

Deneysel Sepsis ve Nötropenik Sepsisli Sıçanlarda rG-CSF, İVİG, rG-CSF+İVİG Sağaltımının Kemik İliği ve Dalakta Oluşturduğu Histopatolojik Değişiklikler ve Mortalite Oranlarına Etkisi

The Effect of rG-CSF, IVIG and rG-CSF+IVIG Therapy on the Mortality Rate and Histopathological Changes of the Bone Marrow and Spleen in Eksperimental Sepsis and Neutropenia Plus Sepsis Rat Groups

Ruhiye Cevit¹ Ömer Cevit² Ö. Fahrettin Göze¹ Esin Yıldız¹ Mehmet Şencan³

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas

¹Patoloji Anabilim Dalı

²Pediyatri Anabilim Dalı

³İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Özet: Bu çalışma E. coli sepsisi geliştirilen 2 aylık dişi sıçanlarda Koloni stimüle eden faktör (rG-CSF), İmmun globulin G (İVİG) ve rG-CSF+İVİG sağaltımının mortalite oranına etkisini, kemik iliği ve dalakta oluşturdukları değişiklikleri saptamak amacıyla yapıldı. Çalışmaya alınan sıçanlar sepsis oluşturulan (A kümesi), sepsis öncesi siklofosfamid verilerek nötropeni oluşturulan (B kümesi) ve yalnız sağaltım uygulanan (C kümesi) olmak üzere üç kümeye ayrıldı. Yedi günlük gözlem süresinde en düşük mortalite oranı A ve B kümelerinde rG-CSF+İVİG verilenlerde saptandı. Ancak bu oran yalnız B kümesinde istatistiksel olarak anlamlı idi. Bu durum rG-CSF'nin nötrofil sayı ve fonksiyonunda iyileşmeye yol

Summary: This study was done to prove the effects of the Colony stimulating factor (rG-CSF), Immune globulin G (IVIG) and rG-CSF+IVIG cure on the rate of mortality and on the bone marrow and spleen in the two-month female rats which were developed sepsis by E. coli. Rats were divided into the three treatment groups; group A, the rats developed sepsis; group B, the rats developed sepsis and neutropenia by administration of cyclophosphamid before inducing sepsis; group C, the rats given therapy only. During the seven day observation period, the least mortality rate was established in rats given rG-CSF+IVIG in either group A and B. But the differences was statistically significant in only group B. It

açarak mortaliteyi azalttığını düşündürdü. Kemik ilikleri A ve C kümesinde rG-CSF ve rG-CSF+İVİG sağaltımı verilen sıçanlarda hiperselüler, B kümesi sıçanlarda hiposelüler idi. Ayrıca myeloid/eritroid (M/E) ve immatür myeloid/matür myeloid hücre (İM/MM) oranları kontrole göre yüksek idi. Bu bulgu, rG-CSF'nin immatür myeloid hücre sayısını artırdığını, İVİG'in tek başına herhangi bir etkisinin olmadığını düşündürdü. Nekroz ve myelofibrosis hiçbirinde gözlenmedi. Tüm kümelerde rG-CSF, rG-CSF+İVİG sağaltımı verilen sıçanların dalaklarının kontrollere göre makroskopik olarak daha büyük olduğu gözlemlendi. Bu büyümenin artmış ekstramedüller hematopoeze bağlı olabileceği düşünülürdü. A, B ve C kümelerinde rG-CSF ve rG-CSF+İVİG sağaltımı verilen sıçanların dalaklarında kordonlarda ve venöz sinüslerde belirgin ekstramedüller hematopoez saptandı. A ve B kümesi sıçanların dalaklarının mikroskopik incelemesinde soluk eozinofilik boyanan selüler debriler gözlemlendi. Sonuç olarak, rG-CSF ve rG-CSF+İVİG sağaltımı nötropenik sepsiste mortalite oranını azaltmakta ve sağaltım süresini kısaltabilmektedir. Ayrıca kemik iliği M/E ve İM/MM oranlarında belirgin artışa neden olmaktadır. Sepsisli ve nötropenik sepsisli sıçanların dalaklarında artmış ekstramedüller hematopoezis sonucu makroskopik büyüme saptanmaktadır. Bütün bu sonuçlara karşın, klinikte yetişkin insanlarda sepsis sağaltımında rG-CSF'nin tek başına yada İVİG ile kombine kullanımının uygunluğunun belirlenebilmesi için daha çok hayvan deneyleri gereklidir.

Anahtar Sözcükler: E. coli, sepsis, sıçan, rG-CSF, İVİG histopatoloji.

Sepsise en sık neden olan mikroorganizmalar Gram negatif bakterilerdir (1-5). Bunlar arasında ise en sık etken E. coli'dir (1,2,6). Gram negatif sepsislerde çeşitli antimikrobiyal sağaltım yöntemlerinin yaygın olarak kullanılmasına karşın, mortalite oranı çok yüksektir (%40-60). Bu nedenle son yıllarda yeni sağaltım yöntemleri denenmeye ve kullanılmaya başlanmıştır (7).

Kemoterapi uygulanan hastalarda nötropeni ve buna bağlı olarak enfeksiyon riski belirgin ölçüde artmaktadır. Bu nedenle klinikte özellikle nötropenik hastalarda nötrofili oluşturmak ve böylece enfeksiyon riskini azaltmak amacıyla kullanılan rekombinant granülosit koloni stimü-

can be speculated that rG-CSF decreased mortality rate by improving neutrophil count and function. The bone marrow of the group A and C rats given therapy with rG-CSF and rG-CSF+IVIG were hypercellular. But the bone marrows of the group B rats were hypocellular. In addition, the rates myeloid/erytroid (M/E) and immature/mature myeloid cell (IM/MM) were higher group A and C than their control groups. These findings indicate that therapy with rG-CSF increased the immature myeloid precursors and therapy with IVIG alone has no effect on these cells. Necrosis and myelofibrosis have not been observed in any treatment group. It was observed that the spleens of rats having treatment of rG-CSF and rG-CSF+IVIG are bigger macroscopically than those of in their own control group. This changes might be caused by extramedullary hematopoiesis. Specific extramedullary hematopoiesis was proved microscopically in cords and venous sinuses of spleens of the rats having rG-CSF and rG-CSF+IVIG treatment in A, B and C groups. When the spleens of the rats in group A and B were analyzed microscopically, pale eosinophilic stained cellular debris were observed. Based upon these results, therapy with rG-CSF and rG-CSF+IVIG in neutropenic cases may reduce mortality rate and shorten treatment period. In addition, therapy with rG-CSF increased significantly the ratios of M/E and IM/MM and mass of the spleen by extramedullary hematopoiesis. However, further study is needed to clarify the continued efficacy and safety of this new therapy.

Key Words: E. coli, sepsis, rat, rG-CSF, IVIG factors histopathology.

le eden faktör (rG-CSF) hematopoezi özellikle granülopoezi artırmaktadır. Son zamanlarda rG-CSF'nin özellikle nötropenik sepsisli olgularda antibiyotiklerle kombine olarak profilaktik ve terapötik amaçla kullanılabilirliği bildirilmektedir (8-14). Yenidoğan sepsisinde intravenöz IgG (İVİG) ile rG-CSF kombine kullanımının daha çok yarar sağladığı yolunda görüş ve gözlemler vardır. Ancak erişkinlerde böyle bir kullanım bildirilmemektedir (15,16).

Bu çalışma immünosüpresyon oluşturarak ya da oluşturulmaksızın deneysel E. coli sepsisi geliştirilen 2 küme sıçanda ülkemiz koşullarında sağlanması ve kullanımı daha kolay olan klinikte çeşitli hastalıklarda, özellikle

proflaktik olarak çok kullanılan İVİG'in, rG-CSF ile kombinasyonu halinde, rG-CSF etkilerini, özellikle kemik iliğinde, daha az oranda da dalak üzerinde göstermesi nedeniyle, kemik iliği ve dalakta oluşturduğu histopatolojik değişiklikleri araştırmak amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında yetiştirilen, ağırlıkları 100-150 gr arasında değişen, albino tipi, 120 adet, 1.5-2 aylık dişi sıçanlar kullanıldı.

Sıçanlar E. coli ATCC 25922 no'lu suşu ile deneysel enfeksiyon oluşturulan (A kümesi), nötropenik ajan verildikten sonra deneysel enfeksiyon oluşturulan (B kümesi) ve hiçbir ajan verilmeyen (C kümesi) olmak üzere üç kümeye ayrıldı. Her üç kümede 40'ar sıçan olmak üzere çalışmada toplam 120 sıçan kullanıldı. Daha sonra her küme birisi kontrol olmak üzere üç sağaltım alt kümesine ayrıldı (Tablo I).

Tablo I. Sıçanlara ait sağaltım kümeleri.

Sağaltım	Sepsis (A)	Nötropeni+sepsis (B)	Normal
Kontrol	(A1) 10	(B1) 10	(C1) 10
rG-CSF	(A2) 10	(B2) 10	(C2) 10
İVİG	(A3) 10	(B3) 10	(C3) 10
rG-CSF+İVİG	(A4) 10	(B4) 10	(C4) 10
Toplam	(A) 40	(B) 40	(C) 40

B kümesini oluşturan 40 sıçana i.p. yolla 300mg/kg siklofosamid verilerek nötropeni oluşturuldu. Ayrıca her sıçana 1×10^7 bakteri/ml bakteri süspansiyonundan 1 ml verildi.

Sağaltım: Granülopoezi uyarıcı bir ajan olan rG-CSF (Neopogen, Roche) seçildi. Bakteri süspansiyonu i.p. yolla enjekte edildikten 16 saat sonra rG-CSF 30 mgr/kg/gün dozunda i.p. olarak 3 gün süreyle verildi.

Human IgG veya İVİG (Isiven, Phizer) 500 mgr/kg/gün dozunda i.p. olarak 3 gün süreyle verildi.

Bir küme sıçana da diğerleri için belirlenen rG-CSF ve human IgG dozları kombine olarak 3 gün süreyle uygulandı.

Yedi günlük gözlem süresi içinde ölen sıçanlar hemen, yaşayanlar, servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülerek, otopsileri yapıldı. Bunların sternum ve her iki femurları ölümden sonraki ilk on dakika içerisinde çıkartıldı. Her iki femurun proksimal ve distal epifizleri kemikten ayrılarak, birinden kemik iliği tam boşaltılarak lam üzerine yayma yapıldı. Diğer femur ve uzunlamasına iki parçaya ayrılan sternum hemen %10'luk formalin eriyiğinde işleme alındı.

Ayrıca dalak %10'luk formalin eriyiğinde işleme alındı. Kemik iliği ve dalaktan hazırlanan tüm kesitler Hematoksilin Eozin (HE), ayrıca ek olarak kemik iliğine ait kesitlerden birine Gomori'nin retikulum boyası yapıldı. Kemik iliği yaymaları ise Giemsa ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Elde edilen sonuçlara Ki kare, Kruskal Wallis ve tek yönlü varyans analizi yöntemlerinden Tukey's b testleri uygulanarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmada A, B ve C kümelerinde mortalite oranları değerlendirildi. C küme sıçanlarda 7 günlük gözlem süresince ölüm gözlenmedi. A ve B kümesindeki ölen sıçanların sayıları ve oranları Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II. Sağaltım kümelerine göre ölüm oranları.

Sağaltım	A		B	
	Ölen/Yaşayan	%	Ölen/Yaşayan	%
Kontrol	7/3	70	9/1	90
rG-CSF	5/5	50	7/3	70
İVİG	6/4	60	8/2	80
rG-CSF+İVİG	3/7	30	4/6	40

A ve B kümelerinde rG-CSF + İVİG sağaltımı uygulanan sıçanlar 7 günlük gözlem süresi boyunca en yüksek yaşam oranına ulaştı.

B kümesinde ölüm oranları yönünden kontrol ile diğerleri karşılaştırıldığında, kontrol ile rG-CSF + İVİG arasındaki ayrım istatistiksel olarak anlamlı ($t=2.34$; $p<0.05$), diğer kümeler arası ayrım istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$). rG-CSF ve İVİG uygulanan kümeler kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında ise ölüm oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmadı ($p>0.05$).

Sıçanların ölümünü izleyen ilk 10 dakika içerisinde çıkarılan sternum ve femur-kemik ilikleri ışık mikroskopunda selülarite, hücre dağılımı, nekroz, myelofibrozis ve retikülin lifleri dağılımı yönünden incelenerek değerlendirildi.

A, B ve C kümelerinin sternum ve femur kemik iliğinden hazırlanan doku kesitlerinde kemik iliği her üç diziye ait hücresel elemanı da içermekte olup, heterojen görünümde idi. A kümesindeki rG-CSF ve rG-CSF + İVİG verilen sıçanların tümünün kemik ilikleri hipersellüler görünümde idi (Resim 1,2). Hiçbir sağaltım verilmeyen sepsis kontrol kümesi ile yalnız İVİG verilenlerde kemik ilikleri normosellüler görünümde idi (Resim 3). B kümesinde tüm alt kümelerin kemik ilikleri hiposellüler idi (Resim 4).

A, B ve C kümelerine ait M/E oranlarının ortalama değerleri ve standart hataları Tablo III'de gösterildi.

Buna göre her üç küme kendi alt kümelerindeki kontroller ile karşılaştırıldığında rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilenler ile kontroller arasındaki ayırım istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). İVİG verilenler ile kontroller arasındaki ayırım anlamlı değildi.

A, B ve C kümelerine ait immatür myeloid hücre/matür myeloid hücre oranları Tablo IV'de gösterildi.

A, B ve C kümelerin her biri kendi alt kümeleri ile karşılaştırıldığında, rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilen küme ile kontrollerin immatür myeloid hücre/matür myeloid hücre oranı arasındaki ayırım istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). İVİG verilenler ile kontrolleri arasındaki ayırım anlamsızdı ($p>0.05$).

A, B ve C kümelerindeki sıçanların dalakları makroskopik olarak incelendiğinde A, B ve C kümelerinde rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilen sıçanların dalaklarının kendi kontrol kümelerindeki sıçanların dalaklarından daha büyük olduğu gözlemlendi. Ayrıca A, B, C küme sıçanların dalakları histopatolojik olarak ekstramedüller hematopoez görülmesi yönünden değerlendirildi. A, B ve C kümelerindeki rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilen sıçanların tümünde kontrollere oranla daha belirgin ekstramedüller hematopoez izlendi.

A, B ve C küme sıçanların tümünde kırmızı pulpayı oluşturan sinüsler dilate ve konjesyone idi. B kümesinde kontrol alt kümesi ve İVİG verilen kümedeki sıçanların dalaklarından hazırlanan kesitlerin histopatolojik incelemesinde beyaz pulpa atrofik görünümde idi (Resim 6).

rG-CSF ve rG-CSF + İVİG verilenlerde ise normal sıçanların dalak kesitleri ile aynı özellikler gözlemlendi (Resim 7).

Tablo III. Sağaltım kümelerinin kemik iliği histopatolojik incelemesine göre ortalama myeloid/eritroid (M/E) oranları.

Sağaltım	A	B	C
Kontrol	1.28±0.013	1.26±0.016	1.3±0.021
rG-CSF	1.39±0.035	1.52±0.013	2.07±0.11
İVİG	1.33±0.013	1.374±0.015	1.32±0.053
rG-CSF+İVİG	1.39±0.041	1.5±0.011	1.985±0.088

Sonuç: (KW: 8.8238; $p<0.05$) (KW: 30.012; $p<0.05$) (KW: 28.3268; $p<0.05$)

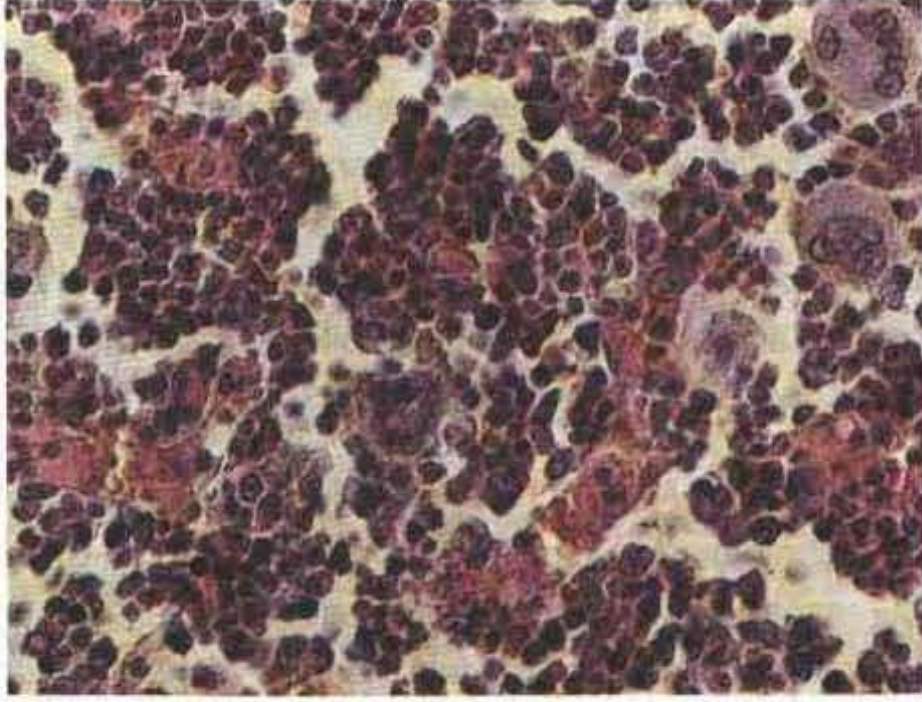
Tablo IV. Sağaltım kümelerinin kemik iliği histopatolojik incelemesine göre ortalama İM/MM myeloid oranları.

Sağaltım	A	B	C
Kontrol	0.23±0.008	0.24±0.012	0.2±0.011
rG-CSF	0.325±0.17	1.1±0.067	2.2±0.133
İVİG	0.25±0.018	0.25±0.018	0.21±0.007
rG-CSF+İVİG	0.33±0.02	1.08±0.071	2.135±0.042

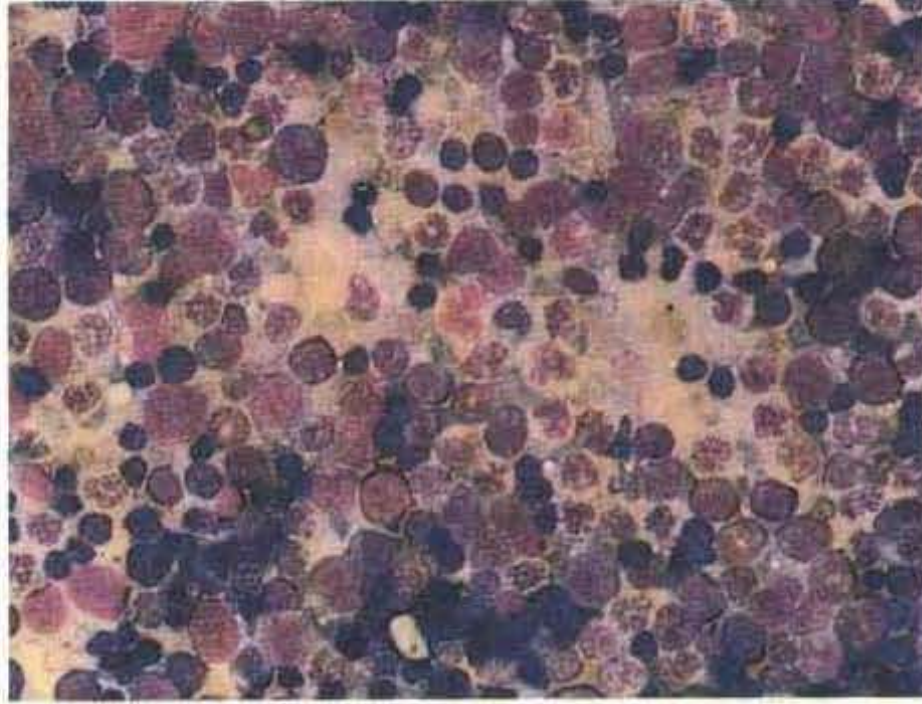
Sonuç: (KW: 20.2175; $p<0.05$) (KW: 33.1049; $p<0.05$) (KW: 31.5999; $p<0.05$)

Tartışma

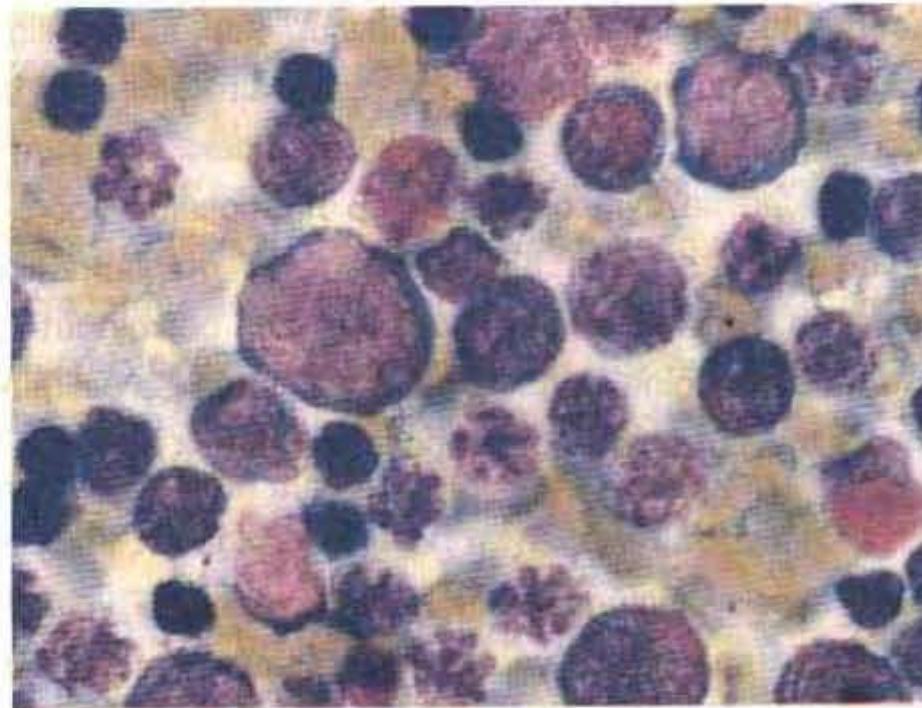
Son zamanlarda fagositik hücre progenitörlerinin diferansiyasyon ve proliferasyonunun koloni uyarıcı faktörler tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (9,14,17,18). rG-CSF, nötrofil dizisindeki hematopoetik progenitör hücrelerin diferansiyasyon ve proliferasyonunu uyarmakla kalmayıp, periferik kandaki nötrofillere kemotaktik peptid bağlanmasını ve antikor bağımlı sitotoksitesiyi artırmak için progenitör hücrelerin tam olarak diferansiyasyonunu sağlamaktadır. rG-CSF ayrıca nötrofiller için kemotaktik ajan olarak da fonksiyon yapabilir. Bu nedenle eksojen olarak rG-CSF'nin profilaktik ya da terapötik amaçla Gram negatif sepsiste verilmesinin yararlı olabileceği bildirilmektedir (9,11,18-21). rG-CSF sadece nötrofil sayı ve fonksiyonunu artırarak mortalite oranını düşürmekle kalmayıp, serum endotoksin ve TNF-a düzeyini düşürerek, ayrıca dolaşan bakteri sayısını da azaltarak mortalite oranını önemli ölçüde düşürmektedir (9,11,19,20). Deneysel sepsis geliştirdikten sonraki ilk 24 saat içerisinde rG-CSF sağaltımına başlanırsa mortalite oranının belirgin ölçüde azaldığı belirtilmektedir (13).



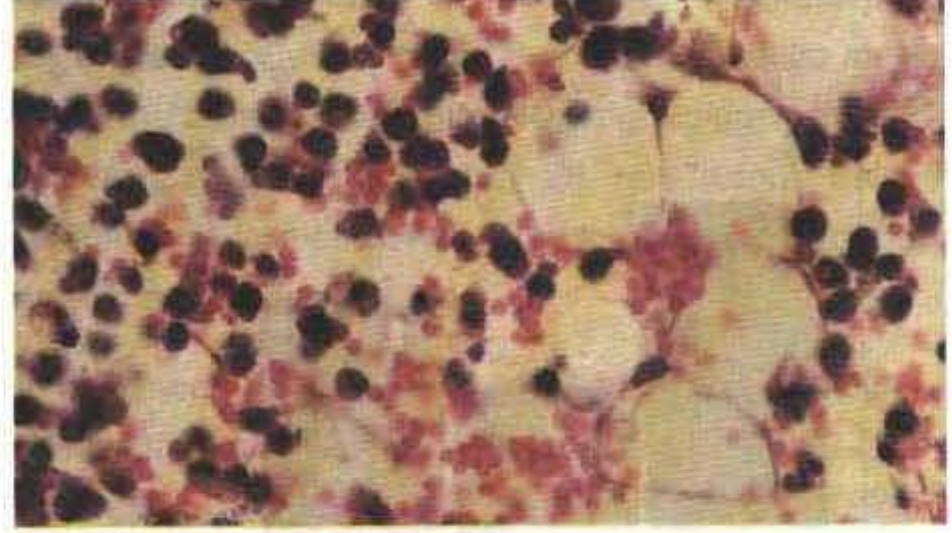
Resim 1. A kümesi rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilen sıçanda hiperselüler heterojen kemik iliği (HE, x150).



Resim 2. A kümesinden bir sıçanda kemik iliği yaymasında immatür, matür myelositer ve eritrositer dizi hücreleri (Giemsa, x300).



Resim 3. Sepsis kontrol kümesindeki sıçanda kemik iliği yayma preparasyonunda normoselüler heterojen kemik iliği (HE, x750).



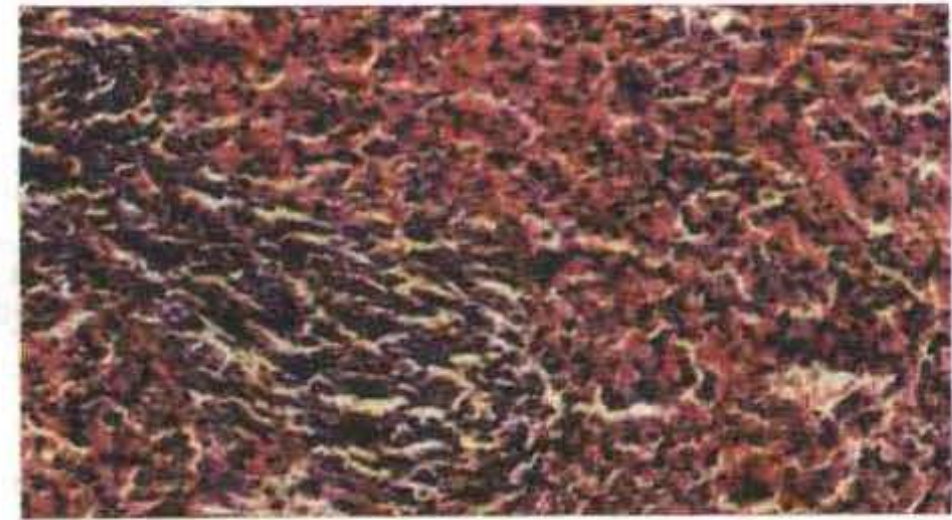
Resim 4. B Kümesindeki bir sıçanda hiposelüler heterojen kemik iliği (HE, x150).



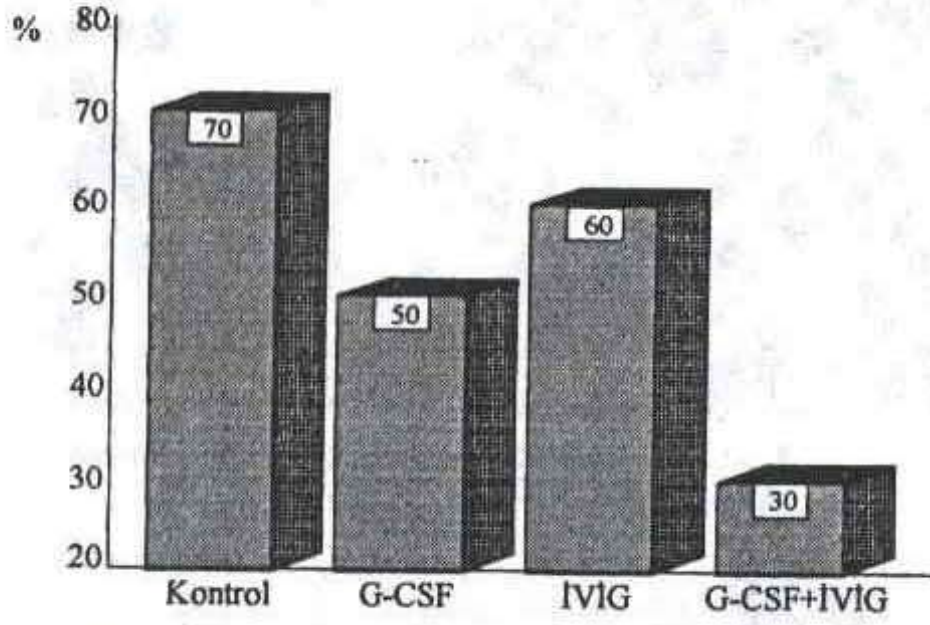
Resim 5. B kümesinin kontrol alt grubu (sağ taraf) ile rG-CSF verilen kümeden birer sıçana ait dalakların makroskopik karşılaştırılması.



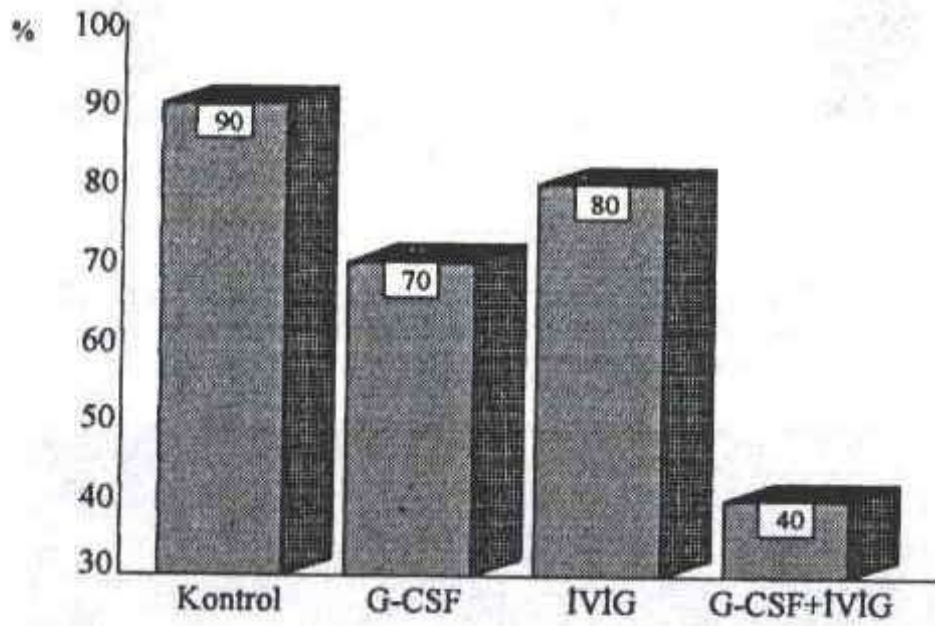
Resim 6. B kümesinin kontrol alt grubundaki sıçan dalağında görülen atrofik beyaz pulpa ve konjesyone sinüzoidler (HE, x75).



Resim 7. Hiçbir sağaltım uygulanmayan kontrol alt kümesindeki sıçana ait normal dalak dokusu (HE, X150).



Grafik 1. A kümesine (sepsis kümesi) ait mortalite oranları.



Grafik 2. B kümesine (nötropeni+sepsis kümesi) ait mortalite oranları.

Eichacker ve ark., rG-CSF'nin bakterilerin öldürülmesini ve atılımını artırdığını, böylece dolaşan endotoksin düzeyini düşürerek mortaliteyi azalttığını belirtmektedirler. Smith ve ark. yaptıkları çalışmada, rG-CSF kullanımı lökopenik grupta mortalite oranında azalma sağlarken, lökopenik olmayan grupta etkili bulmamışlardır (7,13).

Sepsis gelişiminden sonraki ilk 12 saat içerisinde verilen İVİG'in mortalite oranını azalttığı bildirilmekle birlikte, intraperitoneal olarak 2gr/kg/gün dozunda verildiğinde

bile mortalite oranını çok fazla değiştirmedeği de belirtilmektedir (15,22). IgG, nötrofil fonksiyonlarını, hücrel immüniteyi, plazma fibronektin ve IgM düzeylerini değiştirerek mortaliteyi azaltabilmekte, ancak pürifiye İVİG ile bu etkilerin tümü gerçekleştirilememektedir. Bir çalışmada E. coli ve diğer Gram negatif sepsislerinde İVİG sağaltım amacıyla i.v. verildiğinde bile mortaliteyi önemli ölçüde değiştirmedeği gösterilmiştir (23).

Bu çalışmada A ve B kümesindeki mortalite oranları karşılaştırıldığında, genel olarak rG-CSF ve rG-CSF+İVİG sağaltım gruplarındaki mortalite oranları düşük bulunmuştur. A alt gruplarındaki mortalite oranları; A1'de %70, A2'de %50, A3'te %60 ve A4'te %30 olarak bulundu ($p>0.05$). B alt gruplarına göre mortalite oranları; B1'de %90, B2'de %70, B3'te %80 ve B4'te %40 olarak bulundu. Gruplar arası mortalite oranları karşılaştırıldığında sadece rG-CSF+İVİG verilen grup ile kontrol kümesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$).

Bu sonuç İVİG sağaltımının sepsisteki mortalite oranını değiştirmedeğini, rG-CSF sağaltımının mortaliteyi iyi yönde etkilemekle beraber klinik kullanımda tek başına yeterli olmayacağını düşündürmektedir. B4 kümesindeki rG-CSF+İVİG sağaltımının nötrofil sayı ve fonksiyonunda iyileşmeye yol açarak mortaliteyi iyi yönde etkilediği düşünüldü.

Bu çalışmada A2 ve A4 alt gruplarındaki sıçanların kemik iliklerinin histopatolojik incelenmesinde yağ dokusu oranında belirgin azalma mevcut olup kemik iliği hiperselüler görünümde idi. Yalnız A3 alt kümesindeki sıçanların kemik ilikleri kontrol kümesindeki sıçanların kemik ilikleri ile aynı özellikte olup normoselüler görünümde idi. B kümesi tüm sağaltım alt gruplarındaki sıçanların kemik iliklerinde yağ dokusunda belirgin artış, kırmızı kemik iliğine ait hücrel elemanlarda ise belirgin azalma mevcut olduğundan hiposelüler olarak değerlendirildi.

Yalnız sepsis oluşturulan A kümesinde rG-CSF ve rG-CSF+İVİG sağaltımı uygulanımı arasında kemik iliği selülaritesi yönünden herhangi bir fark tesbit edilmedi. Bu hücrel artış yalnız rG-CSF'nin myelositer diziye ait matür ve immatür elemanları uyararak sayılarını artır-

masına bağlanabilir. Bu durumda tek başına İVİG sağaltımının kemik iliği hiperselülaritesi üzerine etkisinin olmadığı sonucuna varılabilir.

Cairo ve ark. ile Iguchi ve ark. yaptıkları çalışmalarda 7 gün süreyle rG-CSF verdikten sonra femoral kemik iliği yaymalarını değerlendirmişler, nötrofil proliferatif havuzunda (promyelosit ve myelosit) belirgin artış olduğunu göstermişlerdir (16,24).

Çalışmada, Giemsa ile boyanan femur kemik iliği yaymaları myeloid/eritroid oranı yönünden değerlendirildiğinde, A2 kümesinde 1.39 ± 0.035 , A4 kümesinde 1.39 ± 0.041 , A3 kümesinde 1.33 ± 0.013 olarak saptandı. Bu değerler A1 kümesindeki 1.28 ± 0.013 değerleri ile karşılaştırıldığında A2 ve A4 kümesi sıçanlara ait M/E oranı arası farklılık anlamlı idi ($p < 0.05$). A3 ve A1 gruplarına ait M/E oranları arasında farklılık saptanmadı. Bu da M/E oranındaki artışın direkt rG-CSF'nin kemik iliği myeloid dizi hücrelerini, özellikle de granülositer diziyi artırıcı etkisine bağlı olduğunu, İVİG'in tek başına M/E hücre oranı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını düşündürdü.

Bu çalışmada, Giemsa ile boyanan femur kemik iliği yaymaları ve HE ile boyanan femur-sternum kemik iliği preparatlarında İM/MM hücre oranları yönünden değerlendirildiğinde, A2 ve A4 ile A1 kümesi sıçanlara ait immatür/matür myeloid hücre oranı arasındaki fark önemli idi ($p < 0.05$). A3 ve A1 kümesine ait İM/MM hücre oranları arasındaki fark önemsiz idi. B2 ve B4 kümesi ile B1 kümesi sıçanlara ait immatür/matür myeloid hücre oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). B3 kümesi ile B1 kümesine ait immatür/matür myeloid hücre oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu. C2 ve C4 kümesi sıçanlara ait İM/MM hücre oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Bu sonuçlar rG-CSF'nin İVİG'e bağlı olmaksızın immatür myeloid hücrelerde belirgin artışa neden olduğunu düşündürdü. İVİG'in ise kemik iliğindeki immatür myeloid hücrelerin sayısını artırıcı bir etkisinin olmadığı görüldü.

rG-CSF yüksek dozda ya da uzun süre kullanıldığı zaman dalağı büyütmektedir. Bu büyüme dalakta myelopoiesisin artışına bağlıdır. 10 mgr/kg/gün dozunda sıçanlara rG-CSF verildikten 28 gün sonra dalağın histopatolojik incelemesinde ekstramedüller hematopoez tesbit edilmektedir (25,26).

Bu çalışmada A, B ve C kümesindeki sıçanların dalakları makroskopik olarak incelendiğinde rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilen sıçanların dalaklarının kontrol kümesi sıçanların dalaklarından daha büyük olduğu ve bu dalakların HE ile boyanan kesitlerinde kordonlarda ve venöz sinüslerde belirgin ekstramedüller hematopoezin varlığı saptandı. A, B ve C kümesindeki rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilen sıçanların dalaklarının kontrol kümesi sıçanların dalaklarından daha büyük olmasının artmış ekstramedüller hematopoeze bağlı olduğu düşünüldü.

B kümesinde hiçbir sağaltım verilmeyen kontrol kümesindeki sıçanların dalaklarının mikroskopik incelemesinde beyaz pulpada belirgin atrofi mevcuttu. rG-CSF ve rG-CSF+İVİG verilen grupta ise beyaz pulpayı oluşturan lenfoid foliküller normal sıçanların dalakları ile aynı özellikte idi. Bu durum rG-CSF'nin siklofosfamidin oluşturduğu atrofiyi ortadan kaldırdığı şeklinde yorumlandı. Ancak bu konuda literatür bilgisine rastlanmadı. Yalnız İVİG verilen sıçanlarda ise kontrol kümesi ile bir farklılık tesbit edilmedi.

Sonuç olarak, rG-CSF ve rG-CSF+İVİG sağaltımının nötropenik sepsiste mortalite oranını önemli ölçüde azalttığı, böylece sağaltım süresini kısaltabileceği söylenebilir. rG-CSF sağaltımının M/E oranı ile İM/MM oranında belirgin artışa neden olduğu, sepsisli ve nötropenik sepsisli sıçanların dalaklarında artan ekstramedüller hematopoeze bağlı olarak makroskopik büyümeye neden olduğu gösterildi. Bütün bu sonuçlara karşın, klinikte yetişkin insanlarda sepsis sağaltımında rG-CSF nin tek ya da İVİG ile kombine kullanımının uygun olup olmadığının belirlenebilmesi için daha fazla hayvan deneylerinin yapılmasının gerekli olduğu düşünüldü.

Kaynaklar

1. Dunn DL. Immunotherapeutic advances in the treatment of gram-negative bacterial sepsis. *World J Surg* 1987; 11: 233-240.
2. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, Maccabe WR. Gram-negative bacteremia: I. reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980; 68: 332-343.
3. Maclean LD, Meakins JL, Taguchi K, Duignan JP et al. Host resistance in sepsis and trauma. *Ann Surg* 1975; 182: 207-215.
4. Spapen HD, Diltoer M, Huyghens LP. Passive immunotherapy of gram-negative bacteremia, sepsis and septic shock. *Acta Clin Belg* 1993; 48 (1): 20-29.
5. Yenerman M. Genel Patoloji. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 1994; 15-32.
6. Kliegman RM, Behrman RE. Bacteremia and septicemia. In: Behrman RE, Kliegman RM, 53 WE, Vaughan VC. 53 textbook of pediatrics. Fourteenth edition. Philadelphia, WB Saunders Company. 1992; 681-682.
7. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 457-469.
8. Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM et al. A randomized controlled phase I trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993; 81: 2496-2502.
9. Eichacker PQ, Waisman Y, Natanson C, Farese A et al. Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis. *J App Physiol* 1994; 77 (5): 2366-2373.
10. Gessler P, Kirchmann N, Kientsch-Engel R, Haas N et al. Serum concentrations of granulocyte colony-stimulating factor in healthy term and preterm neonates and in those with various diseases including bacterial infections. *Blood* 1993; 82: 3177-3182.
11. Görgen I, Hartung T, Leist M, Niechöster M et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 1992; 149 (3): 918-924.
12. Matsumoto M, Matsubara S, Matsuno T, Tamura M et al. Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor on microbial infection in neutropenic mice. *Infect Immun* 1987; 55 (1): 2715-2727.
13. Smith WS, Sumnicht GE, Sharpe RW, Samuelson D et al. Granulocyte colony-stimulating factor versus placebo in addition to penicillin G in a randomized blinded study of gram-negative pneumonia sepsis: Analysis of survival and multisystem organ failure. *Blood* 1995; 86: 1301-1309.
14. Uchida K, Yamamoto Y, Klein TW, Freidman H et al. Granulocyte-colony stimulating factor facilitates the restoration of resistance to opportunistic fungi in leukopenic mice. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 293-300.
15. Givner LB, Nagaraj SK. Hyperimmune human IgG or recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjunctive therapy for group B streptococcal sepsis in newborn rats. *J Pediatr* 1993; 122: 774-779.
16. Iguchi K, Inoue S, Kumar A. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in normal and experimentally infected newborn rats. *Exp Hematol* 1991; 19: 352-358.
17. Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 1986; 68 (3): 708-711.
18. Reilly MO, Silver GM, Greenhalgh DG. Treatment of intra-abdominal infection with granulocyte colony-stimulating factor. *J Trauma* 1992; 33: 679-682.
19. Daifuku R, Andresen J, Morstyn G. Recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor for the prevention and treatment of non-neutropenic infectious diseases. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 91-97.
20. Fink MP, Sullivan BPO, Menconi MJ, Wollert SP et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on systemic and pulmonary responses to endotoxin in pigs. *J Trauma* 1993; 34: 571-577.
21. Lorenz W, Reimund KP, Weitzel F, Celik I et al. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery* 1994; 116: 925-934.
22. Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, Verhoef J et al. Treatment of gram-negative septic shock with human IgG antibody to Escherichia coli J5: A prospective, double-blind, randomized trial. *J Infect Dis* 1988; 158: 312-319.
23. Baumgartner JD, Glauser MP. Controversies in the use of passive immunotherapy for bacterial infections in the critically ill patients. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 194-205.
24. Cairo MS, Plunkett JM, Nguyen A, Van C. Effect of stem cell factor with and without granulocyte colony-stimulating factor on neonatal hematopoiesis: In vivo induction of newborn myelopoiesis and reduction of mortality during experimental group B streptococcal sepsis. *Blood* 1992; 80: 96-101.
25. Bonilla MA, Gillio AP, Ruggerio M, Kernan NA et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. *N Eng J Med* 1989; 15: 1574-1580.
26. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991; 78: 2791-2808.

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Ruhiye Cevit
Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Sivas