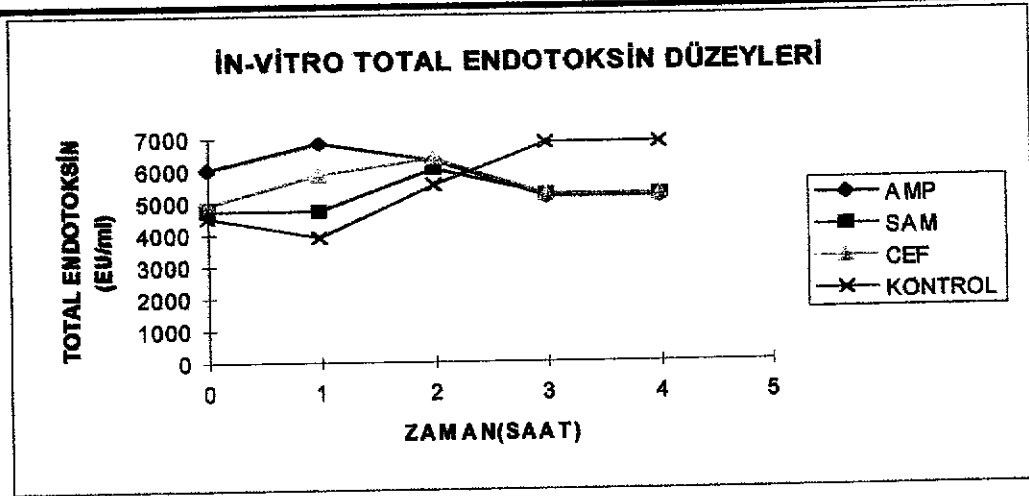
Not: AMP:Ampisilin, SAM:Sulbaktam-ampisilin, SEF: Seftazidim.

Total endotoksin çalışmaları sonuçlarına göre antibiyotikler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı (F=4.28, p=0.76) ancak izlenen

zaman dilimleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli sayılabileceği saptandı (F=1.17, p=0.40, Şekil 4.3 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Standart E.coli'nin in-vitro şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle 4 saatlik kültürü sonucu oluşan serbest (S) ve total (T) endotoksin (Ortalama±Standart sapma) ile serbest endotoksinin total endotoksin içindeki yüzdesi (EU/ml). 0. Saatte ampisilin(Total)=6010±960, SAM (Total)=4711±787, Seftazidim (Total)=4856±988, Kontrol (Total)=3107±423.

	0.Saat (S)	1. Saat(S)	2. Saat(S)	4. Saat(S)	4.Saat(T)	4.Saat(S) %
AMP	4244±309	3483± 1540	4061±98	4470±599	5114±1339	87
SAM	3960± 318	3986± 418	5037±430	3955±1307	5158±236	76
SEF	4075± 1762	4989±26	5233±79	4514±1069	5198±496	86
Kontrol	4145± 120	2250±550	3000	3200	6200	50



Şekil 4.3. Farklı antibiyotiklerle karşılaştırılan E.coli ATCC 25922'nin 4 saatlik süre içinde gözlenen total endotoksin miktarının karşılaştırmalı grafiği.

Total endotoksin açığa çıkarma özelliklerine göre, en yüksek oranın ampisilin tarafından oluşturulduğu ve onu sırasıyla seftazidim ve sulbaktam-ampisilin izlediği gözlemlendi. Kontrol grubu diğerlerinden daha fazla sayıda bakteri içerdiğinden en yüksek oranda total endotoksin içerdiği görüldü.

4.2. In-vivo Çalışma

4.2.1. Canlı Sayım Sonuçları: In-vivo çalışmada farelere verilen bakteri miktarının in-vitro koşullarla benzerlik göstermesi için yapılan pilot çalışmalar sonucu, deneyin başlamasından 2 saat önce 10^8 CFU/ml, log faza getirilmiş E.coli ATCC 25922'den 0.2 ml verildi. Farklı antibiyotiklerle karşılaştırılmış farelerde 0, 1, 2 ve 4. saatlerde görülen canlı sayım sonuçlarına göre her 3 antibiyotikle karşılaşan bakteri düzeylerindeki fark istatistiksel açıdan önemli bulundu ($F=240.9$, $p=0.00$, Çizelge 4.3). Canlı sayımları en çok öldürme yeteneğine sahip antibiyotiğin ampisilin olduğu ve onu sırasıyla sulbaktam-ampisilin ve seftazidimin izlediği görüldü.

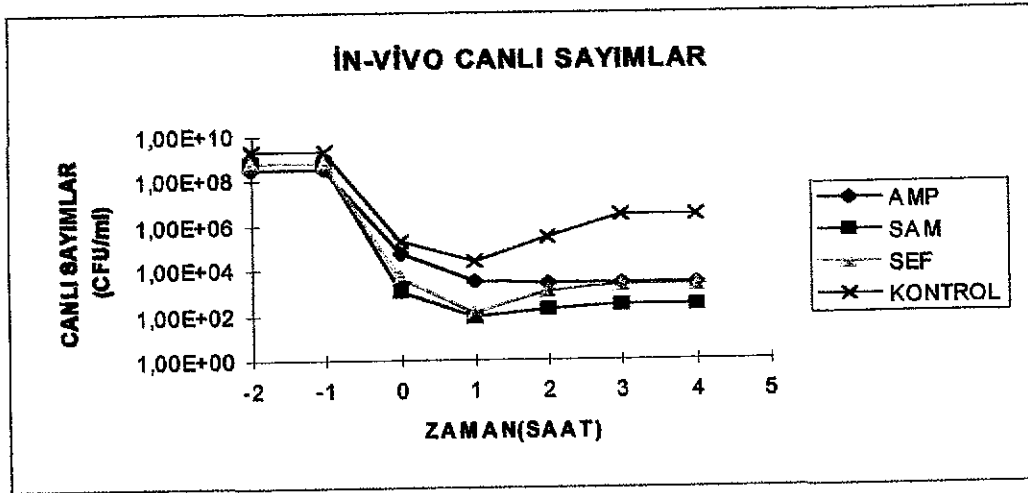
Çizelge 4.3. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde, kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşması neticesinde görülen bakteri canlı sayım sonuçları(CFU/ml).

	AMP	SAM	SEF	Kontrol
-2. Saat	2.3×10^8	6.6×10^8	2.9×10^8	1.9×10^8
0. Saat	9.1×10^3	1.2×10^3	4.7×10^3	1.6×10^5
1. Saat	3.1×10^3	0.7×10^2	1.1×10^2	2.8×10^4
2. Saat	2.2×10^3	1.5×10^2	1.2×10^3	2.4×10^5
4. Saat	3.0×10^3	2.5×10^2	2.0×10^3	9.6×10^6

AMP: Ampisilin, SAM: Sulbaktam-ampisilin, SEF: Seftazidim

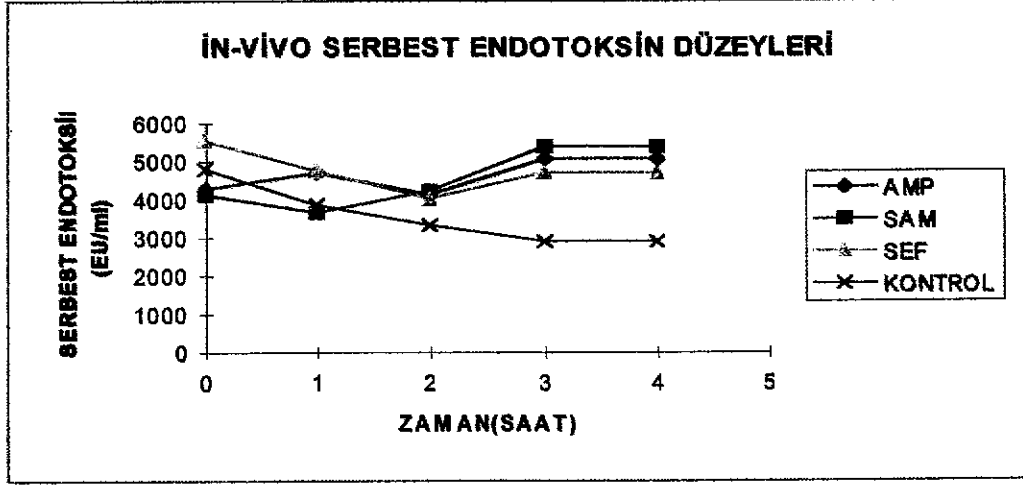
Ampisilinle karşılaşan bakterilerin 0. saatte 2 saat öncesine göre 25.000 kat düşüş gösterdiği, sulbaktam ampisilinle karşılaşan bakterilerin 550.000 kat düşüş gösterdikleri ve seftazidimle karşılaşan bakterilerin ise 62.000 kat düşüş gösterdikleri saptandı. Dördüncü saat sonunda ampisilinle karşılaşan bakterilerdeki düşüş 77.000 kat, sulbaktam ampisilin için 2.640.000 kat ve seftazidim için de 145.000 kat düşüş

...gözlendi. Sonuç olarak, en yüksek düşüşün sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılan bakterilerde meydana geldiği görüldü. Bu bulguların incelenen zaman dilimleri arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=865$, $p=0.00$). Ayrıca, antibiyotiklerin çeşitli zaman aralıklarındaki etkileri sonucu oluşan değişimlerdeki farklılık da anlamlı bulundu ($F=183$, $p=0.00$, Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Standart E.coli'nin in-vivo şartlarda 50MIC düzeyinde ampisilin, sulbaktam- ampisilin ve seftazidim ile karşılaşması sonucu 4 saat içinde oluşan bakteri canlı sayımlarının karşılaştırmalı grafiği (CFU/ml).

4.2.2. Endotoksin Miktar Çalışması Sonuçları: E.coli ATCC 25922 ile bakteriyemi oluşturulmuş farelerin plazmasında 50MIC düzeyinde antibiyotiklerle karşılaştırılan bakterilerin 0, 1, 2 ve 4. saatlerdeki serbest endotoksin salınımı açısından antibiyotikler arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmadı ($F=2.23$, $p=0.26$, Çizelge 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde, kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşması neticesinde görülen serbest endotoksin düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği.

Çizelge 4.4. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşmaları sonucu oluşan serbest (S) ve total (T) endotoksin (Ortalama \pm Standart sapma) ile serbest endotoksinin total endotoksin içindeki yüzdesi (EU/ml). 0. Saatte ampisilin (Total)=6248.5 \pm 214.3, SAM (Total)=5415.5 \pm 630, Seftazidim (Total)=6064.883.8, Kontrol(Total)=7313 \pm 500.

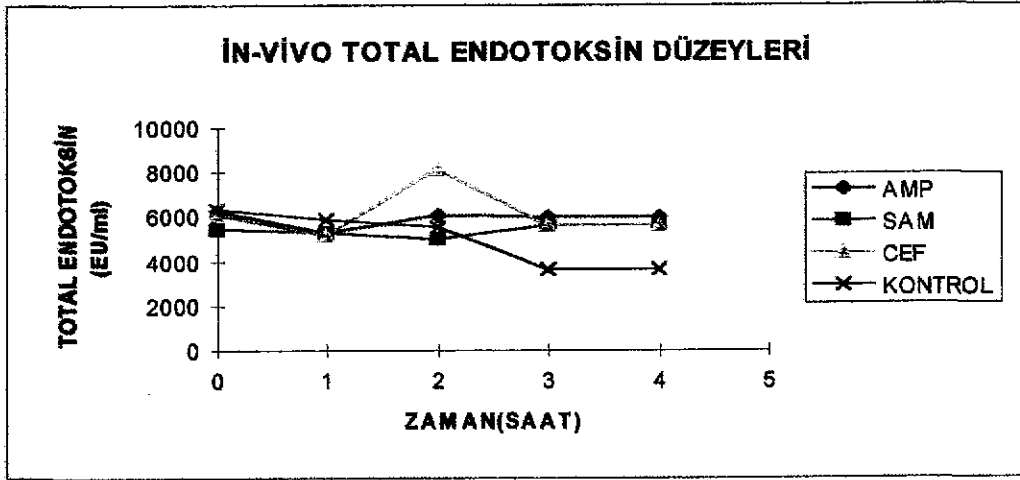
	0.Saat(S)	1.Saat(S)	2.Saat(S)	4.Saat(S)	4.Saat(T)	4.Saat(S) %
AMP	4269.5 \pm 26	4694 \pm 490	4093 \pm 721	5045 \pm 105	5912 \pm 770	85
SAM	4113 \pm 968	3657 \pm 520	4225 \pm 281	5353.5 \pm 34	5614 \pm 142	95
SEF	5536 \pm 641	4762 \pm 655	4016 \pm 568	4672 \pm 53.7	5630 \pm 448	82
Kontrol	4813 \pm 355	3865 \pm 423	3325 \pm 110	2900 \pm 300	3600 \pm 500	80

AMP: Ampisilin, SAM: Sulbaktam-ampisilin, SEF: Seftazidim

En yüksek oranda serbest endotoksin oluşturma yeteneğine sahip antibiyotiğin seftazidim olduğu ve onu sırasıyla ampisilin ve sulbaktam-ampisilin takip ettiği görüldü. Antibiyotiklerin zaman içinde izledikleri yol izlendiğinde, zamanlar arasındaki farkın %91 güvenilirlikle önemli olduğu

görüldü ($F=2.96$, $p=0.09$). Zaman içindeki değişimlerin ise paralel oldukları saptandı ($F=2.36$, $p=0.12$).

Total endotoksin salınımı incelendiğinde antibiyotikler arasındaki farkın önemli olduğu ($F=15.21$, $p=0.02$) ve en yüksek total endotoksin miktarı oluşturma yeteneğine seftazidimin sahip bulunduğu saptandı. Onu sırasıyla ampisilin ve sulbaktam- ampisilinin takip ettiği görüldü. Ancak zaman içinde görülen değişim incelendiğinde zamanlar arasındaki farkın önemsiz olduğu ve değişimin de paralellik gösterdiği izlendi ($F=2.223$, $p=0.14$, Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Standart E.coli suşu ile bakteriyemi oluşturulan farelerde, kullanılan β -laktam antibiyotiklerin plazmada 50MIC düzeyine ulaşması neticesinde görülen total endotoksin düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği.

4.3. İn-Vitro ve İn-Vivo Canlı Sayımların Karşılaştırılması

İn-vitro ve in-vivo canlı sayımlar karşılaştırıldığında, ampisilinle tedavi edilen farelerdeki canlı sayımların in-vitro deneylere göre daha yüksek olduğu saptandı ($U=63$, $p=0.017$). Yani ampisilinin in-vivo şartlarda in-vitro şartlara göre öldürme kapasitesinin daha düşük olduğu gözlemlendi. Sulbaktam-ampisilin ile seftazidim incelendiğinde in-vitro ve in-vivo deneyler sonucunda saptanan canlı sayımlar arasında istatistiksel

açıda fark olmadığı saptandı ($U=138$, $p=0.28$, $U=178.5$, $p=0.13$). Kontrol kültürlerinde ise in-vitro canlı sayımların in-vivo kültürleri göre daha yüksek oldukları gözlemlendi ($U=223$, $p=0.015$).

4.4. Canlı Sayımlar ile Endotoksin Miktarı Korelasyonunun İncelenmesi

4.4.1. İn-Vitro Korelasyon

Yapılan Spearman Korelasyon Katsayısı testlerine göre, in-vitro şartlarda ampisilinin serbest endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayım sonuçlarındaki değişimin aynı yönde ancak istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($r_s=0.50$, $p=0.67$). Total endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayım sonuçlarındaki değişimin ters yönde ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptandı ($r_s=-1$, $p=0.00$). Yani ampisilin canlı sayımları düşürürken total endotoksin oluşumunda artış görüldü. Sulbaktam-ampisilinin serbest ve total endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayımlar arasında aynı yönde ancak anlamlı olmayan bir ilişki çıktı (Sırasıyla $r_s=0.50$, $p=0.67$, $r_s=0.50$, $p=0.67$). Seftazidimle karşılaştırılan kültürlerde serbest ve total endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayımlar arasında ters yönde ancak anlamlı olmayan bir ilişki çıktı ($r_s=-0.50$, $p=0.67$, $r_s=0.50$, $p=0.67$).

4.4.2. İn-Vivo Korelasyon

Standart E.coli ile bakteriyemi oluşturulmuş farelerin 50MIC düzeyinde ampisilinle karşılaştırılması sonucunda adı geçen antibiyotiğin serbest endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayımlar arasında ters bir ilişki olup istatistiksel olarak anlamlı değildir ($r_s=-.036$, $p=0.76$). Total endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayımlar arasında aynı yönde ancak önemli olmayan bir ilişki ortaya çıkmıştır ($r_s=0.84$, $p=0.36$).

Aynı şekilde bakteriyemi oluşturulmuş farelerin 50MIC düzeyinde sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılmaları sonucunda serbest endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayımlar arasında aynı yönde ve istatistiksel açıdan önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır ($r_s=1.00$, $p=0.00$). Yani canlı sayımlardaki artışa paralel olarak serbest endotoksin miktarında da artış görülmektedir. Aynı farelerde canlı sayımlar ile total endotoksin miktarı arasında aynı yönde ancak önemli olmayan bir ilişki vardır ($r_s=0.5$, $p=0.67$).

Seftazidimle karşılaştırılan bakteriyemik farelerde canlı sayımlar ile serbest ve total endotoksin miktarı açısından aynı yönde ancak önemli olmayan bir ilişki saptanmıştır ($r_s=0.50$, $p=0.67$, $r_s=0.50$, $p=0.67$).

4.5. İn-Vitro ve İn-Vivo Endotoksin Miktarlarının Karşılaştırılması

Yapılan Mann U Whitney testlerinin sonuçlarına göre in-vivo ve in-vitro şartlarda ampisilinle karşılaştırılan kültürlerde serbest ve total endotoksin miktarı açısından fark olmadığı saptanmıştır ($U=17$, $p=0.115$, $U=40$, $p=0.4$).

Sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılan kültürlerde in-vitro ve in-vivo şartlarda serbest ve total endotoksin miktarı açısından fark olmadığı görülmüştür ($U=38$, $p=0.83$, $U=28$, $p=0.67$).

Aynı şekilde aynı şartlarda seftazidimle karşılaştırılan kültürlerde de endotoksin miktarı açısından fark olmadığı belirlenmiştir ($U=38$, $p=0.52$, $U=25$, $p=0.46$).

TARTIŞMA

Gram-negatif enfeksiyonların tedavisi bakteriyemi ve endotoksemi gibi iki ölümcül durumun eliminasyonunu içermektedir. Bu noktada antibiyotik tedavisi ile bakteriyeminin tedavisini takiben artan endotoksin salınımı neticesinde endotokseminin ortaya çıkması gibi terapötik bir ikileme karşı karşıya kalınmaktadır. Yapılan in-vitro ve hayvan çalışmaları sonunda gram-negatif enfeksiyonların antibakteriyel tedavisinin endotoksin (LPS) salınımını indüklediği bildirilmiştir(4,7-9,25,27).

Antimikrobiyal tedavinin bu yan etkisi üzerinde gün geçtikçe daha önemle durulmaktadır. Son yıllardaki tartışmanın konusunu çeşitli antibiyotiklerin farklı miktarlarda endotoksin salınımı oluşturmuş ve sonuç olarak antimikrobiyal ajanların etki mekanizmalarının LPS salınım miktarını etkileyebileceği konusunda fikir birliğine varılmıştır(3,8). Yapılan in-vitro çalışmalarda gram-negatif bakterilerden farklı antimikrobiyal ajanların etkisiyle değişik miktarlarda LPS salınımı gösterilmiştir(9,36). Yapılan bir çalışmada , tavşanlarda oluşturulan deneysel gram-negatif bakteriyel sepsisin tedavisinde LPS salınımının kullanılan antibiyotik sınıfına göre farklılık gösterdiği ancak bunun bakteri ölümü ile direkt bir ilişki göstermediği ortaya konmuştur(8). İn-vitro deneylerin sonuçlarına dayanarak, kinolon antibiyotiklerin, bu ajanların kullanımını takiben erken dönemde ve devamlı bir endotoksin salınımına neden oldukları ve bu salınımın hızlı ve belirgin bir bakterisid etkiyle paralellik gösterdiği rapor edilmiştir. Bu bulgulara karşın, gentamisin'in in-vitro şartlarda kullanımı sonucunda önemli oranda bir endotoksin salınımına neden olmadığı saptanmıştır(26,37). Ancak, in-vitro deneylerin sonuçlarının hastalardaki LPS salınımıyla ilgili sorunlara tatmin edici cevaplar vermesi mümkün değildir çünkü in-vivo şartlarda antibiyotik kullanımı sonucu meydana gelen LPS salınımının hızı ve miktarı ile ilgili olarak yeterli bilgi birikimi henüz

yoktur. Ayrıca, antimikrobiyal ajanların farmakokinetikleri ve endotoksin salınımı ile klerans mekanizmasının fizyolojik etkileşiminin, in-vivo deneyler tarafından henüz açıklığa kavuşturulmadığı bildirilmiştir(38).

Bu çalışmada, farklı β -laktam antibiyotiklerin deneysel yolla oluşturulmuş gram-negatif enfeksiyonun erken döneminde bakteri öldürme ve etki mekanizmalarındaki farklılık ile endotoksin salınım hızı ve miktarı üzerindeki etkisi incelendi. In-vitro şartlarda üretilen standart E.coli'nin antibiyotiklerle karşılaştırılması sonucu görülen bakteri ölümü ile endotoksin salınım kinetiğinin in-vivo şartlarla paralellik sağlayabilmesi için kullanılan farelerin plazmalarındaki antimikrobiyal ajanların aynı düzeyde olmalarına çalışıldı. Bu şekilde antimikrobiyal ajanların in-vitro farmakokinetiğinin in-vivo şartlara yansımalarının incelenmesi ve varsa iki farklı durum arasındaki korelasyonun irdelenmesi amaçlandı. Çalışmada kullanılan farelerin deneysel yolla infekte edilmesinden ve farklı dozlarda antibiyotik yüklemesi yapıldıktan sonra 24-72 saat süreyle lethaliteleri izlendi. Anılan süre sonunda lethalitenin gerçekleşmediği saptandıktan sonra antibiyotiklerin doz ayarlamaları yapıldı ve çalışmaya geçildi.

Serbest ve total endotoksini ayırmada kullanılan filtre seçiminde $0.22\mu\text{m}$ 'lik por çapına sahip filtrelerin bakterileri tutup endotoksini geçirmesine rağmen bu filtrelerin kulanımı esnasında yüksek basınç uygulanması gerekeceğinden $0.45\mu\text{m}$ 'lik por çapına sahip filtreler kullanıldı. Yüksek basınç uygulandığı takdirde serbest endotoksinin yanısıra hücrelerin parçalanması sonucunda total endotoksinin serbest endotoksin gibi değerlendirilebileceği sonucuna varıldı. Ek olarak, Andersen ve Solberg'in $0.45\mu\text{m}$ 'lik çapa sahip filtrenin kulanımıyla elde edilen sonuçların santrifüjlenmiş örneklerle paralellik gösterdiğini belirtmeleride bu seçimde etkili oldu(22).

Çalışmanın in-vitro bölümünün sonuçlarına göre β -laktam grubuna ait farklı antibiyotiklerle karşılaştırılan kültürlerde gözlenen canlı sayımlardaki düşüşler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanırken aynı antibiyotikler arasında serbest endotoksin salınımı açısından fark olmadığı saptandı. Canlı sayımlardaki düşüşler arasında fark olması 3 antibiyotiğin E.coli'yi öldürme gücü açısından farklılık gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Patojeniteyi etkilemesi nedeniyle total endotoksinde daha önemli olduğu düşünülen serbest endotoksin salınımı açısından kullanılan antibiyotikler arasında herhangi bir fark olmaması kullanılan 3 antibiyotiğinde birbirine yakın miktarlarda serbest endotoksin salınım yeteneğine sahip olduklarını göstermektedir. Total endotoksin salınımı açısından antibiyotikler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ancak zaman dilimleri arasındaki farkın istatistiksel olarak %91 güvenilirlikle anlamlı olabileceği görüldü. Birinci saatte ampisilin ve seftazidimle karşılaştırılan kültürlerin total endotoksin salınımında artış gözlenirken 2. saatte sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle karşılaştırılan kültürlerin total endotoksin salınımında artış görüldü. Dördüncü saatte ise tüm antibiyotiklerle karşılaştırılan kültürlerin total endotoksin salınımlarında düşüş olduğu izlendi. Bu nedenle in-vitro şartlarda total endotoksin salınımı açısından ilk 2 saatin yani erken dönemde antibiyotik kullanımının önemli olduğu saptandı.

Farelerde farklı antibiyotiklerin kullanımı sonucu bakteri kültürlerinde görülen canlı sayım sonuçlarının istatistiksel açıdan farklı olmadığı görüldü. Bu bulgular, in-vivo koşullarla in-vitro koşulların paralellik gösterdiğini düşündürdü çünkü hem in-vitro koşullarda hem de in-vivo koşullarda canlı sayımlardaki en büyük düşüş sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılan kültürlerde gerçekleşti. In-vivo koşullarda en yüksek serbest endotoksin salınım yeteneğine sahip antibiyotiğin seftazidim olduğu görüldü. Bu sonuçlara paralel olarak en yüksek total endotoksin salınım yeteneğine seftazidimin sahip olduğu gözlemlendi. Yani

antibiyotiklerle karşılaşan bakterilerin serbest ve total endotoksin salınım kinetiklerinin paralellik gösterdikleri saptandı. Kullanılan antibiyotiklerin çeşitli zaman dilimleri arasında serbest endotoksin salınımı açısından fark göstermemesi ve farklı zaman dilimlerinde görülen değişimin paralellik göstermesi de yukarıdaki bulgulara uygunluk gösterdi. Ampisilinle karşılaştırılan kültürlerde 1. saatte serbest endotoksin salınımı açısından düşüş gözlenirken sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılan kültürlerde minimal bir artış gözlemlendi. En yüksek salınımın ise seftazidimle karşılaştırılan kültürlerde gerçekleştiği gözlemlendi. Bu sonuçların, Dofferhoff ve grubunun aynı standart E. coli suşunu kullanarak gerçekleştirdikleri endotoksin salınım çalışmasıyla uyum gösterdiği görüldü(9). Her iki çalışmada ilk 1. saatteki en yüksek serbest endotoksin salınımının β -laktam grubuna ait olan seftazidim tarafından gerçekleştirildiği gözlemlendi. Dofferhoff ve grubu yaptıkları çalışmanın sonunda β -laktam antibiyotikler arasında bile endotoksin salınımı açısından farklılıklar gözlenebileceğini bildirmiş ancak laboratuvarlarımızda yapılan çalışmada kullanılan antibiyotikler seftazidim dışında Dofferhoff'un çalışmasında kullanılmadığından karşılaştırma imkanı olmamıştır. Shenep ve çalışma grubunun tavşanlarda deneysel yolla sepsis oluşturması sonucu LPS salınımının antibiyotik sınıfına bağlı olarak gerçekleştiği ancak canlı sayımlarla herhangi bir korelasyon olmaması sonucuyla uyum göstermektedir(8). Bu çalışmada antibiyotiklerin LPS salınımı açısından farklılık göstermemeleri ise hepsinin hücre duvarına etki eden β -laktam antibiyotikler grubuna dahil olmaları ile değil ancak yüksek konsantrasyona bağlı olarak böyle bir davranış içine girmiş olmalarıyla açıklanabileceği düşünülmektedir. Kullanılan 3 antibiyotik farklı zaman dilimlerinde istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da farklı oranlarda serbest ve total endotoksin salınım kinetiği gösterdikleri gözlemlenmiştir. Nitsche ve grubu da yaptıkları bir çalışmada LPS salınımı ile canlı sayımlar arasında herhangi bir paralellik olmayabileceğini öne sürmüşlerdir(39). Bu nedenle farklı antimikrobiyal ajanların endotoksin

salınım sonuçlarının tedavinin erken dönemi için in-vivo şartlara uyarlanamayacağını bildirmişlerdir. İn-vitro ve in-vivo canlı sayımlar karşılaştırıldığında ampisilin in-vivo şartlarda in-vitro şartlara göre öldürme kapasitesinin daha düşük olması Nitsche ve grubunun çalışma sonuçlarıyla uyumlu olup aynı şekilde açıklanabilir. Ampisilin ile in-vitro şartlarda karşılaştırılan kültürlerdeki serbest endotoksin salınım yeteneği ile canlı sayımlardaki değişimin aynı yönde olması Dofferhoff ile grubunun gerçekleştirdikleri çalışmada incelenen Kloramfenikol ile aynı davranış biçimine sahip olduklarını göstermektedir(9). Ampisilinle karşılaştırılan kültürlerin canlı sayımlarda görülen düşmeyle beraber total endotoksin salınımında artış görülmesi beklenen bir gözlemdir. Sulbaktam-ampisilinle tedavi edilen farelerde serbest endotoksin salınımı ile canlı sayımlar arasında aynı yönde bir ilişki olması serbest endotoksinin daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak canlı bakterilerden salındığını ortaya koymaktadır. Gram-negatif enfeksiyonların tedavilerinin erken döneminde antimikrobiyal ajanların plazma endotoksin seviyesine etkilerini incelerken sadece etki mekanizmalarının ve bakteri öldürme hızlarının önemli olmadığı Nitsche ve çalışma grubu tarafından ileri sürülmüştür. Yaptıkları in-vivo çalışmanın sonuçlarına göre antimikrobiyal ajanların plazma endotoksin aktivitesine çeşitli faktörlerin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Mikroorganizmanın tipine göre farklılık gösteren bakterisidal aktivitenin, ilaç sınıfına ve lokal olarak ulaştığı konsantrasyonun önemli faktörler olabileceğini belirtmişlerdir. Bu nedenle, farmakokinetik ve serum konsantrasyonu ile MIC oranı ve bakterisidal aktivitenin yani in-vivo etki yada başka bir deyimle farmakodinamiğin önemli rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir(39). Mattsby-Baltzer ve grubu bakterilerdeki hücrelere bağlı LPS'yi, kültür ortamına serbestleşen LPS'yi ve saflaştırılmış LPS'yi lipid A'nın kimyasal bir markırı olan β -hydroxymyristic asit ile ve kromojenik limulus amebosit lizat testi ile ölçmüşler ve çalışılan bakterilerin ortama üreme döneminde önemli miktarlarda endotoksin serbestleştirdiğini göstermişlerdir(6). Ayrıca LPS'nin bu şeklinin

hücreye bağlı veya saflaştırılmış endotoksinden daha aktif olduğunu bildirmişlerdir. McConnell ve grubu da sepsis oluşturulan bölgenin antimikrobiyal ajanlar tarafından endotoksin salınımına etki edebileceğini ve sonuçta tüm sayılan faktörlerin sinerjistik etkisinin siprofloksasinin dozu ile etkilendiğini ve literatürdeki in-vitro sonuçlara göre neden daha düşük olduğunu açıklayabileceğini öne sürmüşlerdir(25).

Hurley antibiyotikler tarafından oluşturulan LPS salınımını incelediği geniş bir derleme sonucunda, gram-negatif enfeksiyonlarda hızlı bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerin kullanımının herhangi bir ters etkiye neden olmadığını ileri sürmüştür(2). Ayrıca, değişik antimikrobiyal ajanlar tarafından oluşturulan endotoksin salınım kinetiği ve miktarındaki farklılıkların klinik ilişkisi ve hastalara etkisinin klinik çalışmalarla incelenmesi gerekliliği vurgulanmıştır. Hurley derlemesinde antibiyotikler tarafından oluşturulan endotoksin salınım kinetiğindeki farklılıkların, septiseminin tedavisinde başvurulan ek tedavi yöntemlerinin sonucunda sınırlı kalmasından ileri gelebileceğini ve endotoksin ile sitokin seviyelerinin farklı antimikrobiyal ajanların kullanımı ile etkilenmiş olabileceğini ileri sürmüştür.

Ciddi gram-negatif enfeksiyonların tedavisi için antimikrobiyal ajan seçiminde en önemli kriterlerin antibakteriyal spektrum, bakterisidal aktivite ve farmakokinetik özellikleri olması kaçınılmaz özelliklerdir. Bu sayılan özelliklere ek olarak, antimikrobiyal ajanların LPS salınım kinetiği ve miktarına etkilerinin de göz önüne alınması gereklidir. Böylece kritik hastaların ciddi gram-negatif enfeksiyonlarının başlangıç tedavisinde antimikrobiyal ajanın seçiminde lizise yol açmaması, etkin ve hızlı bir şekilde canlı bakteri sayısını düşürürken aynı zamanda LPS salınımını minime indirmesi özelliklerine sahip olmasının gerekliliği bu konuda çalışma yapan araştırmacıların ortak kanısıdır(1,3,5-9). Adı geçen kriterlerin yüksek dozda siprofloksasin, aminoglikozidler ve

imipenem tarafından karşılandığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir(32). Beta-laktam antibiyotiklerin kullanımında antibakteriyal aktivitenin spesifik olarak hangi penisilin-bağlayan proteinle ilişkili olduğunun gözönüne alınması gerekliliği savunulmuştur.

E.coli'de 7 adet Penicillin-binding protein (Penisilin bağlayan protein- PBP) olup bakteri kromozomunun üstüne yayılmış farklı genler tarafından kodlandıkları ve iki farklı PBP'nin de zaman zaman bulunduğu gösterilmiştir(40,41). PBP 4 dışında tüm PBP'lerin sitoplazmik membranda buldukları ve deterjanların etkisiyle çözünür hale geçtikleri bildirilmiştir. Fizyolojik çalışmalar sonunda PBP 1, PBP 2 ve PBP 3'ün sırasıyla bakterinin uzamasında, şekillenmesinde ve septum oluşumunda görev aldıkları bildirilmiştir. Bu proteinlerin, E. coli'nin üstünde β -laktam antibiyotiklerin öldürme bölgeleri oldukları gösterilmiştir. PBP'lerin bağlanma profiline göre farklı β -laktam antibiyotikler veya aynı β -laktam antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarının farklı morfolojik değişikliklere yol açtıkları bildirilmiştir(40,42). Beta-laktam antibiyotiklerin molekül ağırlığı 60.000 olan PBP 3'e bağlanmaları sonucu bakteri hücrelerinde filamentasyonun oluştuğu ve PBP 3'ün hem penisilinlere hemde sefalosporin grubu antibiyotiklere duyarlı olduğu bildirilmiştir. PBP 1 ve 2'nin aksine PBP 3'ün β -laktam antibiyotiklerin periferindeki yapısal değişikliklere karşı duyarlı oldukları vurgulanmıştır(40). PBP 3 bir transpeptidaz olup bölünme sırasında çapraz duvarların oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Örneğin seftazidimin periplazmik mesafede PBP 3'e bağlanarak gram-negatif bakterilerin lizisine neden olduğu ve böylece septum oluşumuna neden olarak organizmanın uzamasına neden olduğu bildirilmiştir. Böylece hücrenin kitesinde atışa neden olarak LPS yapımında bir çoğalmaya neden olduğu rapor edilmiştir(43). Filamentasyon oluşumunun da serbest endotoksin miktarındaki artışa neden olabileceği bildirilmiştir(26). Sonuç olarak,

filament oluşturan ile oluşturmayan antibiyotiklerin etkinliklerini karşılaştırırken sadece canlı sayımlardaki azalmayı değerlendirmenin yeterli olmadığını, bakteri hücrelerinin kitlelerinin ve ilgili toksik maddelerinde göz önüne alınmasının gerekli olduğu öne sürülmüştür(3).

Gram-negatif bakteriler tarafından oluşturulan menenjitin tedavisinde bakterisidal antibiyotiklerin kuvvetli etkinlikleri nedeniyle bakteristatik antibiyotiklere tercih edildikleri bilinmektedir(44,45). Ancak gram-negatif sepsislerde bakterisidal antibiyotiklerin üstünlüğünün tartışmalı olduğu bildirilmiş ve 612 hastada gerçekleştirilen bir çalışmada bakteristatik antibiyotiklerle tedavi edilen hastalarda bakterisidal antibiyotiklerle tedavi edilenlere göre daha yüksek bir başarı oranı tespit edilmiştir. Bu beklenmeyen gözlemin bakterisidal antibiyotiklere karşın bakteristatik antibiyotiklerin kullanılması sonucu endotoksin serbestleşmesindeki azalma ile açıklanabileceği bildirilmiştir(2). Aminoglikozidlerin de koruyucu etkileri olduğu ve β -laktam antibiyotiklerin tek başına kullanılmalarına karşın kombine tedavilerde kullanılmalarının daha başarılı olabileceği öne sürülmüştür(46).

İnsan organizması endotoksini detoksifiye etme yeteneğine sahip olmasına rağmen klinik çalışmalarda endotoksinlerin izlediği yolla ilgili bilgilerin oldukça sınırlı olduğu bildirilmiştir. İnsan tarafından endotoksinin uzaklaştırılması ve detoksifikasyonu karmaşık bir işlem olup birçok etkene bağlı olduğu bildirilmiştir. Birçok hayvanın aksine insanların ve daha aşağı primatların endotoksine ileri derecede duyarlı oldukları bildirilmiştir. Bu nedenle sirkülasyondaki endotoksinin miktarı ile sepsisli hastaların kliniği arasında bariz bir doz-cevap ilişkisi kurmanın oldukça zor olduğu ve benzer nedenlerle hayvan modellerinden alınan endotoksin salınımı ile ilgili bilgilerin kliniğe uygulanmasında dikkatli davranmanın çok önem kazandığı öne

sürülmüştür(47). Bu çalışmada kullanılan outbred Swiss Albino farelerinin serbest ve total endotoksin oluşturma yeteneği açısından in-vitro şartlarla istatistiksel açıdan farklılık göstermemesi nedeniyle iyi bir deney modeli olarak kullanılabilirler düşünölmüştür.

Gram-negatif sepsisli hastalarda Reilly'nin 1950 yılında yayımlanan makalesinde dediğı gibi "*frappez fort et vite*" yani "hızla vurmak " yerine "*frappez doucement*" yani "yavaşça vurmak" terimi güncelliğini tartışma konusu olarak halen korumaktadır(48).

Bu çalışmanın sonunda, antibiyotiklerle karşılaştırılan kültürlerde görölen endotoksin salınımının, antibiyotiklerin gram-negatif basillere etki mekanizmasını aydınlatması, bazı enfeksiyonların antibiyotikle tedavisinin başlamasıyla birlikte yan etkilere neden olabilecek bir mekanizmanın aydınlatılması ve gram-negatif enfeksiyonların tedaviye cevabını yönlendirmek açısından önemli olduğı düşünölmektedir.

SONUÇLAR

1. Ampisilin, sulbaktam-ampisilin ve seftazidimle karşılaştırılmış E.coli ATCC 25922 standart suşunun 0., 1., 2. ve 4. saatlerdeki canlı sayımları önemli derecede düşüşler gösterdi. En çok sulbaktam-ampisilinin, daha sonra ampisilinin, en düşük oranda da seftazidimin bakteri sayısını düşürme yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi.
2. In-vitro serbest endotoksin miktarının en çok seftazidim ile karşılaştırılan kültürlerde gerçekleştiği ve onu sırasıyla sulbaktam-ampisilin ve ampisilinin izlediği görüldü.
3. In-vitro total endotoksin çalışmaları sonuçlarına göre antibiyotikler arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ancak izlenen zaman dilimleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli sayılabileceği saptandı. Total endotoksin açığa çıkarma özelliklerine göre, yüksek oranın ampisilin tarafından oluşturulduğu ve onu sırasıyla seftazidim ve sulbaktam-ampisilinin izlediği gözlemlendi.
4. E.coli ATCC 25922 ile bakteriyemi oluşturulmuş farelerin plazmasında 50MIC düzeyinde antibiyotiklerle karşılaştırılan bakterilerin 0, 1, 2 ve 4. saatlerdeki serbest endotoksin salınımı açısından antibiyotikler arasında fark gözlenmedi.
5. In-vivo total endotoksin salınımı incelendiğinde antibiyotikler arasındaki farkın önemli olduğu ve en yüksek total endotoksin miktarı oluşturma yeteneğine seftazidimin sahip bulunduğu belirlendi.
6. In-vitro ve in-vivo canlı sayımlar karşılaştırıldığında, ampisilinle tedavi edilen farelerdeki canlı sayımların in-vitro deneylere göre daha yüksek olduğu saptandı. Yani ampisilinin in-vivo şartlarda in-vitro şartlara göre öldürme kapasitesinin daha düşük olduğu gözlemlendi.

7. In-vitro şartlarda ampisilin canlı sayımları düşürürken total endotoksin oluşumunda artış görüldü. In-vivo şartlarda böyle bir negatif korelasyon gözlenmedi.

8. Bakteriyemi oluşturulmuş farelerin 50MIC düzeyinde sulbaktam-ampisilinle karşılaştırılmaları sonucunda serbest endotoksin oluşturma yeteneği ile canlı sayımlar arasında aynı yönde ve önemli bir ilişki olduğu ortaya çıktı. Yani canlı sayımlardaki artışa paralel olarak serbest endotoksin miktarında da artış görüldü.

9. In-vivo ve in-vitro farklı antibiyotiklerle karşılaştırılan kültürlerde serbest ve total endotoksin miktarı açısından fark olmadığı saptandı. Bu sonuçlar, kullanılan Swiss Albino farelerinin çalışılan deneyler için iyi bir model olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Bucklin SE, Fujihara Y, Leeson MC, Morrison DC. Differential Antibiotic-Induced Release of Endotoxin from Gram-Negative Bacteria. *Eur J Microbiol Infect Dis* 13(Suppl. 1):43-51,1994.
- 2- Hurley JC. Antibiotic-Induced Release of Endotoxin: A Reappraisal. *Clin Infect. Dis* 15:840-854, 1992.
- 3- Jackson JJ, Kropp H. Beta-Lactam Antibiotic-Induced Release of Free Endotoxin. In-Vitro Comparison of Penicillin-Binding Protein (PBP) 2-Specific Imipenem and PBP 3-Specific Ceftazidime. *J Infect Dis* 165:1033-1041, 1992.
- 4- Arditi M, Ables L, Yogev R. Cerebrospinal Fluid Endotoxin in Children with H. influenza Meningitis Before and After Administration of Intravenous Ceftriaxone. *J Inf Dis* 160:1005-1011, 1989.
- 5- Shenep JL, Flynn PM, Barrett FF, Stidham JL. Serial Quantitation of Endotoxemia and Bacteremia During Therapy for Gram-Negative Bacterial Sepsis. *J Infect Dis* 157:565-568, 1988.
- 6- Mattsby-Baltzer I, Lindgren K, Lindholm B, Edebo L. Endotoxin Shedding by Enterobacteria: Free and Cell-Bound Endotoxin Differ in Limulus Activity. *Infect Immun* 59:689-695, 1991.
- 7- Shenep JL, Mogan KA. Kinetics of Endotoxin Release During Antibiotic Therapy for Experimental Gram-Negative Bacterial Sepsis. *J Infect Dis* 150:380-388, 1984.

- 8- Shenep JL, Barton RP, Mogan KA. Role of Antibiotic Class in Rate of Liberation of Endotoxin During Therapy for Experimental Gram-Negative Bacterial Sepsis. *J Infect Dis* 151:1012-1018, 1985.
- 9- Dofferhoff ASM, Nijland JH, de Vries-Hospers HG, Mulder POM, Weits J, Bom VJJ. Effect of Different Types and Combinations of Antimicrobial Agents on Endotoxin Release from Gram-Negative Bacteria. *Scand J Infect Dis* 23:745-754, 1991.
- 10- Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. Bacterial Structure, p.9-14, In *Medical Microbiology*, 2nd Ed., Mosby-Year Book Inc., 1994, London.
- 11- Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, editors: Cell Structure, p. 7-32, In *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*, ed 21, Norwalk, Conn, 1995, Appleton & Lange.
- 12- Kotani S, et al. Immunobiological Activities of Synthetic Lipid A Analogs with Low Endotoxicity. *Infect Immun* 53(3): 673-682, 1986.
- 13- Ciurana C, Thomas JM. Role of Lipopolysaccharide and Complement in Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to Nonimmune Serum. *Infect Immun* 55(11):2741-2746, 1987.
- 14- Demonty J, De Graeve J. Release of Endotoxic Lipopolysaccharide by Sensitive Strains of *Escherichia coli* Submitted to the Bactericidal Action of Human Serum. *Med Microbiol Immunol* 170:265-277, 1982.
- 15- Cadieux JE, Kuzio J, Milazzo FH, Kropinski AM. Spontaneous Release of Lipopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 155(2):817-825, 1983.

- 16- Munford RS, Hall CL, Lipton JM, Dietschy JM. Biological Activity, Lipoprotein-binding Behaviour, and In-Vivo Disposition of Extracted and Native Forms of Salmonella typhimurium Lipopolysaccharides. J Clin Invest 70:877-888,1982.
- 17- Michie HR, Manogue KR, et al. Detection of Circulating Tumor Necrosis Factor After Endotoxin Administration. N Eng J Med 318(23): 1481-1486, 1988.
- 18- Morrison DC, Ryan JL.. Endotoxins and Disease Mechanisms. Ann Rev Med 38:417-432, 1987.
- 19- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji s.592-663, Birinci Cilt, Ankara 1987.
- 20- Kanra G, Penisillinler, ed., Akalın HE. Antibiyotikler: Temel Bilgiler ve Klinik Kullanımları, s.50-57. Türk Tabipler Birliği Yayınları, Ankara 1989.
- 21- Hoekstra D, Van Der Laan JW, De Leij L, Witholt B. Release of Outer Membrane Fragments from Normally Growing Escherichia coli. Biochim Biophys Acta 455:889-899, 1976.
- 22- Andersen BM, Solberg O. The Endotoxin Liberating Effect of Antibiotics on Meningococci In-Vitro. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B 88:231-236, 1980.
- 23- Munford RS, Hall CL, Grimm L. Detection of Free Endotoxin in Cerebrospinal Fluid by the Limulus Lysate Test. Infect Immun 45:531-533, 1984.

- 24- Anderson BM, Skjorten F, Solberg O. Electron Microscopical Study of *Neisseria meningitidis* Release Various Amounts of Free Endotoxin. *Acta Pathol Microbiol Scand (B)* 87:109-115, 1979.
- 25- McConnell JS, Cohen J. Release of Endotoxin from *Escherichia coli* by Quinolones. *J Antimicrob Chemother* 18:765-773, 1986.
- 26- Cohen J, McConnell JS. Antibiotic-Induced Endotoxin Release. *Lancet* 9:1069-1070, 1985.
- 27- Evans ME, Pollack M. Effect of Antibiotic Class and Concentration on the Release of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 167:1336-1343, 1993.
- 28- Hurley JC. Endotoxemia: Methods of Detection and Clinical Correlates. *Clin Microbiol Rev* 8(2):268-292, 1995.
- 29- Hurley JC, Tosolini FA, Louis WJ. Quantitative Limulus Lysate Assay for Endotoxin and the Effect of Plasma. *J Clin Pathol* 44:849-854, 1991.
- 30- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 3rd ed. Approved Standard M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993, Villanova, Pa.
- 31- Laethem YV, Klastersky, J. Use of Serum Bactericidal Titers in Animal Studies in Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy, Volume 1, 1st Ed. Oto Zak, Merle A. Sande, Academic Press Inc. ,1986, London.
- 32- Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of Antimicrobial Pharmacokinetic Parameters with

- Therapeutic Efficacy in an Animal Model. *J Infect Dis* 158:831-847,1988.
- 33- Marcum JA, Levin J. Heparin Inhibition of Endotoxin-Dependent Limulus Amebocyte Lysate Coagulation. *Thrombosis and Haemostasis* 31(2):194-297,1989.
- 34- Duner KI. A New Kinetic Single-stage Limulus Amoebocyte Lysate Method for the Detection of Endotoxin in Water and Plasma. *J Biochem Biophys Methods* 26:131-142,1993.
- 35- Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry, The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 2nd Ed. W.H. Freeman and Company, 1981, San Francisco.
- 36- Bingen E, Goury V, Bennani H, Lambert-Zechovsky N, Aujard Y, Darbord JC. Bactericidal Activity of Beta-Lactams and Amikacin Against *Haemophilus influenzae*: Effect on Endotoxin Release. *J Antimicrob Chemother* 30:165-172,1992.
- 37- Prins JM, van Deventer SHJ, Kuijper EDJ, Speelman P. Clinical Relevance of Antibiotic-Induced Endotoxin Release. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1211-1218,1994.
- 38- Cohen J, McConnell JS. Release of Endotoxin from Bacteria Exposed to Ciprofloxacin and its Prevention with Polymyxin B. *Eur J Microbiol* 5:13-17,1986.
- 39- Nitsche D, Schulze C, Oesser S, Dalhoff A, Sack M. Impact of Different Classes of Antimicrobial Agents on Plasma Endotoxin Activity. *Arch Surg* 131:192-199,1996.

- 40- Spratt BG, Pardee AB. Penicillin-Binding Proteins and Cell-Shape in *E.coli*. *Nature* 254:516-517,1975.
- 41- Suzuki H, Nishimura Y, Hirota Y. On the Process of Cellular Division in *Escherichia coli*: A Series of Mutants of *E.coli* Altered in the Penicillin-Binding Properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:664-668,1978.
- 42- Spratt BG. Distinct Penicillin-Binding Proteins Involved in the Division, Elongation and Shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2999-3003,1975.
- 43- Neu HC. Carbapenems: Special Properties Contributing to Their Activity. *Am J Med* 78:33-40,1985.
- 44- Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems: A New Class of Beta-Lactam Antibiotics. *Am J Med* 78:3-21,1985.
- 45- Matsuura M, Galanos C. Induction of Hypersensitivity to Endotoxin and Tumor Necrosis Factor by Sublethal Injection with *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 58:935-937,1990.
- 46- Andersen BM, Solberg O. Release of Endotoxin from *Neissera meningitidis*: A Short Survey with A Preliminary Report on Virulance in Mice. *Natl Inst Public Helth* 3:49-55,1980.
- 47- Mathison JC, Ulevitch RJ: The Clearance, Tissue Distribution, and Cellular Localization of Intravenously Injected Lipopolysaccharide in Rabbits. *J Immunol* 123:2133-2143,1979.
- 48- Buxton Hopkin DA. Frappez Fort Ou Frapper Doucement: A Gram-Negative Dilemma. *Lancet* 2:1193-1194, 1978.

ÖZGEÇMİŞ

Hakan Akıncıbay, 1959 yılında İstanbul'da doğdu. İlk öğrenimini Karadeniz Ereğli Erdemir ilkokulunda, orta öğrenimini TED Kdz. Ereğli Özel Ortaokulu ve Lisesinde tamamlayarak 1977 yılında mezun oldu. Aynı yıl girdiği Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesinden 1983 yılında mezun oldu ve Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalında Doktora programına başladı. 1987 yılında "Hızlı İlerleyen Periodontitisli Hastalarda Plak Antijenlerine karşı Lökosit İnhibitör Faktör Cevabı" isimli teziyle Periodontolojide Bilim Doktoru ünvanını aldı. 1987 yılında Finlandiya Hükümeti Bursu ile Helsinki Dişhekimliği Enstitüsü periodontoloji klinik ve mikrobiyoloji araştırma laboratuvarlarında 7 ay süreyle misafir araştırmacı olarak çalıştı. 1988 yılında başladığı askerlik görevini Samsun ve İstanbul Gümüşsuyu Askeri Hastanesinde Diş Tabip Asteğmen olarak ifa etti. 1992 yılında H.Ü. Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora programına girdi. 1993 yılında gerekli sınavları vererek Periodontoloji Doçenti ünvanını aldı. Halen H.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalında öğretim üyesi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır. İngilizce bilmektedir.