

Splenektomili Sıçanlarda Kapsüllü İnvazif *Streptococcus pneumoniae* Sepsisinde Beta-D-Glukanın Koruyucu Etkilerinin Araştırılması*

Investigation of The Protective Effects of Beta-D-Glucan Against Invasive Encapsulated *Streptococcus pneumoniae* Sepsis in Splenectomized Rats

Dilek VURAL KELEŞ¹, Hakan USLU¹, Osman Nuri KELEŞ², Bünyamin ÜNAL², Hamit Hakan ALP³

¹ Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

¹ Ataturk University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Erzurum, Turkey.

² Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

² Ataturk University, Faculty of Medicine, Department of Medical Histology and Embryology, Erzurum, Turkey.

³ Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Van

³ Yuzuncu Yil University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Van, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 06.12.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 01.05.2015

* Bu çalışma, "6th Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID), September 24th and 27th, 2014, Crown Plaza, Belgrade, Serbia" adlı uluslararası kongrede bildiri olarak sunulmuştur.

ÖZ

Asplenik bireylerde, immün yanıtta zayıflamaya bağlı olarak, splenektomi sonrası sepsis geliştiği ve yüksek mortalite oranlarına sahip olduğu bilinmektedir. Sepsis gelişiminden özellikle, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria meningitidis* gibi kapsüllü bakteriler sorumludur. Splenektomiye bağlı immün yetmezliğin neden olduğu sepsis, konakta özellikle karaciğer ve akciğer enfeksiyonları ile çoklu organ yetmezliklerine neden olmaktadır. Beta-D-glukan (BDG) ise, immüno-modülatör etkiye sahip dallanmış bir glukoz polimeri olup, konağın mikrobiyal etkenlere karşı direncini güçlendirmekte ve retikuloendotelial sistemin fagositik ve proliferatif aktivitesini artırmaktadır. Bu deneysel çalışmada, BDG'in, invazif kapsüllü serotip 19F *Streptococcus pneumoniae* sepsisine karşı tek başına ve seftriakson ile kombine olarak etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 36 adet Sprague-Dawley türü sıçan kullanılmış ve hayvanlar eşit olarak (6'şar adet); kontrol, splenektomi, sepsis, BDG, seftriakson ve BDG+seftriakson olmak üzere altı gruba ayrılmıştır. Tedavi gruplarına intravenöz yolla *S.pneumoniae* 19F izolatı inoküle edilmiş ve sakrifasyondan sonra, doku örneklerinde mikrobiyolojik [bakteri sayımı (cfu/mL)], biyokimyasal (myeloperoksidaz aktivitesi, DNA oksidasyonu, özgül IgM ve IgG düzeyleri) ve histopatolojik analizler yapılmıştır. Çalışmada; BDG, seftriakson ve BDG+seftriakson tedavi

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Hakan Uslu, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 25240 Erzurum, Türkiye. Tel (Phone): +90 442 231 6583, E-posta (E-mail): uhakan@hotmail.com

gruplarında, sepsis grupları ile karşılaştırıldığında tüm dokulardaki bakteri üreme miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). BDG'in tek ve kombine kullanımı ile; splenektomili sıçanlarda düşük serum IgM düzeylerini kısmen düzelttiği (sırasıyla; $p < 0.001$ ve $p < 0.02$) ve *S.pneumoniae* enfeksiyonu sonrası akciğer ve karaciğerde oksidatif DNA hasarını tamamen ortadan kaldırdığı gözlenmiştir ($p < 0.00001$). Ayrıca sepsis grubu ile karşılaştırıldığında, BDG'in tek ve kombine tedavisinin, tüm dokularda bakteri varlığını anlamlı düzeyde azalttığı belirlenmiştir ($p < 0.00001$). Elde ettiğimiz verilere göre, bir immünomodülatör olan BDG'in tek başına ve seftriakson ile kombine kullanımında, *S.pneumoniae* sepsisine bağlı gelişen sistemik inflamatuvar reaksiyonları önleyebildiği ve böylece çoklu organ hasarını azaltabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Beta-D-glukan; *Streptococcus pneumoniae*; sepsis; splenektomi; hayvan modeli.

ABSTRACT

In splenic individuals depending on the weakness of the immune response, sepsis are known to be developed with a high mortality rate. The most common species which are responsible for sepsis are encapsulated bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. Sepsis caused by immune deficiencies linked to splenectomy leads to infections particularly in the lungs and liver and causes multiple organ failure. On the other hand, β -D-glucan (BDG), a branched glucose polymer, shows immunomodulatory activity, by enhancing the resistance of the host against microbial agents, and promotes phagocytic and proliferative activities of reticuloendothelial system. The aim of this experimental study was to investigate the effects of BDG alone and in combination with ceftriaxone on sepsis caused by encapsulated invasive *S.pneumoniae* serotype 19F. A total of 36 Sprague-Dawley rats were used in the study, and the animals (6 in each group) were equally divided into six groups as control, splenectomy, sepsis, BDG, ceftriaxone and BDG+ceftriaxone groups. Treatment groups were intravenously infected with *S.pneumoniae* 19F strain, and after sacrifice, microbiological [bacterial counts (cfu/mL)], biochemical (myeloperoxidase activity, DNA oxidation, specific IgM and IgG levels) and histopathological analysis were performed in the tissue samples. In the study, BDG, ceftriaxone and BDG+ceftriaxone groups had statistically significant decrease in the amount of bacteria in all tissues when compared to the sepsis group ($p < 0.05$). We demonstrated that, BDG alone or combined treatment partially recovered the low serum IgM levels in splenectomized rats ($p < 0.001$ ve $p < 0.02$, respectively) and completely inhibited oxidative DNA damage in lung and liver after *S.pneumoniae* infection ($p < 0.00001$). In addition, BDG alone or combined treatment fairly minimized the presence of bacteria in all tissues, when compared with sepsis group ($p < 0.00001$). The data of our study suggests that, BDG, an immunomodulatory agent, alone and in combination with ceftriaxone can reverse the systemic inflammatory reaction in *S.pneumoniae* sepsis and thereby can reduce multiple organ failure.

Keywords: Beta-D-glucan; *Streptococcus pneumoniae*; sepsis; splenectomy; animal model.

GİRİŞ

Asplenik bireylerde splenektomi sonrası sepsis geliştiği ve %50-60 gibi yüksek mortalite oranlarına sahip olduğu bilinmektedir¹. Kapsüllü bakterilerin splenektomi sonrası gelişen sepsisten sorumlu oldukları ve bu kapsüllü bakterilerin çoğunu *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria meningitidis* türlerinin oluşturduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda, splenektomi sonrası oluşan sepsiste etkenlerin %66'sını pnömokokların oluşturduğu ve bakteriyel direncin yanı sıra splenektominin neden olduğu doğal ve edinsel immün yanıt yetmezliğinin önemli olduğu tespit edilmiştir¹⁻³. Kapsüllü pnömokokların oluşturduğu sepsise karşı yanıtta, özellikle dalağın marjinal zon

makrofajları ve B hücreleri ile IgM üreten bellek B hücrelerinin rolü vardır⁴. Splenektomi ile oluşan immün yetersizlik sonucu gelişen sepsis, konakta başta akciğer ve karaciğer olmak üzere çoklu organ yetmezliklerine ve enfeksiyonlarına yol açabilir⁵. *S.pneumoniae* serotiplerinin tedavi süreçlerine karşı direnç geliştirmesi güncel bir sorundur. Bu durumda, antibiyotik tedavisinin yanında, aspleni ile oluşan immün yetmezliğin düzeltilmesi gerekebilir⁶.

Beta-D-glukan (BDG), mantarlarda, mayada ve kepekte bulunan dallanmış bir glukoz polimeridir. BDG'ların temel immünofarmakolojik aktiviteleri; konağın viral, bakteriyel, fungal ve parazitik enfeksiyonlara karşı direncini güçlendirmesi, retiküloendotelial sistemin fagositik ve proliferatif aktivitesini artırmasını kapsamaktadır⁷⁻¹⁰. Bu çalışmada, splenektomi yapılan sıçanlarda, sepsisli hastalardan elde edilen kapsüllü invazif *S.pneumoniae* serotip 19F'in indüklediği sepsis üzerine, seftriaksonun ve bir immünomodülatör olan BDG'in tekli ve kombine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grupları

Bu çalışma, Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Etik Kurulu (Karar no: 2011.41./18) ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar no: 2011.10./106) onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmada, toplam 36 adet 8 haftalık 250 gram erkek Sprague Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı ve her grupta 6 tane olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Grup 1'e (Kontrol, n= 6) sadece cerrahi işlem uygulandı; diğer gruplar ve uygulamalar Tablo 1'de gösterildi. Bütün deneklere operasyondan sonra iki hafta iyileşme periyodu uygulandı. İyileşme periyodundan sonra Grup 2 hariç splenektomi yapılan tüm deneklere kuyruk veninden intravenöz olarak 1×10^6 CFU/mL bakteri uygulaması yapıldı ve denekler gruplara ayrıldı. Çalışmada sepsis tanılı hastadan izole edilen ve farklı bir merkezde Bio-Plex® (Bio-Rad, ABD) multipleks antijen tanımlama testi ile tanımlanan *S.pneumoniae* invazif 19F serotipi bakteri suşu kullanıldı. Seftriakson 20 mg/kg ve BDG 50 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak enjekte edildi. Grup 6'ya ise 20 mg/kg dozdaki seftriakson uygulamasının ardından 50 mg/kg

Tablo 1. Grupların oluşturulması ve uygulanan işlemler

Gruplar	Uygulama			
	Splenektomi işlemi	Bakteri inokülasyonu	BDG	Seftriakson
G1: Kontrol	-	-	-	-
G2: Splenektomi	+	-	-	-
G3: Sepsis	+	+	-	-
G4: Seftriakson	+	+	-	+
G5: BDG	+	+	+	-
G6: BDG+seftriakson	+	+	+	+
BDG: β -D-glukan.				

dozdaki BDG yine intraperitoneal olarak enjekte edildi. Tüm ilaç uygulamaları, bakteri enjeksiyonundan sonraki 2. günden itibaren tek doz olarak 3 gün uygulandı.

Deneysel analizler

Sakrifikasyondan sonra kan, akciğer ve karaciğer dokuları bakteriyel tutulum yönünden rutin mikrobiyolojik yöntemler ile incelendi. Biyokimyasal testlerde; hayvanların juguler veninden alınan serum örneklerinde IgM ve IgG serum analizleri Siemens Dade Behring cihazı ile yapıldı. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi analizi için Bradley'in belirttiği yöntem esas alındı⁸. Akciğer ve karaciğer dokusunda DNA oksidasyonu (8-OHdG/dG) analizi için dokular hazırlandıktan sonra hidroliz işlemi yapılarak HPLC (High-performance liquid chromatography) ile analiz edildi^{11,12}. Histolojik analizler için ise, tüm gruplardaki sıçanlardan alınan akciğer ve karaciğer doku örnekleri %4'lük formaldehit ile fiks edildi. Fiksasyondan sonra dehidratasyon ve şeffaflaştırma işlemleri yapıldı ve daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü; 4 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin ve eosin (H&E) ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

İstatistiksel analizler

Bu amaçla SPSS® 18.0 for Windows kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde One Way ANOVA testi uygulandı. Grup içi karşılaştırmalarda ise LSD çoklu karşılaştırma testi ($\alpha=0.05$) kullanıldı.

BULGULAR

Mikrobiyolojik Bulgular

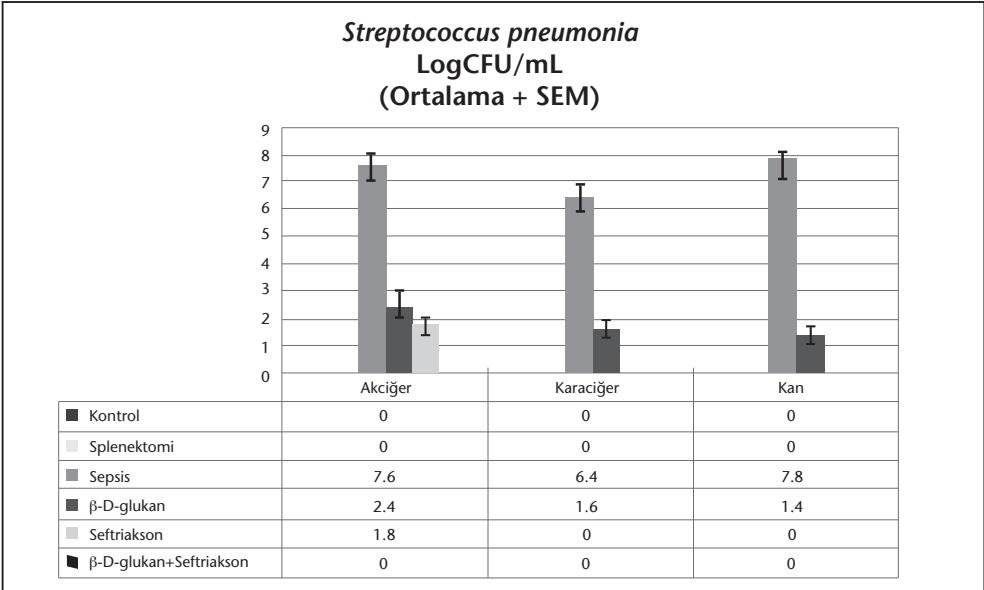
Hayvanlara *S.pneumoniae* inokülasyonundan sonra, sepsis ve tedavi gruplarındaki akciğer, karaciğer ve kan örneklerinde bakteriyel üreme miktarları Şekil 1'de gösterilmiştir. BDG grubunda sepsis grubuna göre tüm dokularda bakteri miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0.00001$). Seftriakson grubunda ise, akciğerde bakteri varlığı sepsis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış ($p<0.00001$), diğer dokularda bakteri bulunmamıştır. BDG+seftriakson grubunda, inokülasyon sonucu dokularda bakteri varlığı saptanmamıştır.

Hematolojik Bulgular

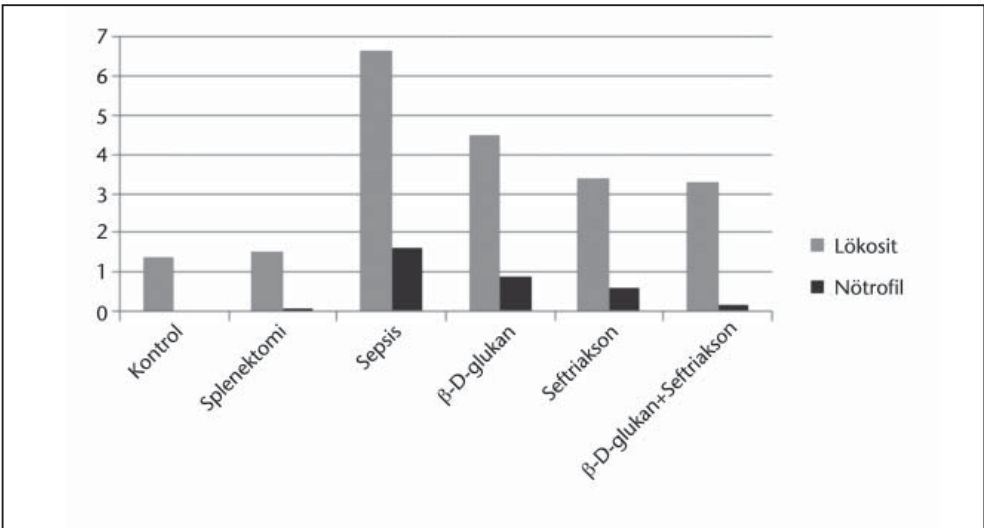
Kan örneklerinden elde edilen lökosit ve nötrofil düzeyleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Sepsis grubunda nötrofil ve buna bağlı olarak da lökosit miktarında bir artış göze çarpmaktadır. Tedavi gruplarında sepsis grubuna nazaran nötrofil düzeyleri ve buna bağlı olarak toplam lökosit düzeyleri düşük bulunmuştur. BDG+seftriakson grubunda, kontrol ve splenektomi gruplarına yakın değerler saptanmıştır.

Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplardaki hayvanların serum örneklerinde saptanan IgG düzeyleri Şekil 3'de görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre; kontrol grubu ile, splenektomi ($p<0.008$), sepsis ($p<0.005$), BDG ($p<0.003$), seftriakson ($p<0.005$) ve BDG+seftriakson ($p<0.01$) grup-

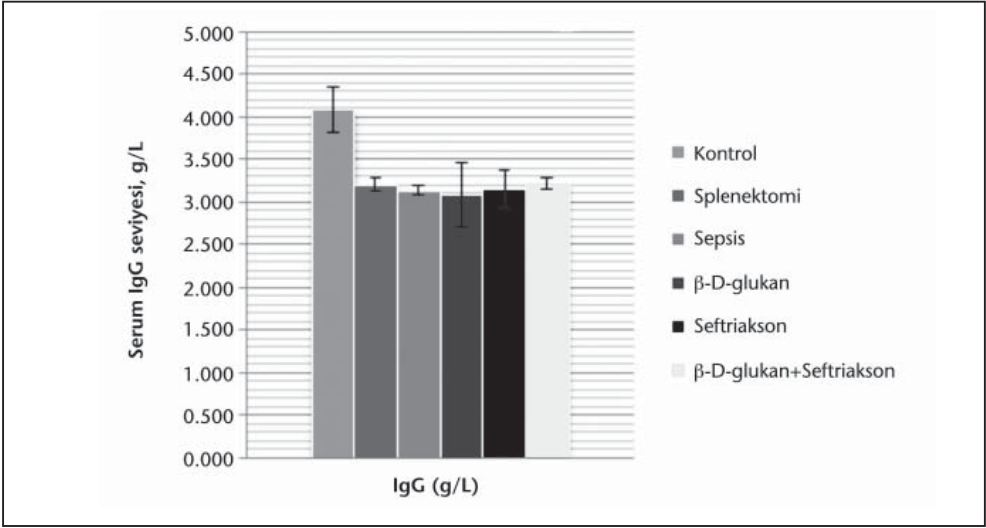


Şekil 1. Deneklerin akciğer, karaciğer ve kan örneklerine ait *S.pneumoniae* ortalama miktarları ve standart hata değerleri (SEM).

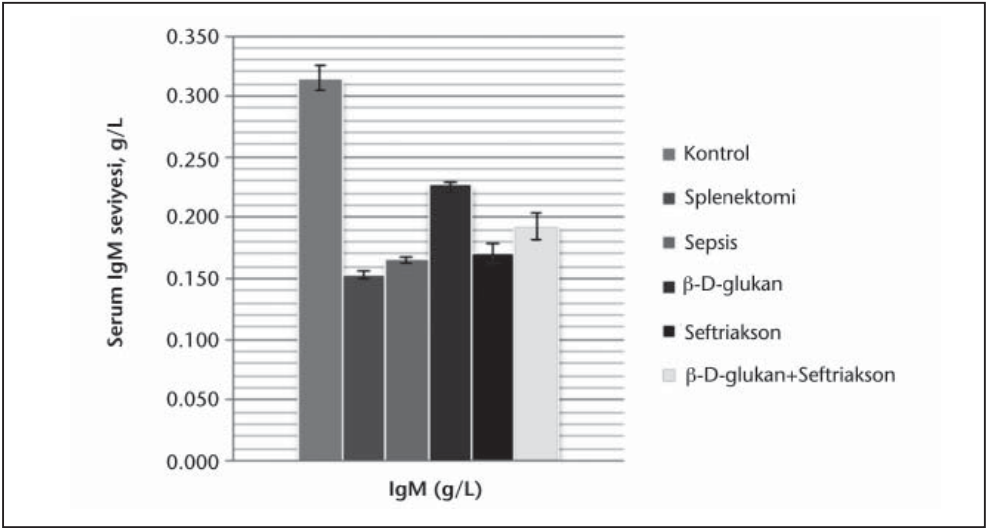


Şekil 2. Deneklerin kan lökosit ve nötrofil (10^6 /mL) ortalama değerleri.

larında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. Kontrol grubu dışındaki grupların kendi aralarında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Hayvanların serum örneklerinde saptanan IgM düzeyleri Şekil 4'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.0001$). Diğer gruplar IgM değerleri açısından karşılaştırıldığında; splenektomi ile sepsis ve seftriakson

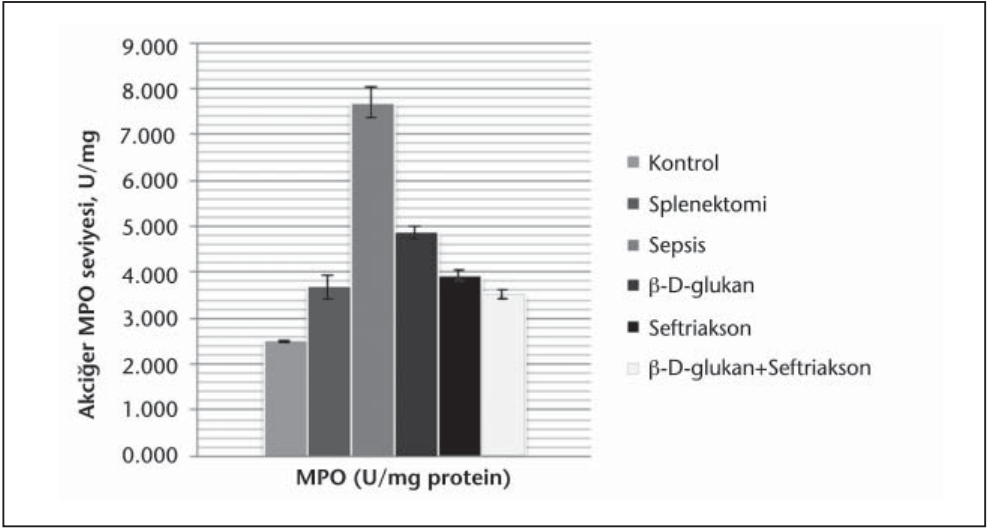


Şekil 3. Deneklerin serum IgG ortalama ve standart hata değerleri.



Şekil 4. Deneklerin serum IgM ortalama ve standart hata değerleri.

grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), splenektomi ve sepsis gruplarına göre, BDG ($p < 0.001$) ve BDG+seftriakson ($p < 0.02$) grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grupların ortalama akciğer MPO değerleri Şekil 5’de görülmektedir. Gruplar akciğer MPO değerleri açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre splenektomi ve sepsis gruplarında anlamlı artış gözlemlenirken ($p < 0.001$), sepsis grubuna göre BDG, seftriakson, BDG+seftriakson ($p < 0.001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır. Grupların ortalama akciğer DNA oksidasyonu (8-OHdG/dG) ve standart hata değerleri; kontrol: 0.363 ± 0.033 , splenektomi: 0.699 ± 0.055 , sepsis: 5.638

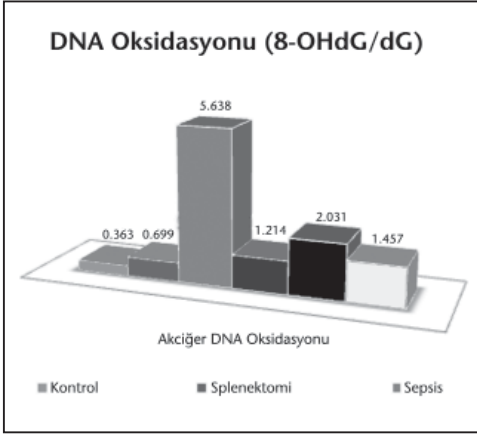


Şekil 5. Deneklerin akciğer MPO (U/mg) ortalama ve standart hata değerleri.

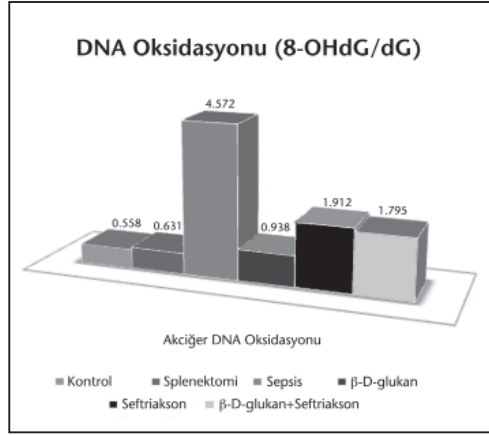
± 0.927 , BDG: 1.214 ± 0.140 , seftriakson: 2.031 ± 0.156 ve BDG+seftriakson: 1.457 ± 0.243 olarak bulunmuştur (Şekil 6). İstatistiksel değerlendirmelere göre, splenektominin kontrol grubuna göre akciğerde DNA oksidasyonu üzerine belirgin bir etkisi oluşmazken ($p > 0.05$), sepsis grubunda DNA oksidasyonunda önemli bir artış izlenmiştir ($p < 0.0001$). Sepsisin etkisiyle oluşan yüksek miktardaki DNA oksidasyonu BDG, seftriakson, BDG+seftriakson ($p < 0.0001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüktür. Hatta BDG+seftriakson grubundaki DNA oksidasyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ortalama karaciğer DNA oksidasyonu (8-OHdG/dG) değerleri ve standart hata değerleri incelendiğinde; kontrol: 0.558 ± 0.044 , splenektomi: 0.631 ± 0.025 , sepsis: 4.532 ± 1.312 , BDG: 0.938 ± 0.283 , seftriakson: 1.912 ± 0.590 ve BDG+seftriakson: 1.795 ± 0.210 olarak bulunmuştur (Şekil 7). İstatistiksel değerlendirmelere göre, splenektominin kontrol grubuna göre karaciğerde DNA oksidasyonu üzerine belirgin bir etkisi oluşmazken ($p > 0.05$), sepsis grubunda DNA oksidasyonunda önemli bir artış belirlenmiştir ($p < 0.0001$). Sepsis grubuna göre tedavi gruplarında DNA oksidasyonu açısından anlamlı bir düşüş gözlemlenmiş ($p < 0.001$); ancak tedavi gruplarının hiçbirinde kontrol grubu ile istatistiksel anlamda benzerlik saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait akciğer kesitlerinde, alveol ve bronş duvar yapısı normal olarak izlenmiştir. Splenektomi grubuna ait histolojik kesitlerde kontrol grubuna benzer şekilde bir akciğer görüntüsü vardır. Sadece bazı interalveolar bağ doku alanlarında nötrofil ve alveolar makrofaj bulgularına rastlanmasına rağmen genel olarak inflamatuvar hücreler yaygın değildir. Sepsis grubuna ait akciğerlerde alveolar duvarlarda kalınlaşma, çok sayıda apoptotik ve nekrotik tip 1 ve tip 2 alveolar hücreler, nötrofil infiltrasyonu, ciddi hemoraji ve konjesyon gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarından BDG grubunun akciğer-



Şekil 6. Deneklerin akciğer DNA oksidasyonu (8-OHdG/dG) ortalama ve standart hata değerleri.

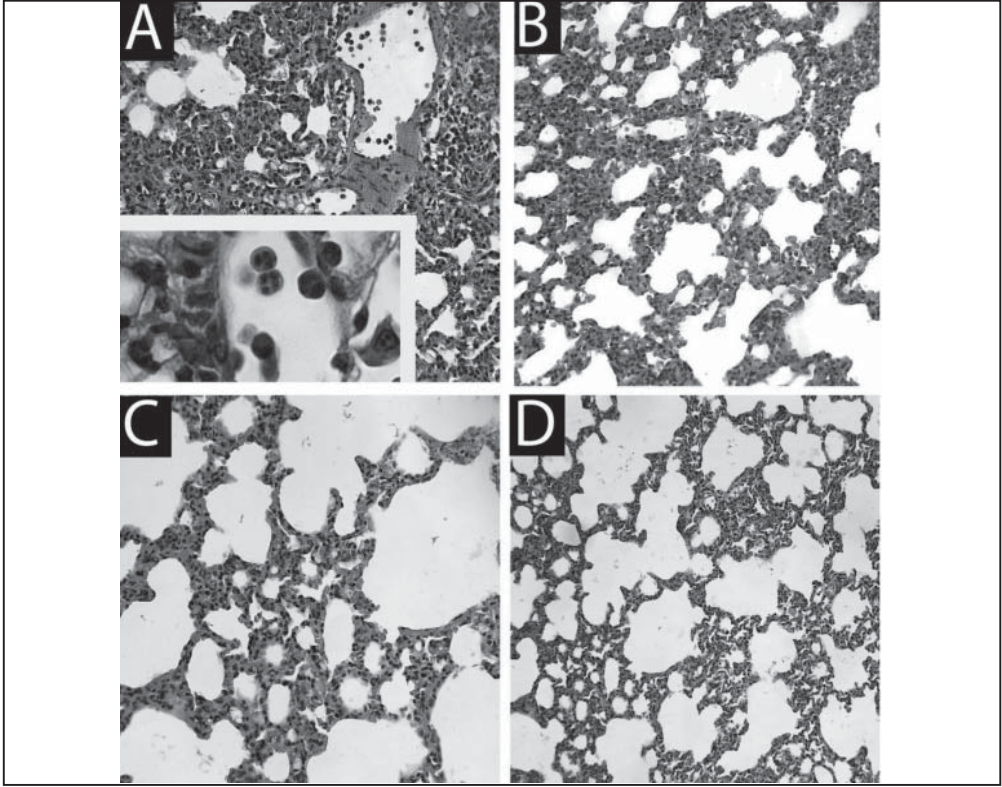


Şekil 7. Deneklerin karaciğer DNA oksidasyonu (8-OHdG/dG) ortalama ve standart hata değerleri.

lerinde, orta şiddete nötrofil infiltrasyonu ve minimal hemoraji olup alveolar hücrelerin durumu genel olarak iyidir. Seftriakson grubunda ise akciğerlerde minimal şiddette nötrofil infiltrasyonu, orta şiddette hemoraji ve bazı alveolar hücrelerde dejeneratif değişimler mevcuttur. BDG+seftriakson grubunun akciğerlerinin histolojik incelemelerinde, bazı odaksal alanlarda minimal nötrofil gözlemlenirken, alveolar duvar yapısı normaldir (Resim 1). Kontrol ve splenektomi grubuna ait karaciğer histopatolojik incelemelerinde portal alanlar, hepatosit korsonları ve sinuzoidal aralıklar normal görünümündedir. Sepsis grubuna ait karaciğerlerde, hepatositlerde nekrotik değişimler ve kordonsol dizilimlerinde bozulma, portal alanlarda polimorf ve mononükleer lökositler gözlemlenmiştir. Ayrıca parankimada çok sayıda geniş odaksal mononükleer kümeler belirlenmiştir. Tedavi gruplarından BDG grubunda hepatositler kordon şeklinde ve normal görünümüne olup, bu odaklar sepsis grubuna göre oldukça küçük ve az sayıdadır. Seftriakson grubunda hepatositlerde minimal dejenerasyon gözlemlenirken, kordonsal dizilimler normal olarak izlenmiştir. Bu grupta portal alanlarda ve parankimada hiçbir inflamatuvar hücre görülmemiştir. BDG+seftriakson grubunun karaciğer stromal ve parankimal yapısı histolojik olarak kontrol grubuna benzerdir (Resim 2).

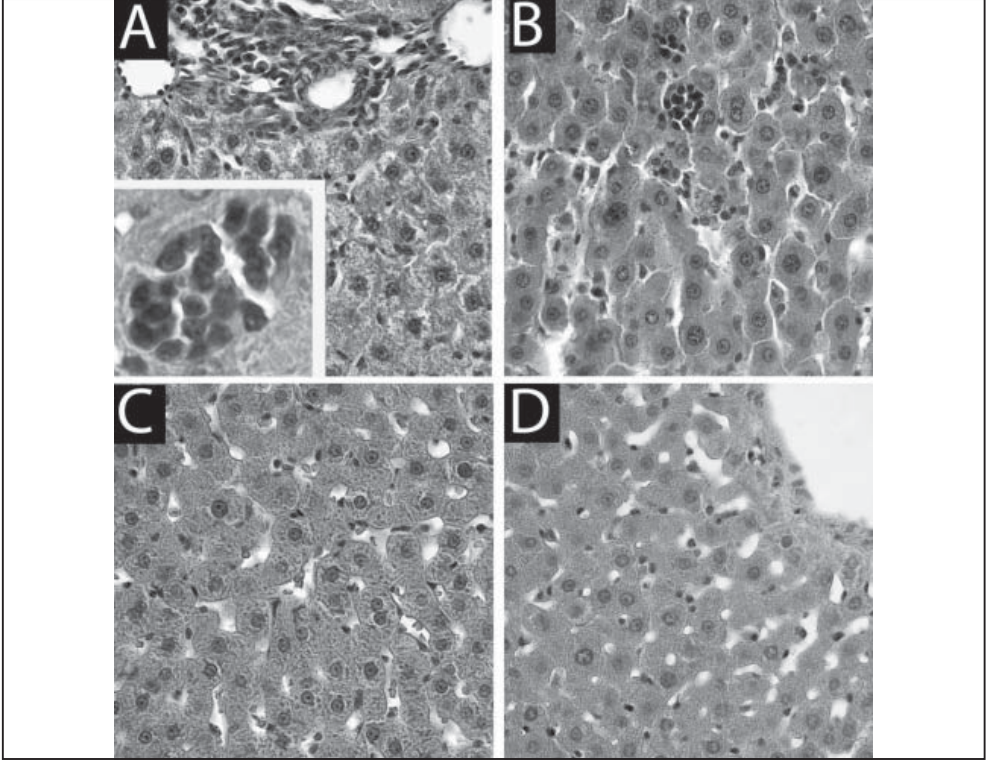
TARTIŞMA

Streptococcus pneumoniae'nin sistemik yayılımına karşı konağın korunmasında, tipe özgül antikorlar ve kompleman sistemi ile birlikte, dalak en önemli immün organ olarak rol oynamaktadır¹³. Cerrahi olarak dalağı alınan bireylerde fatal enfeksiyon gelişimi önemli bir sağlık sorunu olarak ortaya çıkabilir¹⁴. Makrofajlar, bakterileri hem direkt olarak hem de opsonizasyon ile fagosite edebilir¹⁵. Bakterilerin opsonize edilmesinde, kapsül antijenlerine karşı, dalağın beyaz pulpa marjinal zon B hücreleri tarafından sentezlenen IgM antikorlarının rolü vardır. İnsanlardaki bu durum, fare ve sıçanlarda da benzerdir^{4,14,15}. Bu çalışmada, splenektomi grubunda serum IgM düzeylerinin kontrol grubuna göre yarı yarıya düşmesi bu bilgilerle örtüşmektedir. Sepsis grubunda serum IgM düzeyleri de splenektomi grubuna benzer şekilde saptanmıştır. Bu sonuç bize, sepsis grubun-



Resim 1. (A) Sepsis, (B) β -D-glukan, (C) Seftriakson ve (D) β -D-glukan+seftriakson gruplarına ait akciğer histolojik kesitleri (H&E, 10x).

da kapsüllü bakterilere karşı T hücrelerinden bağımsız IgM'ye bağlı savunma sisteminin eksikliğini göstermekte ve buna bağlı olarak sepsis grubundaki akciğer, karaciğer ve kan-da yüksek bakteri varlığı ile örtüşmektedir. Ancak ilginç olarak, β -D-glukan (BDG) ve BDG+seftriakson gruplarında splenektomi ve sepsis grubuna göre yüksek, kontrol grubuna göre ise düşük IgM düzeyleri belirlenmiştir. Bu durum muhtemelen, BDG'in dalak dışındaki başka yapıların IgM üretimdeki etkilerine bağlanabilir. Köpeklerde yapılan çalışmalarda BDG'nin serum ve tükürükte IgM artışına yol açtığı tespit edilmiştir^{16,17}. BDG'in IgM üretimini teşvik etmesi ile ilgili mekanizmalar hakkında literatürde yeterince bilgi bulunmamaktadır. Bu bulgular, çalışmamızda gözlemlenen BDG ve BDG+seftriakson sepsis grubuna göre daha düşük bakteriyemi varlığına sahip olmasının sebebini açıklamada katkıda bulunabilir. Çalışmamızda, splenektomi grubuna göre seftriakson grubunda IgM düzeylerinde bir değişiklik saptanmamıştır. Çalışmamızda incelediğimiz diğer immüno-globulin ise IgG'dir. Kontrol grubuna göre, diğer tüm gruplarda serum IgG düzeyleri hafif bir azalma göstermiştir ki, bu düşüş splenektomiye bağlı olabilir. Sepsis ve diğer tedavi gruplarında da, splenektomi grubuna benzer serum IgG düzeyleri tespit edilmiştir. Sepsis ve splenektomi grubunda meydana gelen IgG düzeyindeki düşüşler, daha önce yapılan deneysel çalışmalardaki bulgularla da örtüşmektedir¹⁸. Sepsis ve tedavi gruplarındaki IgG düzeylerinin benzer olması, tedavi gruplarında bakteri yükündeki azalma ve temizlenme-de, IgG'nin anlamlı bir rolü olmadığını düşündürmektedir.



Resim 2. (A) Sepsis, (B) β -D-glukan, (C) Seftriakson ve (D) β -D-glukan+seftriakson gruplarına ait karaciğer histolojik kesitleri (H&E, 40x).

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz organlardan biri de sistemik *S.pneumoniae* enfeksiyonundan çok etkilenen akciğerlerdir. Bakterinin akciğere yerleşmesinde ve kolonizasyonun ilk evresinde, alveolar makrofajların rol oynadığı ve TNF- α ve IL-1 gibi proinflamatuar sitokinler sentezlediği belirlenmiştir. Bu sitokinler diğer makrofajlarda NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirerek proinflamatuar sitokin ve kemokinlerin sentezini artırır^{19,20}. Bu sitokinler akciğerde nötrofil toplanmasına ve aktif hale gelmesine sebep olur. Aktif hale gelen nötrofiller MPO aktivitesini artırır. MPO nötrofillerde hidrojen peroksit (H_2O_2) ve klorid anyonundan (Cl^-) hipoklorik asit (HOCl) oluşturur ve salgılar. Hipoklorik asit nötrofiller tarafından kullanılarak bakterileri ve diğer patojenleri öldürür²¹⁻²³. Şiddetli enfeksiyon durumunda inflammatuar sitokinlerin aşırı üretimi, parenkimal hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna ve DNA oksidasyonuna yol açar. Bundan dolayı hücreler geri döndürülemez hasara ve hücre ölümüne gider. Bu süreç dokuda alveol bütünlüğünün bozulmasına, alveol keselerinin kan ile dolmasına ve oksijenin yeterince kana geçememesine yol açar²⁴. Çalışmamızın biyokimyasal bulgularına göre, sepsis grubunda yoğun MPO aktivitesi ve DNA oksidasyonu saptanmıştır. Bu bulgular, histopatolojik incelemede izlenen akciğer ve karaciğer dokularındaki nötrofil infiltrasyonu ile de örtüşmektedir. Bu sonuçlar ayrıca, sepsis grubunda yoğun bir inflammatuar yanıt ve buna bağlı oluşan yoğun doku hasarını ifade etmektedir. Tedavi gruplarında sepsis grubuna göre hem MPO hem de DNA oksidasyonu açısından önemli bir

düşüş gözlenmiştir. BDG grubunda, diğer tedavi gruplarına göre MPO düzeyinin yüksek olması ve histolojik olarak saptanan minimal nötrofil miktarı, mikrobiyolojik analizlerde rastladığımız bakteri varlığı ile ifade edilebilir. Ancak oluşan inflamatuvar yanıt düzeyinin düşük olması ve BDG'in antioksidan özellikleri, doku hasarının bir göstergesi olan DNA oksidasyonunun diğer tedavi gruplarına benzer çıkmasına neden olmuştur. Mikrobiyolojik analizlerde, seftriakson ve BDG+seftriakson grubunun akciğerlerinde bakteri yükünün az olması, seftriaksonun *S.pneumoniae* üzerine direkt antimikrobiyal özelliğinden kaynaklanmaktadır^{25,26}. BDG grubunda bakteriyemi varlığının sepsis grubuna göre düşük olması; hem IgM'ye bağlı mekanizmalara, hem de daha önceki çalışmalarda²⁷ bulunan BDG'in lektine bağımlı ve alternatif kompleman yollarını aktive edici mekanizmalarından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda ayrıca, sepsisin karaciğere olan etkileri de araştırılmıştır. Yapılan incelemelerde, tüm tedavi gruplarının sepsisin oluşturduğu hasarı ortadan kaldırdığı, ancak DNA oksidasyonu ve hepatosit hasarının sepsis grubunda yoğun olduğu görülmüştür. Yalnızca BDG grubunda, az miktarda bakteriyemi varlığı ve buna bağlı olarak parenkimada mononükleer hücre odakları gözlemlenmiştir. Bu bulgulardan, BDG'in karaciğerde *S.pneumoniae* üzerine mononükleer hücreler vasıtasıyla yanıt oluşturduğu anlaşılmaktadır. Hematolojik bulgularımız incelendiğinde de, yine benzer şekilde MPO ve dokulardaki DNA hasarlarındaki artışla uyumlu olarak, sepsis ve çalışma gruplarında nötrofil sayılarında artış gözlenmiştir.

Sonuç olarak, *S.pneumoniae*'nin özellikle splenektomili olgularda neden olduğu organ hasarı ile giden sepsis tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirmesinin, tedavi ve korunmada yeni yöntemleri gündeme getireceği düşünülmüştür. Çalışmamızın sonuçlarına göre; hem antioksidan hem de immünomodülatör özelliklere sahip olan β -D-glukanın, antibiyotik kombinasyonlarında ciddi organ hasarlarına bağlı organ yetmezliklerinin azaltılmasına katkıda bulunacağı kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan pnömokok suşu Omega Araştırma Organizasyon Eğitim Danışmanlık Ltd. Şti. tarafından desteklenen proje kapsamında, 13 nolu merkez olarak katıldığımız "Türkiye'de Çocuklarda İnvazif Hastalıklara Sebep Olan *Streptococcus pneumoniae*'nin serotip dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılığı: Çok Merkezli Laboratuvar Çalışması" başlıklı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Ceyhan'ın koordinatörlüğünde yürütülen çalışma kapsamında tiplendirilen ve kendi hastanemizde izole edilen suş olup emeği geçenlere teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Altamura M, Caradonna L, Amati L, Pellegrino NM, Urgesi G, Miniello S. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. Immunopharmacol Immunotoxicol 2001; 23(2): 153-61.
2. Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. Clin Infect Dis 1992; 15(1): 77-83.

3. Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, Shinomiya N, Seki S. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy helps prevent a *Listeria* infection. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(1): 11-21.
4. Wardemann H, Boehm T, Dear N, Carsetti R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* 2002; 195(6): 771-80.
5. Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, et al. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol* 2003; 170(6): 3273-8.
6. Barroso DE, Godoy D, Castiñeiras TM, Tulenko MM, Rebelo MC, Harrison LH. β -lactam resistance, serotype distribution, and genotypes of meningitis-causing *Streptococcus pneumoniae*, Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31(1): 30-6.
7. Karaduman D, Eren B, Keles ON. The protective effect of beta-1,3-D-glucan on taxol-induced hepatotoxicity: a histopathological and stereological study. *Drug Chem Toxicol* 2010; 33(1): 8-16.
8. Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 1982; 60(3): 618-22.
9. Romay C, Ledón N, González R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res* 1998; 47(8): 334-8.
10. Chan C, Yin H, Garforth J, et al. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *J Med Chem* 1998; 41(2): 48-56.
11. Shigenaga MK, Aboujaoude EN, Chen Q, Ames BN. Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 1994; 234: 16-33.
12. Mosca F, Fattorini D, Bompadre S, Littarru GP. Assay of coenzyme Q(10) in plasma by a single dilution step. *Anal Biochem* 2002; 305(1): 49-54.
13. Tünger Ö. Pnömonok enfeksiyonları ve korunma. *ANKEM Derg* 2006; 20(2): 125-32.
14. Waghorn D. Overwhelming infection in asplenic patients: current best practice preventive measures are not being followed. *J Clin Pathol* 2001; 54(3): 214-8.
15. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 606-16.
16. Stuyven E, Verdonck F, Van Hoek I, et al. Oral administration of β -1,3/1,6-galactan to dogs temporally changes total and antigen-specific IgA and IgM. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(2): 281-5.
17. Feder HM Jr, Pearson HA. Assessment of splenic function in familial asplenia. *N Engl J Med* 1999; 341(3): 210-2.
18. Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, Habu Y, Shinomiya N, Seki S. Interleukin-18 protects splenectomized mice from lethal *Streptococcus pneumoniae* sepsis independent of interferon- γ by inducing IgM production. *J Infect Dis* 2006; 194(7): 993-1002.
19. Pittet L, Quinton L, Yamamoto K, et al. Earliest innate immune responses require macrophage RelA during pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45(3): 573-81.
20. Fong CH, Bebiën M, Didierlaurent A, et al. An antiinflammatory role for IKK β through the inhibition of "classical" macrophage activation. *J Exp Med* 2008; 205(6): 1269-76.
21. Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF- κ B activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2005; 175(11): 7530-5.
22. Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest* 1993; 91(6): 2866-72.
23. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, et al. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis* 2000; 182(4): 1276-9.
24. Albrecht C, Knaapen AM, Becker A, et al. The crucial role of particle surface reactivity in respirable quartz-induced reactive oxygen/nitrogen species formation and APE/Ref-1 induction in rat lung. *Respir Res* 2005; 6: 129.

25. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*, pp: 2128-42. In: Mandell L, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
26. Rosón B, Carratalà J, Tubau F, et al. Usefulness of betalactam therapy for community-acquired pneumonia in the era of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a randomized study of amoxicillin-clavulanate and ceftriaxone. *Microb Drug Resist* 2001; 7(1):85-96.
27. Hetland G, Ohno N, Aaberge IS, Lovik M. Protective effect of beta-glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27(2): 111-6.