

BAKTERİYEL SEPSİSİN NÖTROFİL FONKSİYONLARINA ETKİSİ

Işıl FİDAN *, Murat DİZBAY **, Berna ERDAL *, Emine YEŞİLYURT *, Feryal ÇETİN GÜRELİK *

*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Sepsis, yoğun bakım ünitelerinde mortalitenin en önemli nedenlerindedir. Nötrofiller, bakteriyel ajanlara karşı doğal immün savunmada önemlidir ve sepsis patogenezinde rol oynayan hücrelerdir. Bu çalışmada sepsisli hastalarda nötrofil fonksiyonlarında gözlenen değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla sepsis tanısı almış 10 hastaya ait nötrofillerin fagositik aktivitesi ve oksidatif patlama kapasiteleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrollere ait nötrofil örnekleri ile kıyaslanmıştır. Fagositik aktivite ve oksidatif patlama kapasiteleri flow sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. Fagositik aktivite, sepsisli hastalarda sağlıklı kontrollere göre azalmış olarak tespit edilirken, nötrofillerde oksidatif patlama kapasitesi sepsisli hastalarda artmış olarak bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre, sepsisli hastalarda nötrofil fonksiyonlarında bir bozulma olmaktadır ve bu durumun sepsisli hastalarda prognozu ve tedaviyi etkileyebileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: bakteri, nötrofil fonksiyonu, sepsis

SUMMARY

The Effects of Bacterial Sepsis on Neutrophil Functions

Sepsis is one of the leading causes of mortality in intensive care unit. Neutrophils play an important role in the innate immun defense against bacterial agents and sepsis pathogenesis. The aim of this study was to evaluate the changes of neutrophil functions in patients with sepsis. Therefore, we evaluated neutrophil phagocytic activity and oxidative burst capacity in 10 patients with sepsis and compared the results with those of healthy control group. Phagocytic activity and oxidative burst capacity were assessed by flow cytometry. Neutrophil phagocytic activity was decreased in patients with sepsis compared to control groups. Whereas oxidative burst capacity was increased in patients with sepsis. These results indicate that there is an impairment in neutrophil function in patients with sepsis and it is considered that this condition may affect the prognosis and treatment of patients with sepsis.

Keywords: bacteria, neutrophil function, sepsis

GİRİŞ

Sepsis, enfeksiyona sistemik inflamatuvar yanıt bulgularının eşlik etmesi, ağır sepsis ise organ yetmezliği veya fonksiyon bozukluğu veya kaybı ile seyreden sepsis tablosu olarak tanımlanmaktadır^(6,11). Yoğun bakım ünitelerinde bakım ve antimikrobiyal tedavi seçeneklerinin artmış olmasına rağmen, sepsis hâlâ önemli bir mortalite nedenidir^(12,13).

Nötrofiller, bakteriyel enfeksiyonlara karşı gelişen akut inflamatuvar yanıtta aracılık eden

en önemli hücre tipidir ve bakterinin alımı, öldürülmesi ve yok edilmesinden sorumludur⁽¹⁾. Bu fonksiyonlarını fagositoz ve oksidatif patlama sırasında reaktif oksijen ürünlerinin oluşturulması aracılığıyla gerçekleştirirler⁽⁸⁾. Nötrofillerin esas fonksiyonları fagositoz olmasına rağmen, oksidatif patlama da bakterisidal aktivite ile ilişkilidir. Bu hücrelerin sayıları normal bile olsa fonksiyonlarında görülen bozukluk, enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artmasına ve ciddi enfeksiyonların gelişmesine neden olur^(4,12,14). Ayrıca, nötrofil fonksiyonlarında oluşan gene-

Yazışma adresi: Işıl Fidan. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06500 Beşevler-ANKARA

Tel: (0312) 202 46 26 GSM: (0532) 685 67 33

e-posta: isilfidan@yahoo.com

Alındığı tarih: 18.01.2007, revizyon kabulü: 08.05.2007

tik ve edinsel bozukluğun nozokomiyal infeksiyonların gelişimine zemin hazırladığı düşünülmektedir⁽¹⁵⁾.

Nötrofiller ve ürünleri sepsis patogenezinde önemli rol oynarlar⁽¹⁶⁾. Nötropenin infeksiyonlara ve sepsise duyarlılığı arttırdığı ve nötrofil fonksiyonlarında yapılacak iyileştirmelerin sepsisli hastaların tedavilerinde yarar sağlayacağı düşünülmektedir. Nötrofiller mikroorganizmalarla aktive edildiğinde proinflamatuvar sitokin üretimi, granüler enzimlerin salınımı, nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna neden olurlar. Nötrofiller sepsis sırasında aktive olup sayıca artıp antimikrobiyal etki oluştururken, bir yandan da oluşturdukları reaktif oksijen ürünleri ve NO aracılığıyla konakta doku hasarına neden olabilirler^(3,7). Nötrofillerin sepsiste yararlı ve zararlı etkileri vardır. Çalışmalarda, sepsisin başlangıç dönemlerinde bakteriyemiye baskıladığı ve organ fonksiyonlarının korunması için nötrofillerin gerekli olduğu, ancak sepsisin daha sonraki dönemlerinde nötrofil fonksiyonları sonucu oluşan ürünlerin, organlar için zararlı etkiler oluşturduğu bildirilmiştir⁽⁷⁾. Bu ikili etkinin varlığı, sepsis sırasında uygulanacak olan tedavi yaklaşımlarının nötrofil fonksiyonlarına olan etkilerinin iyi bilinmesi gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle, sepsis sırasında nötrofil fonksiyonlarında oluşan değişikliklerin tam olarak saptanması gerekmektedir.

Çalışmamızda nötrofillerin sepsiste oynadığı rolün tam olarak tespit edilebilmesi için, nötrofil fonksiyonlarında sepsis sırasında oluşan değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle, Gram negatif sepsis tanısı konulan hastalardan izole edilen nötrofillerin fonksiyonları incelenmiş ve elde edilen veriler sağlıklı kişilerin nötrofil fonksiyonlarından elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta grubu: Çalışmamızda CDC⁽⁵⁾ ve 2001 uzlaşısı toplantısı⁽¹⁰⁾ kriterlerine göre sepsis tanısı konulan 10 hastaya ait heparinli kan örnekleri kullanılmıştır. Altta yatan kronik bir

hastalığı, anestezi, cerrahi stres gibi faktörler bulunmayan, ilaç uygulanmamış, nötrofil sayıları normal değerlerde olan hastalar çalışma kapsamına alınmıştır. Kontrol grubu olarak sağlıklı 10 gönüllüye ait periferik kan örneği kullanılmış ve kanlar alındıktan sonra bekletilmeden çalışmaya geçilmiştir. Hasta ve kontrol grubu 20-55 yaş grubu olarak belirlenmiştir.

Fagositik aktivite: Nötrofillerin fagositik aktivitesi flow sitometri (FC 500, Coulter, İngiltere) yöntemi ile ölçülmüştür. Heparinize tam kan örnekleri iki ayrı tüpe konduktan sonra, 1:1 oranında Ficoll (Sigma, ABD) ile karıştırılıp, 45 dk. oda ısısında bekletilmiştir. Lökositlerin bulunduğu üst tabaka alınarak trypan blue (Sigma, ABD) boyası ile lökosit canlılığı % 98 olarak belirlenmiştir. Lökositler 2 ayrı tüpe konularak kontrol ve test tüpleri hazırlanmıştır. Lökositlerin bulunduğu test ve kontrol tüplerine fosfat tamponlu tuzlu su (PBS, Gibco, Almanya) ve dihydrohodamine-123 (Biochemika, ABD) eklenip, tüpler 5 dk. 37°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra test tüpüne *Escherichia coli* (5×10^9 *E.coli*/ml), kontrol tüpüne PBS eklenmiş, 0. dk.'da flow sitometri cihazında granülosit kapısı alınarak FL1'deki ortalama floresan kanal sayısında oluşan değişiklikler değerlendirilmiştir. Örnekler tekrar su banyosuna kaldırılıp 20 dk. sonra flow sitometri cihazında yeniden FL1'deki ortalama floresan kanal sayısında oluşan değişiklikler incelenmiş ve 0. dk.'da elde edilen değerlere bölünerek fagositik aktivite değerlendirilmiştir⁽⁶⁾.

Oksidatif patlama: Oksidatif patlama kapasitesi de flow sitometri yöntemi ile ölçülmüştür. Heparinize tam kan örnekleri iki ayrı tüpe alınmış, PBS ile dilüe edildikten sonra dihydrohodamine123 eklenmiş ve tüplerden biri uyarılmamış kontrol tüpü olarak, biri de uyarılmış test tüpü olarak kullanılmıştır. Tüpler 15 dk. 37°C'de su banyosunda bekletildikten sonra test tüpüne phorbolmyristate acetate (PMA, Biochemika, ABD) eklenmiştir. Kontrol ve test tüpleri tekrar 15 dk. 37°C'de su banyosunda inkübe edildikten sonra tüpler 400xg'de 5 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve flow sito-

metri cihazında granülosit kapısı alınarak oksidatif indeks hesaplanmıştır⁽⁸⁾:

Oksidatif indeks: Test tüpündeki hücrelerin ortalama floresan kanal sayısı/kontrol tüpündeki hücrelerin ortalama floresan kanal sayısı.

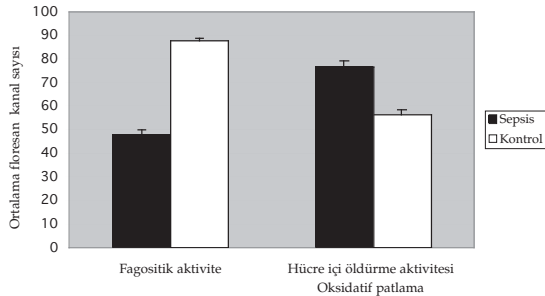
İstatistiksel analiz: Sonuçların analiz edilmesinde MannWhitney U testi ve Wilcoxon Signed Ranks kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Mikroorganizmalar: BACT/ALERT 3D (bioMerieux, ABD) otomatize kan kültür sistemi ile sepsis tanısı konulan 10 hastanın üçünden metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), beşinden *Acinetobacter baumannii*, ikisinden *Klebsiella* spp. izole edilmiştir.

Fagositik aktivite: *E.coli* ile uyarılan sepsisli hasta nötrofillerinin fagositik aktivitesinin sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$). Gram negatif ve Gram pozitif bakteri ile infekte hasta gruplarının nötrofillerinin fagositik aktivitesi arasında bir fark görülmemiştir ($p = 0.304$).

Oksidatif patlama: Oksidatif patlama sırasında oluşan reaktif oksijen ürünlerinin üretiminin PMA ile stimülasyonu sonrası, sağlıklı kontrollere göre sepsisli hasta nötrofillerinin oksidatif patlama kapasitelerinin istatistiksel ola-



Şekil: Sepsis ve kontrol grubu nötrofillerinin fagositoz ve oksidatif patlama sonuçlarının karşılaştırılması (ortalama \pm ortalamanın standart hatası).

rak anlamlı düzeyde bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu artışın sepsiste izole edilen bakteri türünden bağımsız olduğu ve Gram negatif veya Gram pozitif bakteriyel sepsislerinin her iki grubunda da oksidatif patlamanın arttığı, iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmediği tespit edilmiştir ($p = 0.425$) (Şekil).

TARTIŞMA

Nötrofiller, doğal bağışıklığın önemli hücresel efektörleridir. Nötrofillerin antimikrobiyal etkinliklerinde; oksijenin, reaktif oksijen ürünlerine dönüştüğü oksijene bağımlı mekanizmalar önemli yer tutmaktadır⁽¹¹⁾. Bu hücrelerin sayı veya fonksiyonlarında oluşacak bozuklukların infeksiyon hastalıklarına yatkınlığı arttırdığı ve yayılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir⁽¹²⁾. Ayrıca nötrofillerin hücre içi öldürme aktivitesindeki bozukluklar veya yetersizlikler özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan immün sistemi baskılanmış ve sepsis tanısı konulmuş hastalarda mortaliteyi arttırmaktadır.

Sepsisli hastalarda nötrofil fonksiyonlarında görülen değişiklikleri belirlemek için yaptığımız çalışmada, sepsisli hasta nötrofillerinin fagositik aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.05$). Martins ve ark.⁽¹²⁾ *S.aureus* ile yaptıkları fagositik aktivite deneyinde sepsisli hasta nötrofillerinde fagositik aktivitenin arttığını, Wenisch ve ark.⁽¹⁸⁾ ise *E.coli*'nin kullanıldığı durumda nötrofillerin fagositik aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Wenisch ve ark.⁽¹⁷⁾ flow sitometri yöntemi ile septik şok tablosu bulunan hasta nötrofillerinin fagositik aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Barrio ve ark.⁽²⁾ özellikle slime üreten *S.aureus* suşlarının üretmeyen suşlara göre nötrofillerin fagositik aktivitesini azalttığını saptamışlardır.

Oksidatif patlama, nötrofillerin bakteriyel infeksiyonları kontrol etmede kullandığı en önemli savunma mekanizmasıdır. Çalışmamızda sepsisli hasta nötrofillerinin oksidatif patlama kapasitesinde artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Sepsisli hasta grubu nötrofillerinde oksidatif patlama sırasında oluşan reaktif oksijen ürünle-

rinin sağlıklı kontrollerin nötrofillerine göre artışı, sepsis sırasında nötrofillerde bir aktivasyon olabileceğini düşündürmüştür. Ancak önemli bir savunma mekanizması olan reaktif oksijen ürünlerinin artmış olması, sepsisli hasta nötrofillerinde hücre içi öldürme aktivitesini olumlu yönde etkilerken, bu etkinin yüksek dozda olması durumunda doku hasarı oluşturarak hastada yarar dışında zararlı etki de oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu durum çeşitli çalışmalarda da bildirilmiştir⁽¹²⁾. Hoesel ve ark.⁽⁷⁾ nötrofillerin sepsisin başlangıç dönemlerinde bakteriyemi seviyelerini düzenlemede önemli olduğunu, ancak daha sonraki dönemde nötrofillerin reaktif oksijen türevlerinin doku ve organ harabiyetine neden olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı grup, sepsiste nötrofillerin zararlı ve koruyucu rollerinin olabileceğini saptamışlardır. Trautinger ve ark.⁽¹⁶⁾ sepsis gelişen hastalarda sağlıklı gruba göre oksidatif patlama kapasitesinde bir artış görüldüğünü ve bu aktive olmuş nötrofillerin sepsis sendromu patogenezinde önemli rol oynayabileceğini bildirmişlerdir.

Martins ve ark.⁽¹²⁾ sepsisli hastaların nötrofillerinin fagositik aktivite ve reaktif oksijen ürün oluşumunda ve nötrofillerin erken apoptozisinde artış görüldüğünü saptamışlardır. Bu durumun inflamatuvar cevabın regülasyon mekanizmalarına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Muller Kobold ve ark.⁽¹³⁾ sepsiste nötrofil ve monositlerin aktive olduğunu ve aktivasyon markırlarındaki düşüklüğünün sepsisin kötü prognozu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Kaufmann ve ark.⁽⁹⁾ sepsisin kötü seyrettiği hastalarda nötrofil fonksiyon bozukluklarına bağlı sendromların geliştiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak; çalışmamızda rutin flow sitometri yöntemi ile sepsisli hastaların nötrofil fonksiyonları belirlenmiştir. Sepsisli hasta nötrofillerinin fagositik fonksiyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ve hücre içi öldürme aktivitesinde de anlamlı bir artış saptanmıştır.

Sepsisli hastaların nötrofillerinden serbest oksijen ürünlerinin aşırı artışı hastalığın prognozunu daha da olumsuz yönde etkileyebilir. Bunun sonucunda hastalarda ağır doku ve organ hasarı artabilir. Bu nedenle sepsisli hastaların nötrofil fonksiyonlarının tedavi sırasında iz-

lenmesi önem kazanmaktadır. Nötrofillerde aşırı oksijen türevlerinin oluşumunu engelleyen yeni tedavi seçenekleri uygulanması ile bu hastaların tedavilerinden daha olumlu sonuçlar alınabileceği düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Abbas AK, Lichtman AH: Innate immunology, "Malley J (ed): Cellular and Molecular Immunology, 5. baskı" kitabında s. 275-97, Elsevier Science, Philadelphia (2003).
2. Barrio B, Vangroenweghe F, Dosogne H, Burvich C: Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slimeproducing Staphylococcus aureus strain, Vet Res 2000;31(6):603-9.
3. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF: Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis, Lancet 2006;368(9530):157-69.
4. Dziarski R, Platt KA, Gelius E, Steiner H, Gupta D: Defect in neutrophil killing and increased susceptibility to infection with nonpathogenic gram-positive bacteria in peptidoglycan recognition protein S (PGRPS) deficient mice, Blood 2003;102(2):689-97.
5. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM: CDC definitions for nosocomial infections, Am J Infect Control 1988;16(3):128-40.
6. Gazioğlu SB: Flow sitometri ile fagosit fonksiyonları, "Deniz G, Yılmaz MT, Yıllar G (editörler): Flow Sitometri ve Tıpta Kullanımı" kitabında s.79-85, İstanbul Üniversitesi DETAE yayını, İstanbul (2004).
7. Hoesel LM, Neff TA, Neff SB et al: Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis, Shock 2005;24(1):40-7.
8. Fiorenza G, Bottasso OA, Rateni L, Farroni MA, Dlugovitzky D: Impaired neutrophil function in patients with pulmonary tuberculosis and its normalization in those undergoing specific treatment, except the HIV coinfecting cases, FEMS Immunol Med Microbiol 2003;35(2):159-64.
9. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F et al: Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity, Shock 2006;26(3):254-61.
10. Levy MM, Fink MP, Marshall JC: 2001 SCC/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, Crit Care Med 2003;31(4):1250-6.
11. Marshall JC: Neutrophils in the pathogenesis of

- sepsis, *Crit Care Med* 2005;33(12 Suppl):S502-5.
12. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R: Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock, *Shock* 2003;20(3):208-12.
 13. Mueller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG et al: Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality, *Intensive Care Med* 2000;26(7):883-92.
 14. Roitt I, Brostoff J, Male D: Cells involved in the immune response, "Cook L (ed): Immunology, 4.baskı" kitabında s. 2.12.18, Mosby Co., London (1996).
 15. Stephan F, Yang K, Tankovic J et al: Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients, *Crit Care Med* 2002;30(2):315-22.
 16. Trautinger F, Hammerle AF, Pöschl G, Micksche M: Respiratory burst capability of polymorphonuclear neutrophils and TNF-alpha serum levels in relationship to the development of septic syndrome in critically ill patients, *J Leuko Biol* 1991;49(5):449-54.
 17. Wenisch C, Fladerer P, Patruta S, Krause R, Hörl W: Assessment of neutrophil function in patients with septic shock: Comparison of methods, *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(1):178-80.
 18. Wenisch C, Parschalk B, Patruta S, Brustbauer R, Graninger W: Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia, *Infection* 1999;27(3):183-6.