



Sepsiste Deneysel Modeller

Alper B. İSKİT*

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Experimental Models in Sepsis

Key Words: Septic shock, Experimental models, Endotoxin.

Anahtar Kelimeler: Septik şok, Deneysel modeller, Endotoksin.

Yeni bulunan ilaçlar, antibiyotikler ve immünmodülasyona yönelik tedavi protokollerine rağmen, septik şok, %30-90 ölüm oranı ile seyreden, önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir^[1]. Bu durum septik şok ile yapılan klinik deneysel çalışmaların büyük bir ivme ile artışına neden olmakla beraber, bu çalışmalarda hastaların çeşitliliği, değişik etyolojik septik şok sebepleri, çeşitli farklı tedavi yaklaşımları vb. gibi sebeplerle tatminkar sonuçlar alınamamaktadır^[1]. Aynı şekilde, klinik deneysel çalışmalara fikir kaynağı olan deneysel hayvan modellerinde farklı septik şok modelleri, farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmalar vb. gibi nedenlerle sonuçlarda çelişkiler ve farklılıklar söz konusudur^[2]. Septik şok deneysel modellerinin yeterliliği de günümüzde zaman zaman tartışılmaktadır. Bu modellerde

kullanılan fare, sıçan gibi hayvanların aslında insanlara göre endotoksine daha az hassasiyet göstermesi, gram-pozitif bakterilerle çalışmaların az olması gibi birçok faktör tartışma konusudur^[2]. Deneysel hayvan çalışmalarındaki bütün olumsuzluklara rağmen unutulmaması gereken en önemli nokta, insanlar üzerindeki klinik çalışmalar öncesinde, ilaçların hayvan deneylerinde mutlaka denenmesi ve incelenmesi gerekliliğidir (ön çalışma). Bu yazıda deneysel hayvan septik şok modelleri incelenerek, aralarındaki farklar tartışılacaktır.

LİPOLİSAKKARİD VERİLEREK OLUŞTURULAN SEPTİK ŞOK MODELLERİ

Lipopolisakkarid (LPS) gram-negatif bakterilerin hücre duvarından elde edilen, deney-

Yazışma Adresi: Doç. Dr. Alper B. İSKİT

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Farmakoloji Anabilim Dalı, 06100, Sıhhiye-ANKARA
e-mail: alperi@hacettepe.edu.tr

Makalenin Geliş Tarihi: 06.01.2004

Makalenin Kabul Tarihi: 13.01.2004

sel hayvan septik şok modellerinde kullanılan, glikolipid yapıdaki maddeler grubudur. Literatürde LPS ve endotoksin aslında aynı anlamda kullanılsa da aralarında fark vardır. LPS saflaştırılmış glikolipid yapıya sahiptir. Endotoksin ise LPS'ye ek olarak az miktarda hücre duvarı proteinleri, lipidler, lipoproteinler ve polisakkarid içerir. LPS toksisitesi çoğunlukla içerdiği lipid A yapıdan kaynaklanır. LPS genelde liyofilize toz halinde ticari olarak temin edilir. Liyofilizasyon işlemi fenol ekstraksiyonu, triklorasetikasit ekstraksiyonu, fenol-kloroform-eter ekstraksiyonu, jel filtrasyon gibi farklı kimyasal işlemler uygulanarak üretici firma tarafından yapılır. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok gram-negatif bakteriden elde edilmesine rağmen deneysel septik şok çalışmaları *E. coli*'den elde edilen LPS'ler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu grupta O26:B6, O55:B5, O111:B4 gibi farklı serotiplere sahip farklı suşlardan elde edilmiş LPS türleri mevcuttur.

LPS ile septik şokta metabolik, immünolojik, fizyolojik, toksikolojik ve farmakolojik çalışmalar yapılmaktadır. Toz halindeki LPS planlanan deneysel çalışma prokollerine göre suda çözünerek deney hayvanlarına periton veya damar içine tek doz veya infüzyon şeklinde verilir. Literatür incelendiğinde uygulanacak dozun 1 mg/kg ile 80-100 mg/kg aralığında geniş bir doz aralığına sahip olduğu gözlemlenir^[3-7]. Sağkalım çalışmalarında dozlar genelde yüksektir^[8]. Dozları belirleyen bir diğer önemli nokta da LPS'nin hangi suşlardan elde edildiğidir. Küçük hayvan türlerinde LPS uygulamasından sonra sıvı desteği, entübasyon, mekanik ventilasyon gibi ek girişimlere uygulama zorlukları nedeniyle pek rastlanmaz. LPS sonrası gözlenen tablo doz ve tür bağımlı olarak değişir.

LPS verilerek oluşturulan deneysel septik şok çalışmalarında deney hayvanı türünün seçilmesi ise bir diğer tartışma konusudur. Tür seçimini etkileyen en önemli faktörler;

- Maliyet,
- Bulunabilirlik,
- Araştırmacıların daha önceki deneyimleri,
- Çalışmanın amacı ve hipotezine uygunluktur.

Ucuz olması, bulunabilirliğinin ve deney sonrasında yaşatılabilirliğinin nispeten kolay olması fare, sıçan, kobay gibi küçük hayvanları köpek, domuz, koyun gibi daha büyük türlere üstün kılmaktadır. Özellikle sağkalım çalışmalarında küçük türler tercih edilmektedir^[8]. İzole kalp, böbrek, akciğer gibi organ fonksiyonlarının in vitro veya perfüzyon sistemleri kullanılarak incelenmesi hedefleniyorsa, bu türleri kullanmak daha verimli ve kolaydır. Aynı durum histopatolojik inceleme için de söz konusudur^[3,9]. Ancak küçük hayvan türlerinde sıvı resüsitasyonu veya klinikte uygulanan hemodinamiye yönelik destek tedavisi uygulamak zordur.

Kardiyak debi, pulmoner arter basıncı ölçümü gibi parametreler takip edilecekse veya biyokimyasal tetkik amacıyla çok sayıda kan alınması gerekiyorsa büyük hayvan türleri tercih edilmelidir^[10]. Büyük hayvan türleri kullanılarak, klinikteki septik şok tablosuna benzer tablo oluşturmak amacıyla, LPS infüzyonu esnasında yüklü sıvı resüsitasyonu yapmak veya dopamin gibi vazoaaktif ilaçları kullanabilmek de mümkündür. Septik şok çalışmalarında özellikle büyük hayvan türlerinden koyun ve domuz tercih edilmektedir^[10]. Domuzların renal, kardiyovasküler ve gastrointestinal sistem anatomileri ile insan sistemleri arasında benzerlikler mevcuttur. Ülkemizde fazla bilinmemesine rağmen domuzlarla çalışmanın bir diğer avantajı da ucuz olmalarıdır.

LPS ile Oluşturulan Septik Şok Modellerinin Dezavantajları

1. Farklı ekstrasyon işlemine uğramış veya farklı serotiplere sahip LPS türleri ile yapılan çalışmaların sonuçları arasında tutarsızlıklar mevcuttur. Deneysel model oluşturulurken, kullanılacak LPS türü, serotipi gibi özellikler göz önünde bulundurulmalıdır.

2. Dışarıdan genelde tek doz veya infüzyon halinde verilen endotoksin miktarının şoktaki hastalardakinden daha yüksek olması klinikteki durumla uyum göstermez. Bazı çalışmalarda insan dolaşımındaki endotoksin ile klinik bulgular, prognoz ve mikrobiyolojik bulgular arasında korelasyon da gösterilememiştir^[11].

3. Verilen tek tip mikroorganizmaya ait endotoksin, insan septik şok tablosundaki çeşitli türlerdeki canlı bakterilerin yerini tutmamaktadır. Bu nedenle çeşitli mikroorganizmaların

gözlendiği CLP modelleri bazı araştırmacılar tarafından tercih edilir.

4. Hayvan modellerinde LPS verilmesi insan kompanse sepsis tablosundan doz ve tür bağımlı olarak farklılık gösterir. İnsan kompanse sepsis tablosunda kardiyak debi artmış, sistemik damar direnci oldukça düşmüştür (hiperdinamik durum). Aslında bu düşük sistemik direnç prognozun bir göstergesidir ve zamanla kardiyak debi normale dönerken, direnç düşüklüğü devam eder^[12].

Hayvan deneylerinde verilen yüksek doz LPS ise genelde birçok türde kardiyak debiyi düşürürken, sistemik direnç normal veya yükselmiştir. LPS dozunun düşük olması ise hiperdinamik fazın gözlenmesine sebep olur ve insan kompanse sepsis tablosuna benzer bir model oluşur^[13].

LPS ile Oluşturulan Septik Şok Modellerinin Avantajları

1. İntravenöz veya periton içine genelde tek doz halinde verildiğinden kullanımı kolaydır.

2. Stabil ve saf olması, liyofilize biçimde saklanabilmesi kolaylık sağlar. Bakterilerde gözlenen saklanma zorluğu ve kontaminasyon tehlikesi yok denecek kadar azdır.

ÇEKUM BAĞLAMA ve DELME MODELİ [CECAL LIGATION and PUNCTURE (CLP)]

Öncelikle sıçanlarda tarif edilmesine rağmen fare ve koyunlarda da uygulanmıştır. Anestezi altındaki hayvanlarda bağırsak geçişini bozmaksızın çekumun standart bir iplik ile bağlanması ve daha sonra bağlanan kısmın standart ölçüdeki bir enjektör iğnesi ile bir veya iki kez delinmesi esasına dayanır. Operasyon sonrasında karın boşluğu kapatılarak hayvanlara ağırlıklarına göre cilt altına sıvı (resüsitasyon) verilir^[14,15].

CLP ile Oluşturulan Septik Şok Modellerinin Dezavantajları:

1. Farklı araştırma gruplarının sonuçları arasında değişkenlikler gözlenebilir. Bu durumun olası sebepleri:

- Farklı seviyelerde çekum bağlanması,
- Bağırsak geçişinin durması,
- Delme sayısı ve kullanılan iğnenin çapı (22 G, 18 G... vb.),

d. Delme sonrası bazı araştırmacıların çekumdan feçes çıkışını hızlandırmaları,

e. Hayvanların aç veya tok olması,

f. Resüsitasyon amacıyla sıvı verilip verilmemesi.

CLP ile Oluşturulan Septik Şok Modellerinin Avantajları

1. Uygulaması kolay ve ucuzdur. LPS veya bakteriye gerek yoktur.

2. Diğer modellerden farklı olarak çok çeşitli mikroorganizmaların (polimikrobiyal) gözlemlendiği septik şok tablosu gelişir.

3. Klinikteki septik şok tablosuna benzer bir model oluşur (perfore apandisit, divertikülit, kolon perforasyonu gibi).

DAMAR veya PERİTON İÇİNE CANLI BAKTERİ UYGULANMASI

Literatürde özellikle intravenöz *E. coli* ile oluşturulmuş modeller mevcuttur. İntravenöz 10^8 - 10^9 - 10^{10} bakteri/kg uygulaması ile sıçanlarda iki saat içerisinde hiperdinamik faz oluşmaktadır^[16]. Bakteriler tek seferde veya infüzyon ile verilebilir. Bu deneysel metoda en büyük eleştirisel bakış, insan septik şok tablosunda bu kadar kısa süre içinde yüksek miktarda bakteri ile karşılaşılmasıdır. Kullanılacak hayvan türleri büyüdükçe sıvı resüsitasyonu veya vazoaktif maddelerle destek tedavisi ile kliniğe uygun model yaratmak mümkün olmaktadır.

Periton içine canlı bakteri uygulaması (*E. coli*, *Klebsiella* veya *Bacteroides fragilis*) ise sıçanlarda 24 saatte %100 ölüm ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle periton içine yavaş salınımlı, bakteri açığa çıkaran, ozmotik minipompa veya başka sistemler kullanılmıştır. Bu sistemler ile 18-20 gün içinde ölüm gözlenmiştir^[17]. Bazı araştırmacılar ise bakteri miktarını azaltarak bakteri ile feçes, agar vb. maddeler vererek deneysel modeller kullanmıştır^[18]. İntravenöz ve periton içine canlı bakteri uygulaması sırasında laboratuvar çalışanları ve araştırmacılar için kontaminasyon riski olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

SONUÇ

İdeal modelin standardize edilmiş ve insan da gözlenen septik şok tablosuna benzer özellikler gösteriyor olması en temel beklentiler olmasına rağmen tüm özelliklere sahip tek bir

model tanımlanamamıştır. Bilinen bir gerçek ise, erken ölümlerin gözlemlendiği bazı nadir durumlar dışında, septik şoktaki hastaların solunum yetmezliği sonucunda ventilatör bağımlı hale gelmeleridir. Hayvan modellerinin hiçbirinde yoğun bakım ünitelerinde uygulanan destekleyici tedaviye benzer bir durum yaratmak kolay gözükmemekle beraber septik şok patofizyolojisinin anlaşılmasında, klinik deneme öncesi yeni tedavi protokollerinin (yaklaşımlarının) bulunmasında deneysel modellerin önemi hiç kuşkusuz son derece fazladır.

Teşekkür:

Doç. Dr. Alper B. İskit, Türkiye Bilimler Akademisi Genç Bilim İnsanlarını Ödüllendirme Programı (TUBA-GEBİP) tarafından desteklenmektedir (EA-TUBA-GEBİP/2001-2-11).

KAYNAKLAR

1. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *J Am Med Assoc* 1995;273:117-23.
2. Villa P, Sartor G, Angelini M, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:549-53.
3. İskit AB, Sungur A, Gedikoglu G, et al. The effects of bosentan, aminoguanidine and L-canavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. *Eur J Pharmacol* 1999;379:73-80.
4. Baykal A, İskit AB, Kaynaroglu V, et al. Effects of adrenaline or endotoxin tolerance states on mesenteric blood flow in endotoxaemia. *Aus N Z J Surg* 1999;69:134-37.
5. Kavuklu B, İskit AB, Guc MO, et al. Aminoguanidine attenuates endotoxin-induced mesenteric vascular hyporeactivity. *Br J Surg* 2000;87:448-53.
6. Baykal A, Kavuklu B, İskit AB, et al. An experimental study of the effect of nitric oxide inhibition on mesenteric blood flow and interleukin-10 levels in lipopolysaccharide. *World J Surg* 2000;24:1116-20.
7. Baykal A, İskit AB, Hamaloglu E, et al. Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNF alfa concentrations after lipopolysaccharide challenge. *Eur J Surg* 2000;166:722-7.
8. İskit AB, Guc MO. The timing of endothelin and nitric oxide inhibition affects survival in a mice model of septic shock. *Eur J Pharmacol* 2001;414:281-7.
9. İskit AB, Guc MO. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia and survival in experimental models of septic shock. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:953-7.
10. Weitzberg E, Hemsén A, Rudehill A, et al. Bosentan-improved cardiopulmonary vascular performance and increased plasma levels of endothelin-1 in porcine endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1996;118:617-26.
11. Elin RJ, Robinson RA, Levine AS, et al. Lack of clinical usefulness of the limulus test in the diagnosis of endotoxemia. *N Engl J Med* 1975;11:293:521-4.
12. Law WR, Ferguson JL. Naloxone alters organ perfusion during endotoxin shock in conscious rats. *Am J Physiol* 1988;255:1106-13.
13. Fink MP, Morrissey PE, Stein KL, et al. Systemic and regional hemodynamic effects of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase inhibition in normal and hyperdynamic endotoxemic rabbits. *Circ Shock* 1988;26:41-57.
14. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983;94:331-5.
15. Yang S, Chung CS, Ayala A, et al. Differential alterations in cardiovascular responses during the progression of polymicrobial sepsis in the mouse. *Shock* 2002;17:55-60.
16. Pass LJ, Schloerb PR, Pearce FJ, et al. Cardiopulmonary response of the rat to gram-negative bacteremia. *Am J Physiol* 1984;246:344-50.
17. Alexander JW, Gonce SJ, Miskell PW, et al. A new model for studying nutrition in peritonitis. The adverse effect of overfeeding. *Ann Surg* 1989;209:334-40.
18. Nakatani T, Sato T, Marzella L, et al. Hepatic and systemic metabolic responses to aerobic and anaerobic intra-abdominal abscesses in a highly reproducible chronic rat model. *Circ Shock* 1984;13:271-94.