

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**RATLARDA OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL
PNÖMOPERİTONYUM MODELİNDE BETA- D GLUKAN'IN
PERİTONEAL İMMÜN DEFANS BELİRTEÇLERİ VE SİTOKİN
YANITI ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Okan YUMUŞ

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr.Eray KARA

Manisa, 2007

ÖNSÖZ

“Cerrahi, akıl yoluyla ellerimizi kullanarak hastaları iyileştirebileceğimizi, bazen bizim de başımıza gelebilecek olan hastalıklardan nasıl korunup, onları ne şekilde azaltabileceğimizi öğreten bir sanattır”

Ambroise Paré, 1582

Uzmanlık eğitimim süresince, “*cerrahi sanatı*”nın tüm inceliklerini sabırla ve bir o kadar titizlikle öğreten, deneyimlerini benimle paylaşan, bana mesleki disiplin ve çalışma sevgisi aşılayan saygıdeğer tüm hocalarıma, tez çalışmam boyunca bana her türlü yardımı sağlayan, değerli hocam Doç.Dr.Eray Kara’ya, eğitim süreci boyunca birlikte çalışmanın mutluluk ve sevincini her an hissettiğim sevgili asistan arkadaşlarıma, bu tezin oluşturulmasında desteğini ve zamanını hiçbir zaman esirgemeyen Doç.Dr.Cengiz Kırmaz ve Senay Coşkun’a, her an sevgi, destek ve hoşgörülerini yanımda hissettiğim biricik eşim, kızım ve aileme en içten teşekkürlerimi, saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

Dr. Okan YUMUŞ

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
1- Periton ve Peritoneal İmmünite	
2- İmmün Sistemin Temel Bileşenleri	
2.A. CD4 ⁺ T hücreleri	
2.B. CD8 ⁺ T hücreleri	
2.C. Regülatör T hücreleri	
2.D. Sitokinler	
3- Cerrahi Travmaya Peritonun İmmün Yanıtı	
4- Pnömooperitonyum ve İmmün Yanıt	
5- Beta-Glukan	
III. GEREÇ VE YÖNTEM	16
1- Grupların Tanımlanması	
2- Deney Tekniği	
IV. BULGULAR	21
1- Hücresel Yanıt	
2- Sitokin yanıtı	
V. TARTIŞMA	34
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
VII. ÖZET	42
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	43
IX. KAYNAKLAR	44

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Cerrahi girişimler sonrası ortaya çıkan septik komplikasyonlar, yara yeri problemleri ve tümöral yayılım gibi sorunlara gerekçe olarak pek çok faktörün varlığı ortaya atılmış ve konak immün yanıtının da bu faktörler içinde önemli bir yere sahip olduğu öne sürülmüştür. Bu konuda yapılan araştırmalar, yalnızca cerrahi teknikteki ilerlemelerin yeterli olamayacağını, immün sistemi düzenleyerek, en optimal dengeyi kuracak yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekliliğini de ortaya koymuştur.

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren teknolojiadaki gelişmeleri takiben tıbbın pek çok alanındaki önemli atılımlara ek olarak insan bağışıklık sistemi hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edilmeye başlanmıştır. Cerrahi travmanın, peritoneal ve sistemik immün yanıt üzerindeki etkilerinin anlaşılması ile postoperatif komplikasyonların azaltılması güncel araştırma konuları haline gelmiştir. Cerrahi sonrası oluşan immün disregülasyonun hem hücrel ve humoral immünite, hem de sitokin dengesindeki değişikliklere bağlı olduğu gösterilmesine karşın akut bir hiperinflamasyon mu yoksa bunu baskılamak için oluşturulmuş bir immünsüpresyon mu olduğu halen araştırılmaktadır.

Laparoskopik cerrahinin gelişimi ile birlikte yalnızca hızlı iyileşme, daha az hastanede kalış süresi ve günlük aktivitelere erken dönüş gibi önemli avantajlar sağlanmakla kalmamış, son yıllarda moleküler anlamda yapılan çalışmalarla laparoskopinin, açık cerrahiye oranla daha az immüdisregülasyona sebep olduğu gösterilmiştir (1). Bu olumlu etkinin klinikteki yansımaları septik komplikasyon oranlarında azalma (2) ve tümör yayılımının dizginlenmesi (3) olarak karşımıza çıkabilmektedir.

İmmünolojik kaskadların iç içe geçmiş karmaşık yapısı, sitokinlerin çok yönlü etkileri, regülatör T (Treg) hücreleri gibi önceden varlığı bilinmeyen hücrel yapıların ortaya çıkması pek çok immünolojik olayın daha anlaşılabilir hale gelmesini sağlamıştır. Süregelen bu immün değişikliklerin

mekanizmalarını ortaya koymak ve bu değişiklikleri ortadan kaldırmayı hedefleyen tedavi stratejileri geliştirmek son yıllarda popöler araştırma konuları olmuştur.

Bizim çalışmamızın amacı, deneysel olarak pnömoperitonyum oluşturulmuş ratlarda önceden uygulanan beta-D glukon tedavisinin, peritoneal immün sistem ve sitokin yanıtı üzerine yarattığı etkileri incelemektir.

II. GENEL BİLGİLER

1. Periton ve Peritoneal İmmünite

Periton, batin iç duvarlarını ve batin içi organların dış yüzeylerini örten, düzgün yüzeyli, saydam seröz bir membrandır. Paryetal ve viseral olmak üzere iki yapraktan oluşur. Yaklaşık olarak vücut yüzeyi (yetişkinde) 1.8 m² kadardır. Periton zarının büyük bölümü su ve tuzların her iki yönde diffüzyonuna olanak sağlayan yarı geçirgen bir membran gibi davranır. Sıvı değişimine zıt olarak partiküllerin emilimi peritonun diyafragmatik yüzeyinden gerçekleşir (4).

Periton 2,5-3 µm kalınlığında, mikrovilli ile kaplı tek sıra mezotelyal hücrelerden oluşur (5). Mezotel hücreleri bir bazal membran yardımı ile altındaki subseröz bağ dokusundan ayrılır. Mezotel hücreleri arasında bulunan gözenekler partiküllerin bazal membran altında bulunan ve lakuna olarak adlandırılan özelleşmiş lenfatik damarlara doğru ilerlemesine olanak tanır (6). Peritonun paryetal ve viseral yaprakları birbirlerinden ince bir peritoneal sıvı ile ayrılır. Bu seröz sıvı iç organların birbirleri üzerinde sürtünmesiz kaymalarını sağlar ve normalde 100 ml seröz plazma ultrafiltratı içerir (7,8). Peritoneal sıvı barındırdığı hücresel mediatörlerin aktiviteleri aracılığı ile peritoneal hasar sonrası iyileşmede aktif rol oynar. Yaklaşık 300 hücre/mm³ içerir. Bu hücrelerin çoğunluğu makrofaj olmakla birlikte lenfosit, mast hücresi, PNL (polimorfonükleer lenfosit) ve deskuame olan mezotelyal hücrelerden oluşur (9).

Peritoneal makrofajlar çöpçü hücrelerdir ve peritoneal kavitenin lokal immün yanıtında temel rol oynarlar. Tümör nekroz faktör (TNF-α), interlökin (IL)-1, IL-6, IL-8, interferon (IFN), kompleman komponentleri ve oksijen radikalleri bu lokal immünitede makrofajlar tarafından salınan başlıca mediatörlerdir. Makrofajların salgıladığı bu mediatörler periton boşluğuna PNL göçünü tetikler.

Mezotel hücreleri bazal membrana zayıf bir şekilde bağlıdır ve hafif bir travmada dökülürler (10). Peritondaki mezotelyal hücreler in vitro olarak stimüle edildiklerinde IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve transforming growth faktör (TGF)- β sekrete ederler (11,12).

Peritoneal savunma mekanizmaları içerisinde omentumun özel bir yeri vardır. Pasif hareket yeteneği, adezyon, hemostaz sağlayıcı, yabancı cisim enkapsülasyonu gibi özellikleri ile peritoneal savunmanın en önemli bileşenidir (13). Fischer, omentumu abdomenin immün fabrikası olarak tanımlamıştır (14). Omental mezotel içinde çapları 1-10 mikron arasında değişen açıklıklar vardır. Bunlar glomus benzeri kapiller yapıların merkezlerine ulaşır. “*Milky spot*” adı verilen bu yapıların içinde stroma hücreleri, makrofajlar, lenfositler ve dentritik hücreler yer alır. Milky spotların mononükleer fagositik sistem hücrelerinin proliferasyonu için uygun bir mikroçevre olduğu bildirilmiştir (15). Milky spotlar, periferik bir lenfoid organ gibi çalışarak fagositoz, antikor üretimi, abdominal kavitenin temizliği, tümör hücrelerinin tutulması, bakteri gibi yabancı cisimlerin selektif depolanması görevlerini üstlenmiştir (16). Omentektomi yapılan sıçanlarda peritoneal kemotaktik aktivitenin ve peritoneal makrofaj sayısında belirgin azalmanın olması, omentumun peritoneal savunma mekanizmaları içindeki önemini göstermektedir (17).

2- İmmün Sistemin Temel Bileşenleri:

İmmün yanıt, antijene veya herhangi bir uyarana verilen innate (doğal immün yanıt ve uyarı devam eder yahut da tekrar ederse kazanılmış immün yanıt şeklinde forme olur. Doğal immün yanıtın temel elemanları makrofaj, nötrofil gibi fagositer hücreler, NK hücreleri ve bunun yanında bazı sıvısal faktörlerdir. Bu cevap aslında kazanılmış immün sistemin elemanı olan lenfosit hücreleri ile çok sıkı ilişkidir. İlk yanıt esnasında bu hücrelerden açığa çıkan pro-inflamatuvar sitokinlerin (örneğin IL-2, IFN- γ gibi) lenfositleri uyardığı, çoğalmaya ve farklılaşmaya yönlendirdiği bilinmektedir. Lenfositik hücrelerin temel komponenti T hücreleridir. Dolaşımdaki total lenfosit havuzunun % 60 – 80 kadarını T hücreleri oluşturur. T hücrelerinde başlıca

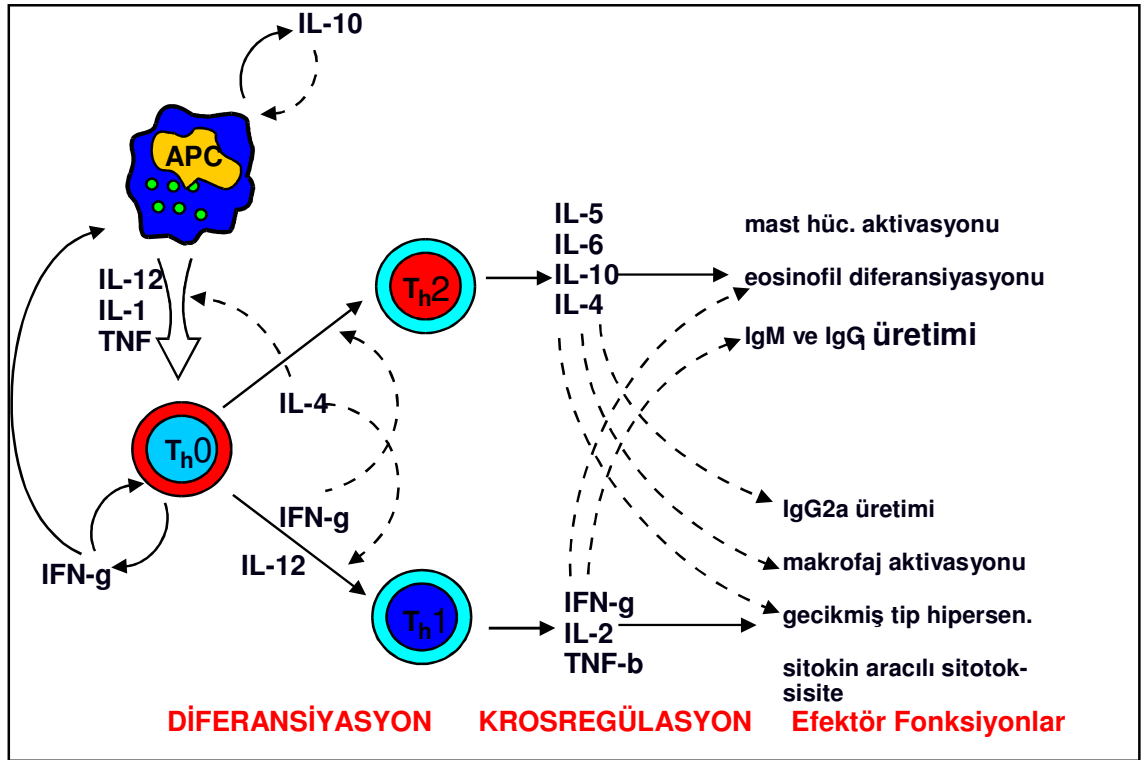
CD4 ve CD8 olmak üzere pek çok yüzey farklılaşma molekülü vardır. Periferik kandaki T hücrelerinin üçte ikisi CD4, üçte biri CD8 yüzey molekülü taşıyan lenfositlerdir. CD4 yüzey molekülü taşıyan subpopülasyon, sitotoksik ve süpresör T hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı T hücrelerini kapsar. CD8 yüzey molekülü taşıyan popülasyon ise antikor yapımını inhibe eden süpresör T hücrelerini ve sitotoksik fonksiyon yapan efektör T hücrelerini kapsar (18).

2.A. CD4⁺ T Hücreleri

Kandaki lenfositlerin %35-60 kadarını oluştururlar. Diğer T hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı olmalarından dolayı *T helper (Th)* hücreler olarak da adlandırılırlar. Başlangıçta Th hücreler fonksiyonel ve belki de anatomik olarak 3 alt gruba ayrılmıştır. Bunlar da Th₀, Th₁ ve Th₂ subgruplar olarak isimlendirilmiştir. Mosmann ve ark 1986 yılında fareler üzerinde, ürettikleri sitokinlere göre Th hücreleri 2 subgruba ayırmış ve daha sonra bu subgrupların insanda da varolduğu görülmüştür. Bu fonksiyonel farklılaşma bu altgrupların salgıladıkları farklı sitokinlerle saptanabilmektedir. Th₀ grubu, IL-2 sentezleyebilen naif CD4⁺ T hücreleri ihtiva eden bir havuzdur. Gelen immün cevaplara göre Th1 ve Th2 fenotipine farklılaşırlar (19). Th₁ hücreler, IL-2, IL-12, IFN- γ ve TNF- β , buna karşın Th₂ subgrup hücreler ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sentez etmektedirler (20). Th1 ve Th2 fonksiyon farklılığı önceden belirlenemez ve farklılaşma gelecek olan sinyallere bağlıdır ve sitokinlerin sıkı kontrolü altındadır (21). Th1 hücrelerin asıl fonksiyonu, sitokinler aracılığı ile makrofajların fagositoz ve mikrop öldürme yeteneklerini arttırarak enfeksiyonlara karşı savunmayı oluşturmaktır. Th1 hücreler makrofaj aktivasyonunu IFN- γ salgılayarak yapar. Aktive olarak fagositoza başlayan makrofajlardan sentezlenen IL-12, naif CD4⁺ T hücrelerin Th1'e farklılaşmasını ve IFN- γ sentezini arttırır. Ayrıca Th1 hücreler CD8⁺ T hücrelerin aktif sitotoksik T hücrelere farklılaşmasına ve B-lenfositlerin antijen sunan hücrelere dönüşmesinde yardımcı olur. Th2 hücreler ise, B hücrelerini IgM, IgG ve IgE sentezine yöneltir, Th1 üzerinde oluşturduğu

baskılayıcı etki ilede akut ve kronik inflamasyonu ve geç tip aşırı duyarlılığı inhibe ederler. Sonuç itibariyle Th1 hücreler, hücrel immün cevabın; Th2 hücreler ise humöral immün cevabın oluşmasında etkin rol oynar (şekil1).

Th hücrelerindeki bu ayrım bir çok hastalıkta ortaya çıkan immünopatogenezi anlamaya yardımcı olsa da tam anlamı ile yeterli olamamıştır. Bu nedenle araştırmalar devam etmiş, antijenik uyarı sonrası ortaya çıkan başkaca bir hücre tipi tanımlanmıştır. Bu hücrelerin IL-10 ve TGF- β salgıladıkları ve genel olarak immünsüpressor/immünregülatör olarak görev yaptıkları gösterilmiştir. Başlangıçta Th3 olarak adlandırılan bu hücrelerin CD4 molekülü yanında CD25 molekülünü de eksprese ettiği belirlenmiştir. İmmünoregülatuar etkilerinden dolayı bu Th subpopulasyonu daha sonra Treg adını almıştır (22).



Şekil-1: Th (yardımcı) hücreleri, salgıladıkları sitokinler ve krossregülasyon

(Düz çizgi ile çizilen oklar stimülatör etkiyi, aralıklı çizgi ile çizilen oklar ise inhibitör etkiyi temsil etmektedir. APC= Antijen sunan hücre).

2.B. CD8⁺ T Hücreler

Bu grupta süpresör T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri yer almaktadır. İmmün aktivasyon sonrası özellikle endojen antijen yahut da virüsler gibi yine endojen benzeri davranan antijenlere Th1 yardımı ile CD8⁺ T hücrelerce yanıt verilir. Eğer ortamda inflamatuvar prosesin devamını gerektiren bir durum yoksa Treg hücreleri ve belki de Th2 hücrelerince salgılanan IL-10 ve TGF- β gibi regülatuvar sitokinlerle Th1 aktivasyonu kısıtlanır. Bunun sonucunda CD8⁺ T hücre cevabı aşağıya çekilir ve homeostaz sağlanır.

2.C. Regülatör T Hücreler (Treg)

Bu hücreler CD4⁺ CD25⁺ T hücreleri olarak bilinirler. Treg hücrelerin keşfi ile hücre aracılı süpresyon, self tolerans ve adaptif immün yanıtın regülasyon ile ilgili önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (23,24). Periferal kanda CD4⁺ T hücrelerin yaklaşık % 5-10'unu oluştururlar. İn vitro çalışmalarda Treg hücrelerin şu önemli özellikleri gözlenmiştir (25,26):

- 1- Treg hücreler doz bağımlı olarak naif T hücrelerin IL-2 üretimini ve proliferasyonunu süprese eder
- 2- Hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücreler süprese olur
- 3- Treg hücrelerin süpresör kapasitesini eksojen IL-2 ilavesi ile önlemek mümkündür
- 4- Treg hücreler süpresör etkinlik için antijen spesifik olarak aktive edilirler ancak kendi inhibitör etkilerini antijen non-spesifik yol ile gösterirler.

Regülatör T hücreler TGF- β ve IL-10 sentezleyerek efektör Th1 üzerinde inhibisyon etkisine sahiptir. Ayrıca doğrudan naif T hücre üzerinden de inhibisyona neden olabilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada TGF- β 'nın periferal CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerin süpresör fonksiyonlarında ve Foxp3 ekspresyonunda önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (27). Böylece Treg ve diğer kaynaklı olabilen TGF- β 'nın Treg'leri fonksiyonel olarak uyardığı gösterilmiştir.

2.D. Sitokinler

Sitokinler hücreler arası mesaj ileten peptid ya da glikoprotein yapısında solubl biyolojik mediyatörler olup immün ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliğini artırırlar (28). Aktive olmuş lenfositler, monositler, makrofajlar ve diğer bazı hücreler tarafından üretilmekte ve sekrete edilmektedirler. Antijen için spesifik olmamakla birlikte oluşmaları ve hedef hücreleri etkilemeleri için antijenik stimülasyona ihtiyaç duyarlar.

Sitokinler genellikle sekrete edildikleri bölgede etkili olmakla beraber endokrin etkileri de mevcuttur. Otokrin ve parakrin etkileri muhtemelen çeşitli inhibitör ve antagonistik faktörlerle modüle edilebilir. Sitokinler hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yüksek affinite ile bağlanırlar ve hücre içine fonksiyonel sinyal gönderirler (29).

Sitokinler, genel olarak birbiri ile ilişkili, başlıca 5 doğrultuda etkinlik gösterebilirler:

- 1- Lenfoid hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını sağlamak,
- 2- İmmün cevabı şiddetlendirmek veya baskılamak süreti ile regüle etmek,
- 3- Enflamasyon olaylarına katılan hücreleri aktive etmek, reaksiyon yerine toplayarak orada tutmak, çeşitli biyolojik etkinlikler göstermek,
- 4- Kemik iliğine etki ile hemopoetik regülasyona katılmak,
- 5- Bazı hipofiz hormonlarının ve diğer biyolojik maddelerin sentez ve salınmalarına neden olmak (30).

Sitokinler, bir kompleks ağ oluşturup inflamatuvar cevabın regülasyonu ve organ fonksiyonlarının homeostazisinde görev yaparlar.

IL-4 :

Th2 tarafından sentez edilen 20 kD ağırlığında bir sitokin olup allerjik reaksiyonların regülasyonlarından sorumludur. Aktive mast hücreleri, bazofiller ve bazı CD8⁺ T hücreleri de IL-4 sentez edebilirler. Makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve IFN- γ 'nın makrofajlar üzerine olan etkilerin

çoğunu inhibe eder. T hücrelerinin özellikle Th2 hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasını sağlar (31,32).

IL-10 :

18 kD ağırlığında Th2 ve Treg ürünü olan bir sitokindir. Bazı Th1 hücreler, aktive makrofajlar ve bazı non-lenfositik hücre tipleri (keratinositler) tarafından üretilir. İki major aktivitesi olup makrofajlar tarafından TNF, IL-1, IL-12 sentezini inhibe eder ve T hücre aktivasyonunda makrofajların yardımcı rollerini süprese eder. Th1 proliferasyonunu baskılar. IL-2 ve IFN- γ sentezini inhibe eder (31,32).

IL-12

35 - 40 kD ağırlığında, heterodimer yapıda ve temel olarak aktive makrofaj ve nötrofillerden sentezlenen bir sitokindir. Enfeksiyonda en erken sentez edilen pro-inflamatuar sitokinlerden biridir. Th2 hücreleri inhibisyona uğrattırken Th1 hücreleri stimüle eder. IL-8 ve IFN- γ sentezini indükler. Sitotoksik T hücre cevabını, Naturel Killer (NK) hücrelerinin proliferasyon ve aktivasyonunu stimüle eder (31,32).

IFN- γ

20-25 kD ağırlığındadır ve CD8⁺ T hücreleri, Th1 hücreleri, NK hücreleri ile aktive makrofajlardan salınır. Başlıca fonksiyonları arasında, Th1 ve NK hücre stimülasyonu, Th2 inhibisyonu, makrofaj aktivasyonu, CD8⁺ T hücre aktivasyonu yer alır. B hücrelerinin farklılaşmasını ve yüzey reseptörlerinin ekspresyonunu sağlar. Ayrıca; süperoksit ve NO sentezini artırır (31,32).

TGF- β :

25 kD ağırlığında bir homodimerik polipeptiddir. Çok geniş biyolojik etkileri olup, hücre büyümesi ve farklılaşmasındaki rolleri son yıllarda gösterilmiştir ve bu etki hücre tipine bağlı olarak oluşmaktadır (33,34). TGF- β 1 ilk olarak normal fibroblast büyümesini indükleyen bir protein olarak tarif edilmiş,

ancak; bugün birçok epitelyal ve immün hücre için inhibitör etkisi olduğu saptanmıştır (35). TGF- β 1 etkisini membran reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirir. Üç adet hücre reseptör proteini tesbit edilmiş olup, bunlar yüksek affinitelerine göre sırayla:

- Tip-1 (55 kD)
- Tip-2 (80 kD)
- Tip-3 (280 kD)

Tip-2' nin muhtemelen tip-1 ile beraber büyümenin inhibisyonunda sinyal iletiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

TGF- β 1, tüm immün hücreler tarafından eksprese edilir ve stres ve hastalığa yanıtta akut regülasyona uğrayan izoformudur (36). İnflamatuar yanıtın akut fazında peritoneal makrofajlar ve/veya mezotelyal hücreler TGF- β 1 üretirler (12). T lenfositlerin proliferasyonu ve efektör fonksiyonlarını, makrofaj fonksiyolarını ve B-lenfosit proliferasyonunu inhibe eder. TGF- β 'nın önemli bir kaynağı da regülatör T hücreleridir (37).

TGF- β 1' in çok yüksek konsantrasyonlara çıktığında çeşitli fibrojenik bozuklukların gelişiminde anahtar bir faktör olduğu bilinmektedir (38). TGF- β 1 hem in-vitro hem in-vivo ekstrasellüler matriks protein sentezini arttırmaktadır (38,39). Aynı zamanda TGF- β 1 matriks yıkımını bloke eder ve hücre yüzeyindeki integrinlerin relatif oranlarını değiştirerek matrikse hücre adezyonunu artırır (40). Süreklilik arz eden doku zedelenmesi veya TGF- β 1 regülasyonunda düzensizlik fibrozise sebep olabilir.

3. Cerrahi Travmaya Peritonun İmmün Yanıtı

İnflamasyon, hasara karşı koruyucu erken bir homeostatik immün yanıttır. Proinflamatuar mediatör kaskadı hücrel ve humoral immün mekanizmaların aktivasyonu ile karakterizedir (18,19). Cerrahi yalnızca intestinal inflammatuar yanıt oluşturmakla kalmaz aynı zamanda oluşan travma, intraperitoneal ve sistemik immün yanıtı da tetikler. Periton, peritoneal kavitedeki lökosit ortamını, lokal sitokin ve kemokin üretimi ile düzenler (20,21). Cerrahi sonrası peritoneal konak yanıtının ilk basamağında

anahtar hücreler, makrofajlar, nötrofillerdir ve lenfositlerdir. Abdominal cerrahi, yaygın inflamasyonun yokluğunda hızlı ve geçici bir polimorfonükleer hücre artışına neden olur ve bunu makrofaj artışı izler. Makrofajlar lokal immüniteyi IL-6, TNF- α ve oksijen radikalleri gibi mediatörler yardımı ile regüle ederler. Peritoneal inflamasyona yanıt olarak oluşan hücresel infiltrasyonun kinetikleri genel hatları ile şu şekildedir:

- Hasara uğrayan peritonda en erken görülen hücreler, travmayı takiben 1-2 saat içinde göçe başlayan polimorfonükleer nötrofillerdir ve 1-2 gün boyunca aktif konumda kalırlar.
- Monositlerin ortama göçü ve makrofajlara diferansiyasyonu (22).
- 3. günde mezotelyal hücreler hasar olan bölgedeki makrofajların etrafını çevrelemeye başlar (23).
- 4-7. günler arasında peritoneal yüzeydeki dominant hücreler mezotel hücreleridir.
- Postoperatif 5. günün sonunda peritoneal sıvı içerisindeki ana hücreler makrofajlar olur.

Artan inflamatuvar yanıt negatif feedback mekanizmaları üzerinden paradoksal olarak immünsüpresyona neden olabilmektedir (24). Yapılan pek çok in vitro çalışmada postoperatif dönemde makrofajların fagositoz potansiyelinin azaldığı (25), peritoneal nötrofiller tarafından yapılan fagositozun azaldığı (26), makrofajlardaki HLA (insan lökosit antijeni) ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak CD4⁺ T hücrelerin antijen spesifik yanıtının azaldığı (27) gösterilmiştir.

Cerrahi sonrası peritoneal sıvıdaki sitokin düzeylerinde değişiklik olur. Genellikle pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin düzeylerinde artış söz konusudur. Buna karşın plazmadaki sitokin düzeylerinin cerrahiye takip eden birkaç gün boyunca düşük düzeylerde olması, bu mediatörlerin lokal olarak periton tarafından üretildiği ve buradan sistemik dolaşıma geçtiği düşünülmektedir (28). Ayrıca IL-1, IL-6, IL-8, gibi pek çok sitokinin laparotomi sonrası ilk birkaç saat içindeki temel kaynağının periton olduğu gen ve protein düzeyindeki çalışmalarda gösterilmiştir (28,29). Ayrıca IL10, IL-12, IFN- γ düzeylerindeki değişiklikler hücresel immün yanıt üzerinde etkilidir.

Erken postoperatif dönemde pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinin kontrolsüz yükselmesine hücrel immünitenin aşırı reaktiviteyi engellemek amacıyla süprese olması eşlik eder (30).

Cerrahi sonrasında periferik CD4/CD8 oranının belirgin oranda değiştiği gösterilmiştir. Burada CD4⁺ hücreler azalırken CD8⁺ hücrelerde artma olmaktadır (31).

4. Pnömoeritonyum ve İmmün Yanıt

1901'de Kelling ile başlayan laparoskopi serüveni 1980'lerde videolaparoskopinin geliştirilmesi ile yeni bir döneme girmiş ve 1987'de Mouret'in ilk başarılı laparoskopik kolesistektomiyi rapor etmesi ile farklı bir boyut kazanmıştır. 1990'larda laparoskopiye artan ilgi ve tekniğin cerrahlar tarafından geliştirilmesi ile pek çok operasyon rutine girmiştir. Günümüzde artık onkolojik cerrahinin de içinde bulunduğu birçok alanda laparoskopik girişimler popüler hale gelmiştir.

Laparoskopik cerrahinin hastanede kısa yatış süresi, azalmış postoperatif ağrı, normal günlük aktivitelere erken dönüş ve kozmetik sonuçlar açısından açık cerrahiye üstünlüğü olduğu bilinmektedir (32). Daha az invaziv olması nedeniyle organ ve dokulara daha az travmaya sebep olduğu kabul edilmiştir (32).

Laparoskopinin uygulanabilmesi için gerekli olan çalışma alanı karın içine uygulanan pnömoeritonyum ile sağlanır. Veres iğnesi ile periton boşluğuna girildikten sonra 12-14 mmHg basınç oluşturacak şekilde gaz insufle edilir. Tekniğin gelişim süreci içinde pnömoeritonyum oluşturmak için hava, nitrojen, helyum, argon ve karbondioksit gibi pek çok gaz denenmiş ve yanıcı olmaması, çözünürlüğünün yüksek olması ve ucuz olması nedeniyle karbondioksit kabul gören tercih olmuştur (33).

Laparoskopinin ve dolayısıyla pnömoeritonyumun neden olduğu cerrahi travmanın konvansiyonel cerrahiye oranla daha az olması, oluşacak immün değişikliklerin de daha az olacağı düşüncesini doğurmuştur. Yapılan in vitro ve iv vivo çalışmalar göstermiştir ki; laparoskopik cerrahi peritoneal ve

sistemik immün sistemi konvansiyonel cerrahiye oranla daha az baskılamaktadır (1,34, 35).

Pnömoperitonyumun; monositlerden TNF ve süperoksit iyon salınımı (36), T lenfosit ve natural killer (NK) fonksiyonları (37,38), makrofaj ekspresyonu ve fonksiyonlarını (39) açık cerrahiye oranla daha iyi koruduğu bildirilmiştir. Tüm bunların yanında pnömoperitonyumun oluşturulduğu gazların fiziksel ve metabolik etkileri, gazların nem ve sıcaklıklarına bağlı etkiler ayrı ayrı çalışma konusu olmuştur.

5. Beta-Glukan

Beta-glukan, ekmek mayasında, tahılda ve mantarlarda bulunan, hücre duvarının yapısında yer alan fiber formda bir polisakkarittir (63). Doğal mayada ve mantarlarda temel olarak β -1,3 glukan veya β -1,6 glukan olarak bulunur. Glukan, 6,5 kD moleküler ağırlığa sahip, zimosandan elde edilen bir β -1,3 linked glukopironaz polisakkarittir ve makrofaj/monosit hücre serilerinin potent aktivatörü ve retiküloendotelyal sistemde pek çok stimülator etkiden sorumlu olduğu gösterilmiştir (64). Ticari olarak kullanılan beta-glukan ekstresi genellikle ekmek mayasından yani "*Saccharomyces cerevisiae*" 'den elde edilir (65). Pillemer and Ecker zimosan adı verilen ve "*Saccharomyces cerevisiae*" duvarından elde edilen beta-glukanın deneysel olarak hayvanlara uygulandığında retiküloendotelyal sistemde hiperplazi ve hiperfonksiyona neden olduğunu göstermişlerdir (66). Bunun dışında *Phellinus linteus* veya *Sparassis crispa* gibi mantarlardan elde edilen pek çok beta-glukan preparatı mevcuttur. Değişik moleküler ağırlıklara ve kimyasal varyasyonlara bağlı olarak etkilerinin değişik düzeylerde olduğu bildirilmekle birlikte, beta-glukanın temel etkileri şu şekilde sıralanabilir:

- 1- İmmunmodülasyon
- 2- Antikarsinojenik etkiler
- 3- Lipid düşürücü etkiler
- 4- Kan şekeri düşürücü etkiler

Beta-glukanın in vivo uygulanması ile çeşitli infeksiyonlara ve tümör gelişimine karşı konak yanıtında bir artış bildirilmiştir (67,68). Bunun üzerine

yapılan pek çok klinik çalışmada tümör immünoterapisi ve cerrahi sonrası infeksiyonların önlenmesinde beta-glukan olumlu sonuçlar vermiştir.

Farklı beta-glukanların farklı etkilere sahip olmasında molekül ağırlıklarının ve dallanma yapılarının etkin olduğu öne sürülmesine rağmen henüz tam olarak açıklanamamıştır. İn vitro çalışmalarda büyük moleküler ağırlıklı veya partiküllü beta-glukanların lökositlerin fagositik, sitotoksik aktivitelerini arttırarak reaktif oksijen ve nitrojen aracılı antimikrobiyal aktivitelerini arttırdığı ve direk olarak lökositleri aktif hale getirdiği ve ayrıca IL-8, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinleri stimüle ettikleri gösterilmiştir (69).

Hücrel beta-glukan reseptörleri makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve NK hücrelerinde saptanmıştır. Bu hücrelerdeki beta-glukan reseptörleri çoğuldur ve CR3, Dectin-1 ve laktosilseramid bunların başlıcalarıdır (70). Bu reseptörler içinde en önemlisi Dectin-1'dir. Dectin-1'in solubl ve parçalı beta-glukanlar için makrofajlar üzerindeki majör reseptör olduğu gösterilmiştir (71). Ayrıca yakın zamanda Dectin-1'in beta-glukan ile oluşan proinflamatuvar sitokin üretimi ve hücrel immün yanıtı aracılık ettiği saptanmıştır (72).

III. GEREÇ ve YÖNTEM

1. Grupların Tanımlanması

Çalışmamızda Ege Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında yetiştirilen, National Institutes of Health Publication Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIHPGC)'a uygun olarak 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusunda, standart rat yemi ve su ile beslenen 28 adet erişkin, dişi rat (200-250 g, Wistar-Albino) kullanıldı.

Deneyler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi'nin kılavuzlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'nın desteği ile ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı alınarak yapıldı.

Deneye başlamadan önce toplam 28 rat, 3 gruba rastgele örnekleme yöntemi ile dağıtıldı.

- **Sham grubu**: 9 rattan oluşturuldu. 1cc/oral/gün serum fizyolojik verildi. Herhangi bir cerrahi girişim yapılmaksızın yalnızca peritoneal lavaj ile örnek alındı.
- **Kontrol grubu**: 9 rattan oluşturuldu. Pnömoperitoyum oluşturularak 1cc/oral/gün serum fizyolojik verildi.
- **Beta-glukan grubu**: 10 rattan oluşturuldu. Pnömoperitonyum yapılmadan önceki 7 gün süresince 100mg/kg/gün beta-glukan beslenme tüpü aracılığı ile gavaj şeklinde verildi.

2. Yöntem

Beta-glukan grubundaki ratlara pnömoperitonyum öncesi 7 gün süreyle 100 mg/kg beta-glukan (İmmuneks®, Mustafa Nevzat İlaç San., Türkiye) gavaj yöntemi ile uygulandı.

Kontrol ve beta-glukan grubundaki ratlara ketamin 30 mg/kg i.m ve xylazin 5 mg/kg i.m ile anestezi uygulandı. Dört ekstremitelerinden kesim tahtasına tesbit edilen ratların karın ön duvarları traş edildikten sonra % 70'lik etil alkol ile temizlendi. İki adet 20G intraket ile karında orta hattın alt bölümünden periton boşluğuna girildi. İntraketlere bağlanan manometre yardımı ile karın 10 mmHg basınca ulaşana dek şişirildi (resim1).



Resim.1

Basınç sabit olacak şekilde 30 dk. süreyle pnömoperitonyum oluşturulduktan sonra manometre ayrıldı ve karındaki hava boşaltıldı. Pnömoperitonyum oluşturulduktan 24 saat sonra tüm ratlara ketamin 30 mg/kg i.m ve xylazin 5 mg/kg i.m ile anestezi uygulandı. Karın ön duvarı % 70'lik alkol ile silindi. 20 G branül ile karın ön duvarından periton boşluğuna girilerek, Celal Bayar Üniversitesi Biyokimya A.D laboratuvarında hazırlanan, pH 7.4 olan 10 ml phospate buffered salin (PBS) karın içine verildi. 5 dakika süreyle yumuşak bir şekilde karın masajı uygulandıktan sonra enjektör yardımı ile peritoneal sıvı aspire edildi. Alınan peritoneal lavaj sıvısı normal cam tüplere konularak 1600 devir/dk olacak şekilde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant eppendorf tüplerine ayrılarak sitokin analizi için -20°C'de muhafaza edildi. Tüpte kalan hücreden zengin çökelti flowsitometrik değerlendirme için 1 saat içerisinde immünoloji laboratuvarına gönderildi.

Flowsitometrik (akım sitometrisi) Ölçüm

Akım sitometrisi çok sayıdaki hücrenin hızlı ve biyokimyasal ve fiziksel özelliklerin kantitatif olarak değerlendirilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Akım sitometrisinde süspansiyon halindeki işaretli hücreler ve partiküller basınç altında akış kabinine getirilirler ve buradan tek sıra halinde geçerlerken laser ışığının altında görünür hale gelirler. Akım sitometrisinde 4 fotodedektör vardır:

- 1- Forward Angle Light Scatter (FALS)
- 2- Right Angle Light Scatter (RALS)
- 3- Yeşil Floresan
- 4- Kırmızı Floresan

FALS önden saçılımı sağlar ve hücre boyutunu gösterir. RALS ise yandan saçılımı sağlar ve iç yapıyı yani granülariteyi gösterir. İşaretlemede kullanılan çeşitli emisyonlardaki problemlerle multiparametrik analizler yapılabilir. Yeşil floresan veren Fluorescein Isothiocyanate (FITC) ve kırmızı floresan veren Phicoerythrin (PE) ile işaretli antikorlar kullanılması iki farklı parametrenin aynı anda tayinine olanak sağlar (73).

Bizim çalışmamızdaki flowsitometrik değerlendirme, Ege Üniversitesi İmmünoloji ve Allerji Laboratuvarı tarafından gerçekleştirildi. Sonuçlar Celal Bayar Üniversitesi İmmünoloji BD'dan bir öğretim üyesi tarafından yorumlandı.

- 1.tüpe 50 µl peritoneal sıvı çökeltisi konulduktan sonra 5 µl CD4 FITC (ürün kodu: MR5204, Caltag Laboratories, USA) ve 10 µl CD25 PE (ürün kodu:MR6104, Caltag Laboratories,USA) eklendi.
- 2. tüpe 50 µl örnek konulduktan sonra 5 µl CD8 PE (ürün kodu:MR5101, Caltag Laboratories,USA) eklendi.

Örnekler BD FACS Calibur (USA) flowsitometri cihazı ile çalışıldı ve sonuçlar elde edilen histogramlar üzerinden hücrelerin oranları hesaplanarak değerlendirildi. Gruplardaki her rat için ayrı ayrı oluşturulan histogramlar kullanıldı.

TGF-β Tayini

Peritoneal yıkama sıvısında TGF-β düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (BioSource Europe SA. Nivelles, Belgium, Katalog No: KAC1688/KAC1689). Kitin analitik sensitivitesi 15.6 pg/mL; ölçüm içi değişkenlik katsayısı (intraassay coefficient of variation) (%CV) değeri 183.9 pg/mL için %5.5; 1537 pg/mL için %6.2 olarak bildirilmiştir.

IFN-γ Tayini

IFN-γ düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (BioSource Europe SA. Nivelles, Belgium, Katalog No: KRC4021). Kitin analitik sensitivitesi <13 pg/mL; ölçüm içi değişkenlik katsayısı (%CV) değeri 140 pg/mL için %4.3; 1255 pg/mL için %4.0 olarak bildirilmiştir.

IL- 4, IL-10, IL-12 Tayini

IL-4, IL-10, IL-12 düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (BioSource Europe SA. Nivelles, Belgium, Sırası ile Katalog No: KRC0041, KHC0101, KRC0122). Kitlerin analitik sensitivitei sırası ile <2 pg/mL; <1.0 pg/mL ve <3 pg/mL, kitlerin ölçüm içi değişkenlik katsayıları ise sırası ile %6,5; %4,8 ve %4,5 olarak bildirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows 10.0 sürümü kullanıldı. Gruplar arası değerlerin karşılaştırılması için Student-T testi kullanıldı. $p<0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

1. Hücresel Yanıt

Flowsitometrik olarak sayılan peritoneal hücrelerin lenfosit kapılaması sonucu elde edilen sonuçlara göre:

Sham grubundaki, ortalama $CD4^+$ T lenfosit, $CD8^+$ T lenfosit, $CD4^+CD25^+$ T lenfosit (Treg) oranları ve $CD4/CD8$ T lenfosit oranları sırasıyla % 50.55 ± 2.61 ; % 46.03 ± 3.11 ; % 2.75 ± 0.59 ve 1.19 ± 0.18 idi (örnek histogram bkz resim 2 ve 3).

Kontrol grubundaki ortalama $CD4^+$ T lenfosit, $CD8^+$ T lenfosit, $CD4^+CD25^+$ T lenfosit (Treg) oranları ve $CD4/CD8$ T lenfosit oranları sırasıyla % 46.92 ± 2.82 , % 44.37 ± 2.38 , % 5.06 ± 0.66 ve 1.10 ± 0.13 idi (örnek histogram bkz. Resim 4 ve 5).

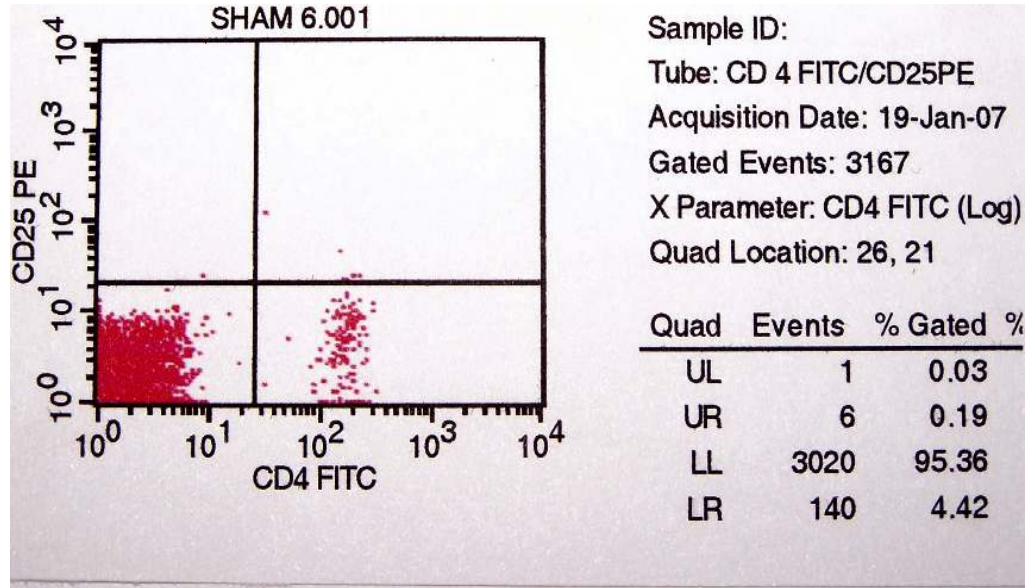
Beta-glukan grubundaki ortalama $CD4^+$ T lenfosit, $CD8^+$ T lenfosit, $CD4^+CD25^+$ T lenfosit (Treg) oranları ve $CD4/CD8$ T lenfosit oranları sırasıyla % 36.76 ± 4.70 , % 53.42 ± 4.53 , % 9.01 ± 1.59 ve 0.79 ± 0.14 idi (örnek histogram bkz. Resim 6 ve 7).

Tüm gruplardaki hücre oranları tablo1'de özetlenmiştir.

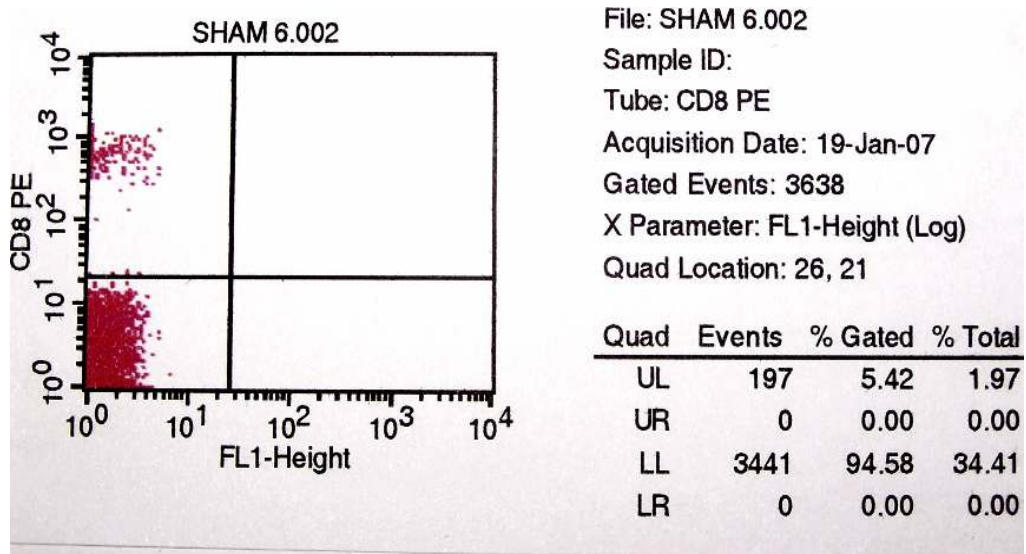
Tablo1. Ortalama T lenfosit yüzdeleri ve $CD4^+$ / $CD8^+$ T lenfosit oranlarının gruplara dağılımı

	Sham (n=9) Mean $\pm$ S.E.M*	Kontrol (n=9) Mean $\pm$ S.E.M*	Beta-Glukan (n=10) Mean $\pm$ S.E.M*
$CD4^+$ T lenfosit (%)	50.55 $\pm$ 2.61	46.92 $\pm$ 2.82	36.76 $\pm$ 4.70
$CD8^+$ T lenfosit (%)	46.03 $\pm$ 3.11	44.37 $\pm$ 2.38	53.42 $\pm$ 4.53
$CD4^+$ $CD25^+$ T lenf (Treg) (%)	2.75 $\pm$ 0.59	5.06 $\pm$ 0.66	9.01 $\pm$ 1.59
$CD4^+/CD8^+$ T lenfosit oranı	1.19 $\pm$ 0.18	1.10 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.14

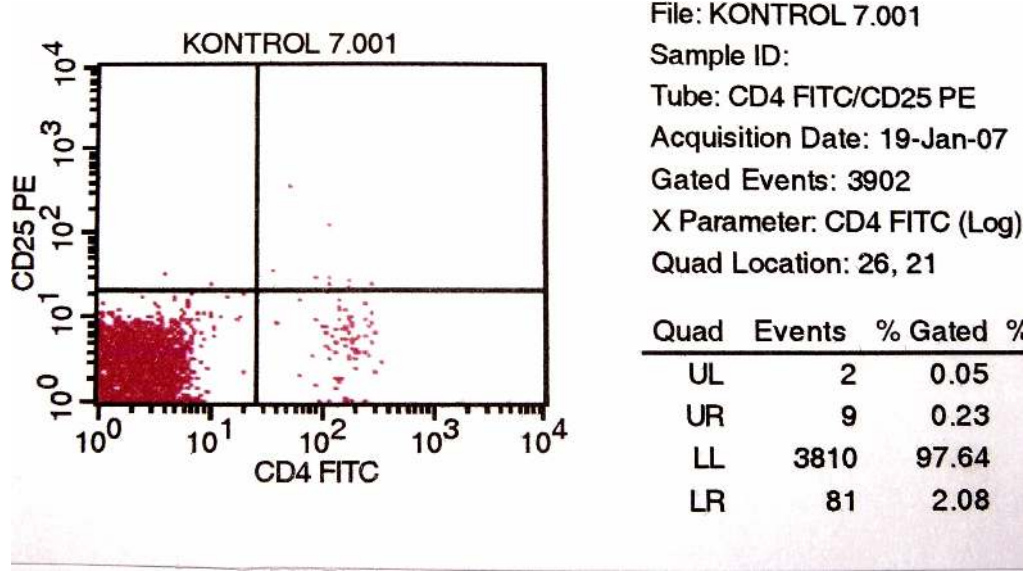
*S.E.M: standart error of mean (ortalamanın standart hatası)



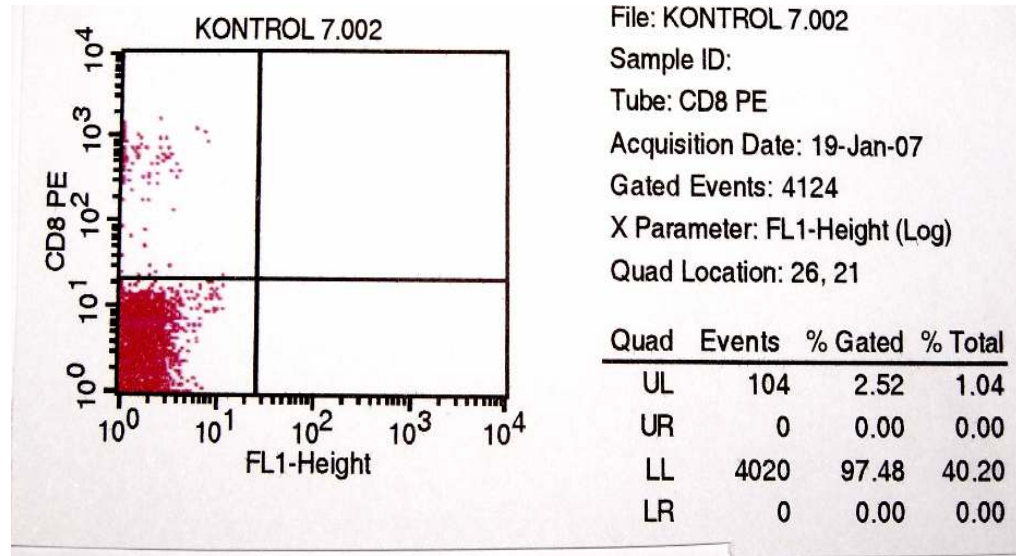
Resim 2. Sham grubuna ait CD4 ve CD25 için örnek histogram



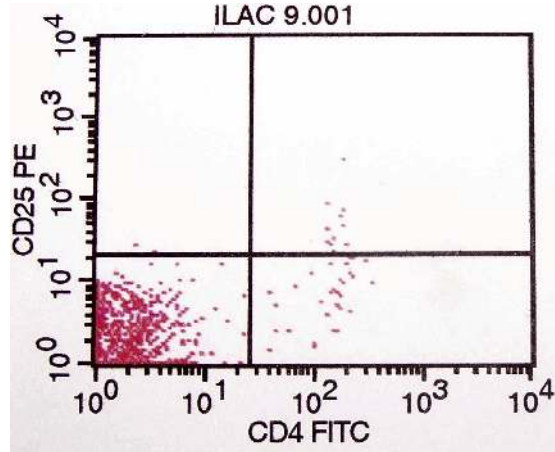
Resim 3. Sham grubuna ait CD 8 için örnek histogram



Resim 4. Kontrol grubuna ait CD4 ve CD 25 için örnek histogram



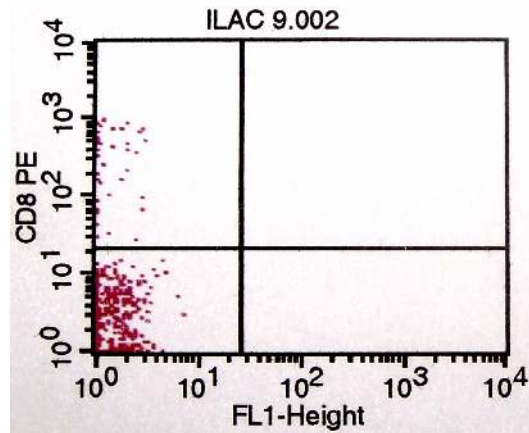
Resim 5. Kontrol grubuna ait CD8 için örnek histogram



Sample ID:
 Tube: CD4FITC/CD25 PE
 Acquisition Date: 19-Jan-07
 Gated Events: 875
 X Parameter: CD4 FITC (Log)
 Quad Location: 26, 21

Quad	Events	% Gated	%
UL	2	0.23	
UR	11	1.26	
LL	831	94.97	
LR	31	3.54	

Resim 6. Beta-glukan grubuna ait CD4 ve CD 25 için örnek histogram

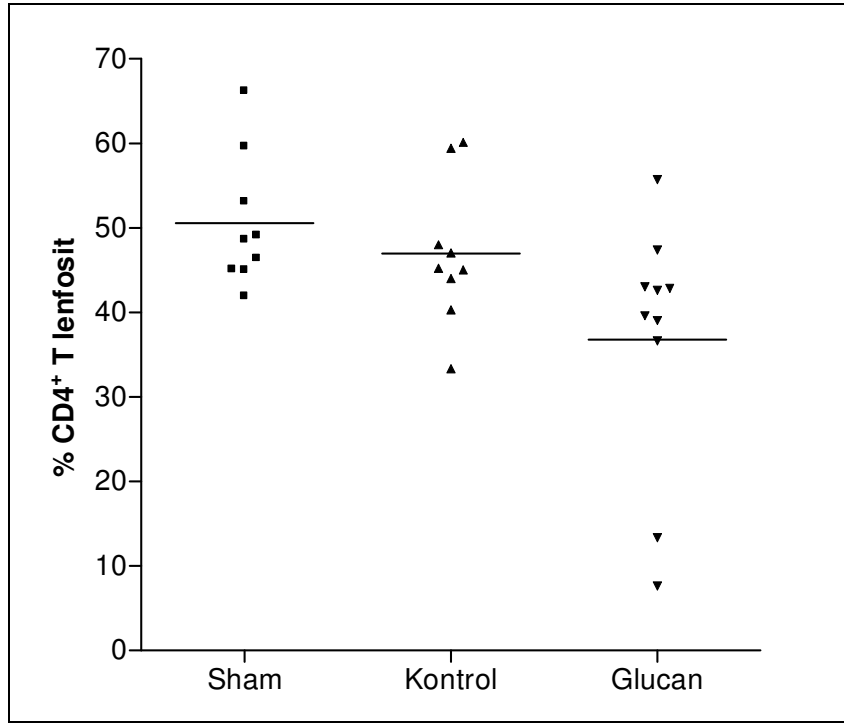


File: ILAC 9.002
 Sample ID:
 Tube: CD8 PE
 Acquisition Date: 19-Jan-07
 Gated Events: 660
 X Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 26, 21

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	45	6.82	0.45
UR	0	0.00	0.00
LL	615	93.18	6.15
LR	0	0.00	0.00

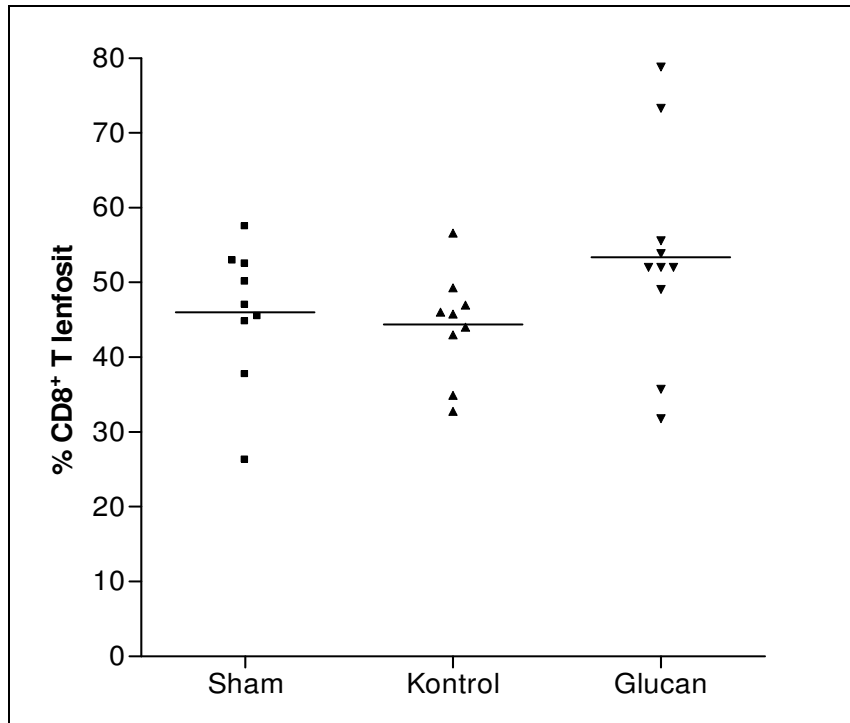
Resim 7. Beta-glukan grubuna ait CD8 için örnek histogram

CD4⁺ T lenfosit oranları açısından sham grubu ile beta-glukan grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0.05$). Kontrol grubunda sham grubuna göre CD4⁺ T lenfositlerin oranı azalırken sonuç anlamlı değildi. Beta-glukan grubunda, kontrol grubuna göre CD4⁺ T lenfosit oranı azaldı ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (*grafik 1*).



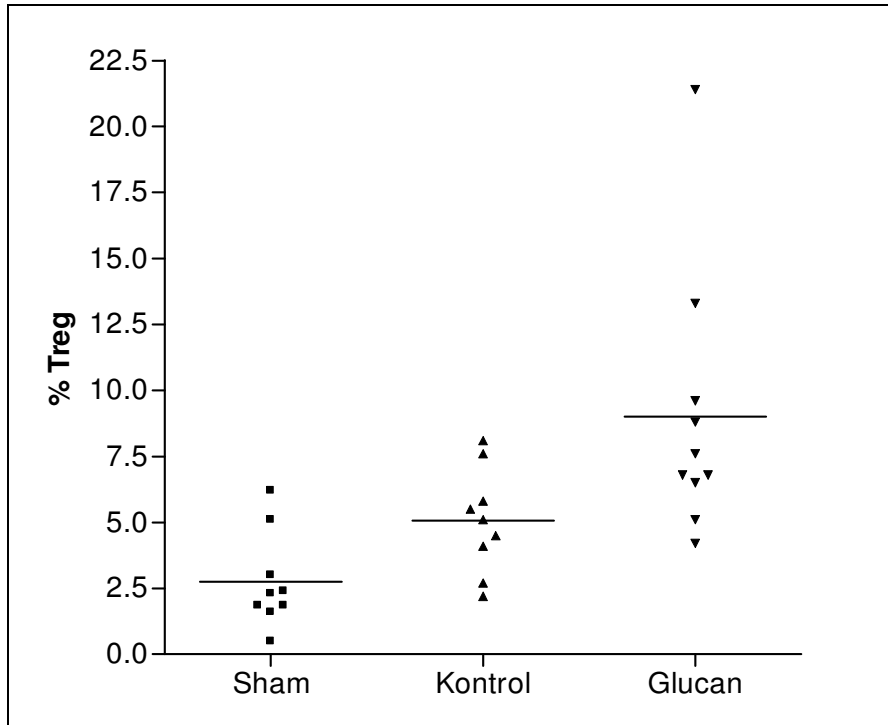
Grafik 1. CD4⁺ T lenfosit oranının gruplara göre dağılımı.

CD8⁺ T lenfosit oranları beta-glukan grubunda, sham ve kontrol gruplarına göre yüksekti ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sham ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, kontrol grubunda CD8⁺ T lenfosit oranında anlamlı olmayan bir düşüş saptandı (*grafik 2*).



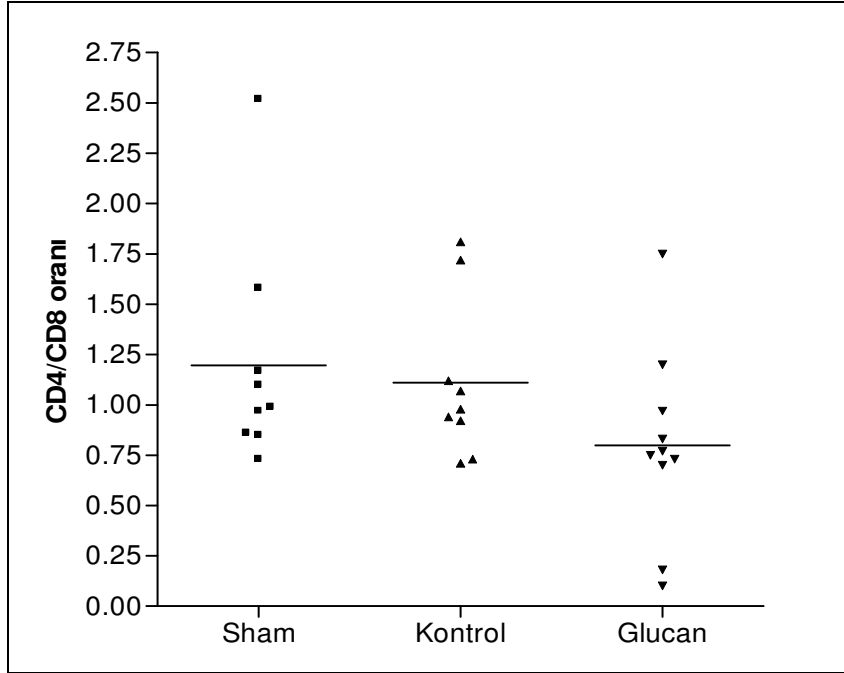
Grafik 2. CD8⁺ T lenfosit oranının gruplara göre dağılımı.

CD4⁺CD25⁺ T lenfosit (Treg) oranlarına bakıldığında, beta-glukan grubunda bu oranın diğer iki gruba karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (p<0.05). Kontrol grubunda da bu oran sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu(p<0.05) (*grafik 3*).



Grafik 3. CD4⁺ CD25⁺T lenfosit (Treg) oranının gruplara göre dağılımı.

CD4⁺ / CD8⁺ T lenfosit oranı, kontrol ve beta-glukan gruplarında sham grubuna göre düşerken anlamlı farklılık saptanmamıştır. Beta-glukan grubu ile sham grubu karşılaştırıldığında oranın tersine döndüğü görüldü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (*grafik 4*).



Grafik 4. CD4 / CD8 oranının gruplara göre dağılımı.

2. Sitokin Yanıtı

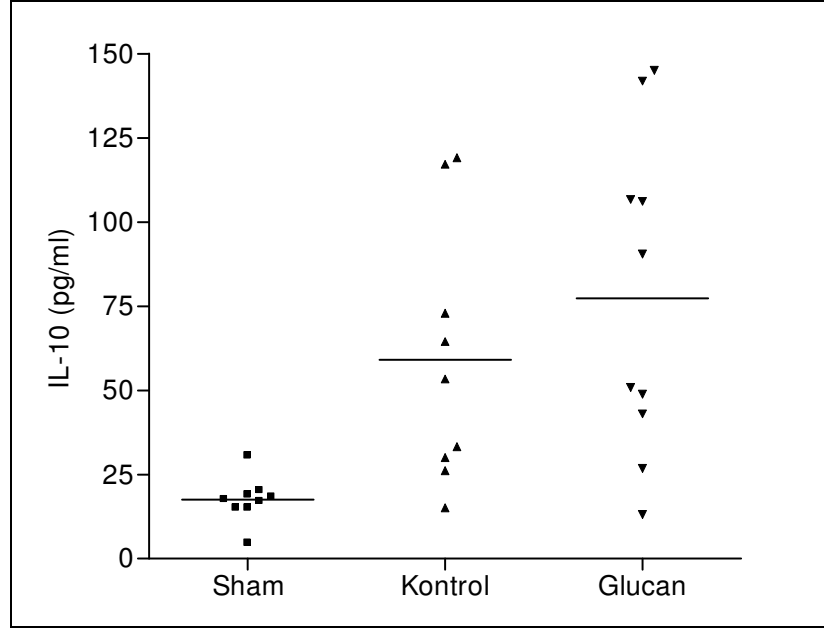
Çalışılan tüm sitokinlerin ortalama değerlerinin gruplara göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo2. Ortalama sitokin düzeylerinin gruplara dağılımı

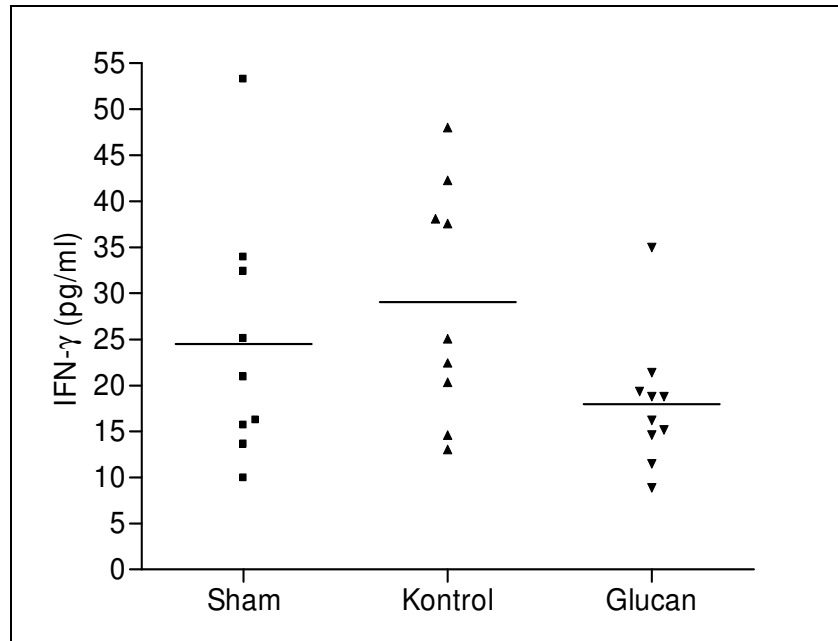
	Sham (n=9) Mean $\pm$ S.E.M	Kontrol (n=9) Mean $\pm$ S.E.M	Beta-Glukan (n=10) Mean $\pm$ S.E.M
TGF-β (pg/ml)	187.26 $\pm$ 25.04	190.56 $\pm$ 16.00	247.10 $\pm$ 54.35
IFN-γ (pg/ml)	24.53 $\pm$ 4.51	29.05 $\pm$ 4.22	17.96 $\pm$ 2.23
IL-10 (pg/ml)	17.50 $\pm$ 2.23	59.04 $\pm$ 12.77	77.27 $\pm$ 14.90
IL-4 (pg/ml)	11.18 $\pm$ 0.89	12.74 $\pm$ 1.18	14.65 $\pm$ 2.18
IL-12 (pg/ml)	894.44 $\pm$ 89.20	889.93 $\pm$ 139.50	734.03 $\pm$ 49.30

IL-10 düzeyleri kontrol ve beta-glukan gruplarında, sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). Beta-glukan grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek saptandı ancak bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (*grafik 5*).

IFN- γ düzeyleri kontrol edildiğinde kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı olmayan bir yükseklik göze çarpmaktaydı. Beta-glukan grubunda IFN- γ düzeyleri her iki gruba göre düşüktü ve kontrol grubu ile arasında istatistiksel fark olduğu görüldü ($p<0.05$) (*grafik 6*).

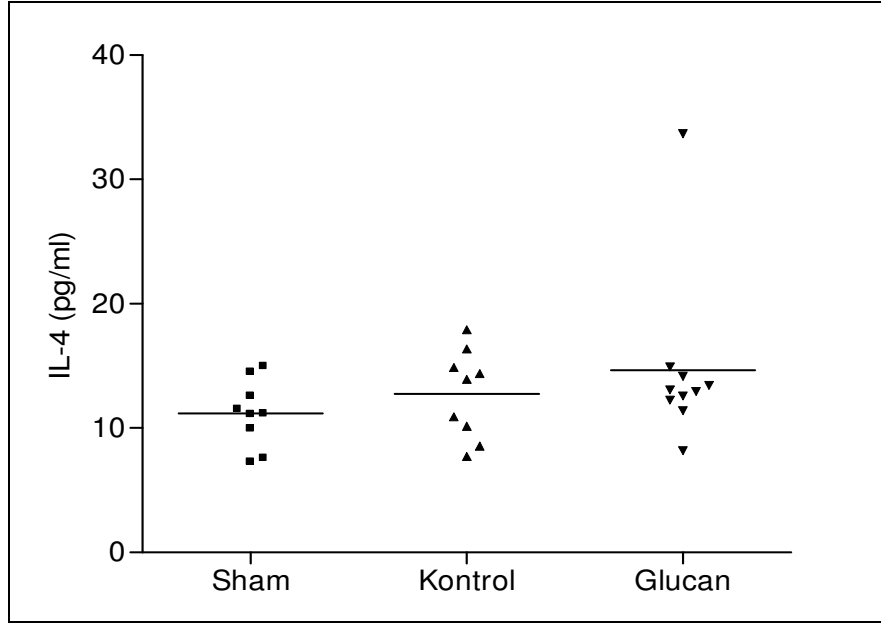


Grafik 5 . IL-10 düzeylerinin gruplara göre dağılımı



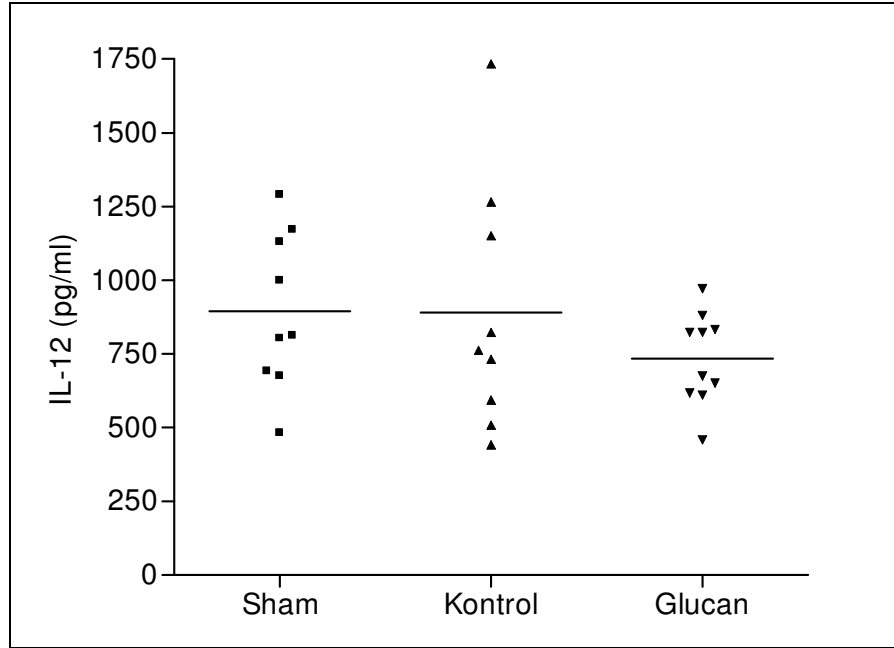
Grafik 6 . IFN - γ düzeylerinin gruplara göre dağılımı

IL-4 düzeyleri kontrol grubunda sham grubundan daha yüksekti. Beta-glukan grubunda ise her iki gruptan daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (*grafik 7*).



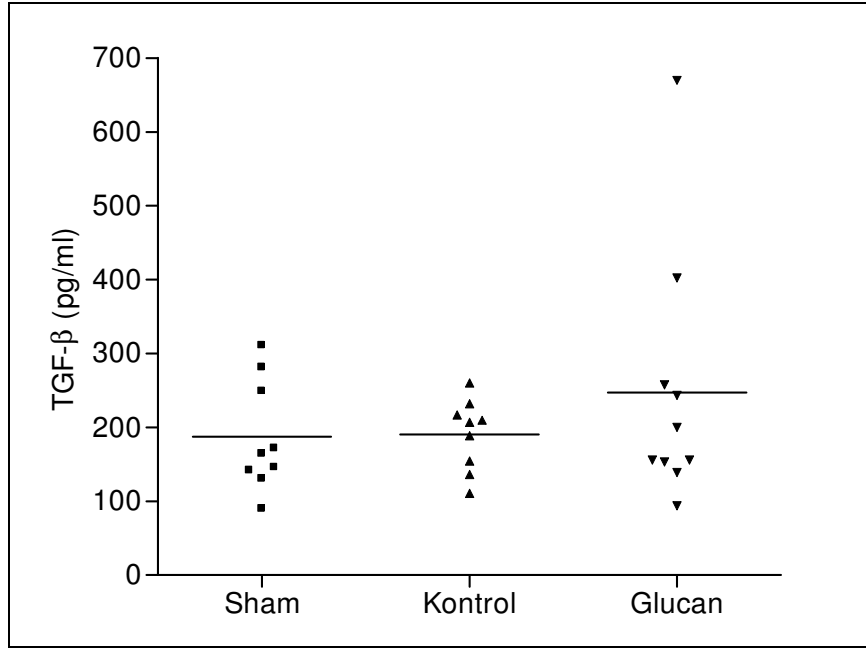
Grafik 7 . IL- 4 düzeylerinin gruplara göre dağılımı

IL -12 düzeyleri kontrol grubunda ve beta-glukan grubunda sham grubuna göre daha düşüktü ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Beta-glukan grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşüş daha fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (*grafik 8*).



Grafik 8 . IL- 12 düzeylerinin gruplara göre dağılımı

TGF- β düzeyleri beta-glukan grubunda her iki gruba oranla daha yüksekti ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kontrol grubunda sham grubuna göre hafif bir yükseklik gözlemlendi ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (*grafik 9*).



Grafik 9 . TGF- β düzeylerinin gruplara göre dağılımı

V. TARTIŞMA

Cerrahi girişimlerin immün sistem üzerinde değişik etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (74). Özellikle açık cerrahinin laparoskopik cerrahiye göre immün sistem üzerindeki etkilerinin daha potent olduğu bugün için kabul edilen bir gerçektir. Açık cerrahi sonucu enfeksiyona ve metastaz oluşumuna eğilimde artış olduğu bilinmektedir. Bu sonuç aslında cerrahi travmanın immünsüpressör etkilerine bağlansa da bu konuda net bir şey söylemek halen mümkün değildir. Laparoskopik cerrahi travmanın immün sistem üzerindeki etkileri gerçekten açık cerrahi travmaya göre daha az olsa da bazı çalışmalarda bunun aynen açık cerrahideki gibi bir immünosüpressif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (75). Ancak bu etkileri immünosüpressif etkiden ziyade immünoregülatuar ya da immün aktiviteyi sınırlayıcı etkiler olarak tanımlamak çok daha akılcıdır. Çünkü immün sistemin temel özelliklerinden biri kendinden olanı yabancidan ayırd etmek, yabancıya yanıt verirken kendinden olana cevapsızlıktır. Bunun yanında eğer antijenik uyarı devam etmiyorsa başlangıçta verilen aktif immün yanıt değişik mekanizmalarla baskılanmalı yani durdurulmalıdır. Bu mekanizmaların hepsi homeostazisin sağlanması ve sürdürülmesi için gereklidir.

Bizim çalışmamızda yalnızca peritoneal travma uyguladığımız kontrol grubu deneklerinde herhangi bir travma uygulanmayan sham grubu deneklerine göre IL-10' daki istatistiksel anlamlı artış ve yine istatistiksel olarak anlamlı olmasa da IL-4' deki artış travmaya sekonder makrofaj aktivasyonu sonucu "*self-sınırlama*" için yine makrofajların ve belki de bunun yanında aktive olan Th2 hücrelerin efektör duruma geçmeleri ile açıklanabilir. Ancak; IL-10 daki belirgin artış aslında bu sitokinin kaynağının yalnızca Th2 olmadığını akla getirmektedir. Nitekim bu sitokinin en önemli kaynaklarından biri de antijen sunan hücreler yani makrofajlardır (32). Bu sitokin immün sistemin aktivasyonunu belirli oranlarda sınırlamak için eksprese edilen

negatif feedback mekanizmasının ürünü olarak görülmektedir (58,76). Daha önceden yapılan çalışmalarda hem açık cerrahi hem de laparoskopik cerrahi girişim sonrasında makrofajların inhibe olduğu gösterilmiştir (77). Dolayısıyla çalışmamızda saptadığımız IL-10 artışı muhtemelen self-sınırlama için makrofajlardan eksprese olmuş olabilir. Bunun bir basamak sonrası da makrofaj inhibisyonu olacaktır. Bu sitokinin önemli bir diğer kaynağı da Treg hücrelerdir (78). Travma sonrası gelişen inisiyal immün aktivasyonun süprese edilmesi amacıyla gelişen düzenleyici immün yanıtın ortaya çıktığına dair çalışmalar vardır (58). Bu çalışmalar sonucunda immün durum değerlendirildiğinde, cerrahi travmanın monosit makrofaj süpresyonu (42), fagositik fonksiyon bozulması (79), artmış sitokin üretimi (80), nötrofil disfonksiyonu (42), azalmış kemotaksis (79), gecikmiş tip hipersensitivite yanıtını bozduğu (81), Th/Ts oranını değiştirdiği (82) ve Th1 hücre fonksiyonlarını downregüle ettiği gösterilmiştir (83). Bizim çalışmamız sonucunda yalnızca travma uygulanmış olan deneklerden elde ettiğimiz sitokin düzeylerine bakıldığında, tüm bu etkileri sağlayabilecek olan IL-10' un arttığı gösterilmiştir. Bu sitokin artışına sekonder olarak tüm fonksiyon değişiklikleri ve regülasyon mekanizmaları işleyebilir. Bu nedenle cerrahi travma sonrası gelişen IL-10 ile ilişkili olan sonuçlarımız literatür ile uyumludur.

Yalnızca peritoneal travma uyguladığımız kontrol grubu deneklerinde travma sonucu istatistiki anlamlı olmasa da ortaya çıkan IFN- γ daki artış aslında sürpriz değildir. Bu sitokinin önemli kaynaklarından biri olan Th1' in literatürde de gösterildiği gibi baskılanması esasen bu sitokin düzeyinin düşmesi ile sonuçlanmalıydı (80). Ancak bu sitokinin en önemli ve temel kaynaklarından diğerleri de innate immün sistemin elemanları olan antijen sunan hücreler yani makrofajlar ve doğal öldürücü (NK) hücrelerdir (32). Nitekim cerrahi travma sonrası immün aktivasyonun ilk olaylarından biri kısa süreli ve geçici NK hücre ve makrofaj artışıdır (84). Dolayısıyla travma sonrası oluşan IFN- γ artışı bu hücrelerden kaynaklanmış olabilir. Daha sonra da tartışılacağı gibi, NK hücre aktivatörlerinin en önemlisi olan IL-12'nin, beta-glukan grubundaki düşüşü sonrası, muhtemelen NK hücrelerinde de

fonksiyonel olarak bir downregölasyon olmuş ve bunun sonucunda IFN- γ düşmesi ortaya çıkmıştır. Yine az önce değinildiği gibi, önemli bir IFN- γ kaynağı olan makrofaj inhibisyonunun bir sonucu olarak bu sitokin düzeyleri düşüş göstermiş olabilir. Bu bağlantı nedeniyle yalnızca travma sonucu ortaya çıkan hafif de olsa IFN- γ artışı, travma sonrası ortaya çıkan hızlı makrofaj ve NK hücre cevabına bağlamak olasıdır. Ancak ardından hızla gelişen regölatuvar mekanizmalar ve IL-10 ve TGF- β artışı sonucunda bahsi geçen hücreler inhibe olmakta ve bu sitokin düzeyi düşme eğilimine girmektedir. Ancak bunun zamanlamasını ayarlamak bizim deneyimizde pek mümkün değildir. Bunu tam olarak görmek için deneyi değişik zaman kesitlerini içerecek şekilde geliştirmek gerekmektedir. Ancak beta-glukan ile beklediğimiz regölasyon mekanizmalarının artması sonucu IFN- γ değerlerinde saptadığımız düşme önemli bir özelliktir. Bu durumda self-sınırlama için kendinden olanın yaptığı regölatuvar etkileri, beta-glukanın potansiyalize ettiği söylenebilir.

Diğer sitokinlere bakıldığında, yalnızca cerrahi travma uygulanmış olan kontrol grubu deneklerinde belirgin değişiklikler gözlenmemiştir. Bu sitokinlerin hemen hepsinin pleiotropik etkileri olduğu ve çoklu kaynaklı oldukları (32) düşünülürse bu sonuçların sürpriz olmadığı söylenebilir.

Asıl göze çarpan önemli değişiklik, beta-glukan grubunda IL-10'un ve TGF- β 'nin sham grubuna göre oldukça yüksek olmasıdır. Bu iki sitokin de immünolojik aktivasyon sonrası Treg hücrelerden eksprese olduğu bilinmektedir (85-88). Her iki sitokin yalnız başlarına immünoregölator/immunosüpressif etki gösterir. Ancak özellikle bu iki sitokin bir arada sinersiyetik etki ile daha yoğun bir immunosüpressif etki gösterdikleri bilinmektedir(76,85-88). Bizim çalışmamızda, cerrahi travma sonrası oluşan muhtemel ilk immün aktivasyona sekonder ortaya bu sitokinlerin kaynağı self-sınırlama için çalışan hücreler yanında, Treg hücreler gibi gözükmemektedir. Çünkü beta-glukan grubunda, travma sonrası alınan örneklerin flowsitometrik analizleri sonucunda, hücre popülasyonunun Treg yönüne kaydığı görülmektedir. Bu çalışmada, beta-glukan grubunda ortaya çıkan IL-10 ve TGF- β yükselmesinin kaynağını her ne kadar Treg hücrelere bağlamış olsak

da bu konu ile ilgili yeterli çalışma örneği yoktur. Ancak, literatürde hayvan deneylerinde oral kullanılan beta-glukan'ın plazma IL-10 düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (89,90). Bu çalışmalarda, bu sitokinin kaynağı belirtilmese de bizim çalışmamızda TGF- β ile birlikte yükselmesi, her iki sitokinin önemli kaynaklarından biri olan Treg hücre kökenli olduklarını düşündürmektedir. Nitekim gerçekten, TGF- β ' nın hem Treg gelişimindeki rolü iyi bilinmekte, hem de bu sitokinin en önemli kaynaklarından biri olarak Treg hücreler gösterilmektedir (91). Bunun yanında, bizim çalışmamızda ortaya çıkan IL-10 yüksekliğindeki belirginliğe rağmen IL-4' teki çok hafif artış, kaynağın yalnızca Th2 olmadığını düşündürmektedir. IL-10'un önemli kaynaklarından biri olan Th2 hücrelerinin, aynı zamanda IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinler de sekrete ettikleri bilinmektedir (32). Dolayısıyla bizim çalışmamızda beta-glukan grubunda, IL-10' un IL-4' den bağımsız olarak kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde yükselmesi, beta-glukan tedavisi ile artan Treg hücrelerine bağlı gibi görülmektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi IL-10 ve TGF- β ' nın birlikte sinerjistik olarak immünoşüpressif etki gösterdiği bilinmektedir. Bu etkileri immünolojik aktivasyonun her aşamasında gösterse de, temel olarak CD4⁺ Th hücreleri baskılayarak göstermektedirler (92,93). Nitekim bizim çalışmamızda beta-glukan grubunda flowsitometrik olarak saptadığımız Treg artışının yanında, anlamlı düzeyde CD4⁺ T hücre azalması saptanmıştır. Bu hücre popülasyonu, major olarak hem Th1 hem de Th2 hücreleri içermektedir. Bu nedenle beta-glukan grubunda saptanan IL-10 yüksekliği, Th2 kaynağından ziyade Treg hücrelerine bağlanmalıdır. Ayrıca beta-glukan grubunda ortaya çıkan CD8⁺ T hücre yükselişinin CD4⁺ T hücrelerin düşüşüne sekonder, rölatif bir yükselme olduğu yorumlanmalıdır. Bu da, muhtemelen Treg hücrelerin inhibitör etkilerinin daha çok CD4⁺ yardımcı T hücrelerde olduğu bilgisini doğrulamaktadır.

Beta-glukan tedavisi verdiğimiz grupta, IFN- γ düzeyi sham grubuna göre hafif düşük olarak saptandı. Ancak bunun yanında kontrol grubu olan ve beta-glukan verilmemiş olan gruptaki IFN- γ düzeyi ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Bu da bu sitokinin daha önce de

belirttiğimiz gibi travmaya sekonder ilk önce innate immünitinin bir ögesi olan makrofaj ve NK kaynaklı olabileceğini, ve beta-glukan ile ortaya çıkan immünoregülatör/süpressif etki ile hem makrofaj, hem Th1, hem de NK baskılanması sonucu beta-glukan alan grupta düşmesini açıklamaktadır. Bunun yanında, antijen sunan hücreler ve özellikle de Th1 kaynaklı olan IL-12'nin de beta-glukan ile tedavi edilmiş gruptaki düşme eğilimi, bu ilacın özellikle Th1 kaynaklı immünolojik yanıtı inhibe edebileceğini göstermektedir. Bu sitokinin NK hücrelerinin en önemli aktivatörü olduğu da bilinmektedir (94). Bu nedenle IL-12 azalması muhtemelen NK hücrelerde de bir azalma ile sonuçlanacak ve IFN- γ daki düşüşe bu da etki edecektir. Tüm bunlara ek olarak daha önce yapılan çalışmalarda, endojen TGF- β 'nın inhibe edilmesi ile aşırı bir NK hücre ve onun sitokini olan IFN- γ 'da artış gösterilmiştir (95). Dolayısıyla TGF- β 'nın NK ve IFN- γ üzerindeki süpressif/regülatuar etkisi gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da, beta-glukan alan gruptaki TGF- β artış eğilimi ile birlikte IFN- γ azalmasının sürpriz olmadığı ve literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (95).

Deneyssel ve klinik çalışmalar cerrahi travmanın spesifik ve non-spesifik immün sistemi önemli şekilde etkilediğini göstermektedir. Bu etkilerin tamamı, iç içe geçmiş hiperinflamasyon ve bunu regüle etmeye çalışan immünsüpresyonun sonucunda oluşur. Oluşan bu postoperatif immün disregülasyonun derecesi ve süresi, cerrahi travmanın büyüklüğü ile orantılıdır (54,96). Laparoskopik cerrahinin en önemli avantajlarından birisi, bu travmanın şiddetinin daha az olmasıdır (58). İmmüniteyi korumak için kritik noktalar, sağlam bir Th1/Th2 oranının sağlanması, intakt bir makrofaj-T hücre ilişkisi ve iyi bir sitokin dengesi yakalamaktır. Laparoskopik cerrahi ile ilgili yapılan çalışmalarda, IL-6 ve IL-10'daki artışın belirgin olarak gerilediği, IFN- γ , TNF- α ve IL-2 düzeylerindeki düşüşün geriye çevrildiği görülmüştür (80,97). Ancak bu sonuçlar, immün sistem için tekrar toparlanma (recovery) safhasında olan geç bulgulardır. Bizim çalışmamızda bu safha incelenmemiştir.

Bizim çalışmamızda, pnömoperitonyum oluşturulmuş ratlarda işlem sonrası erken dönemde pro-inflamatuvar yanıtın ve innate immün sistem

aktivasyonunu göstergesi olabilecek olan IFN- γ 'nın artması, buna karşılık özellikle IL-10 ağırlıklı inhibitör/regülatör sitokinlerin de artması, oluşabilecek olan hiperinflamatuvar yanıtın baskılanması için bir çaba olarak oluşmuş gibi görülmektedir. Bunun yanında, pnömoperitonyum oluşturmada önce premedikasyon şeklinde verilen beta-glukan tedavisinin Treg hücreleri, IL-10 ve TGF- β gibi sitokinleri arttırarak bu regülasyon mekanizmalarını potansiyalize ettiği saptanmıştır.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda, beta-glukan ile tedavi edilmiş ve daha sonrasında cerrahi travma uygulanmış ratlarda, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı düzeyde Treg artışı görülmüştür. Bu hücrenin temel sitokinleri olan IL-10 ve TGF- β 'da da artışlar saptanmış olup, bu sitokinlerin immünoregülatör etkilerine dair diğer hücre değişiklikleri, IL-12 ve IFN- γ düzeylerinde değişimler olmuştur. Bu tedavinin immün sistem üzerindeki etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olsa da, özellikle laparoskopik cerrahideki immünolojik etkilerini araştıran herhangi bir çalışma yoktur. Bu nedenle bu konuda ilk araştırma olan bu çalışmanın sonuçlarının desteklenmesi için daha ileri çalışmalara gerek vardır. Yine de bizim çalışmamızın sonuçlarıyla, alternatif yöntemle göre daha az da olsa immünolojik değişiklik yaratan laparoskopik cerrahinin bu etkilerini azaltmak, belki de nötralize etmek ve dolayısıyla hızla immün homeostazis sağlamak için girişim öncesi beta-glukan tedavisi uygulaması önerilebilir.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

Cerrahi travma, hem lokal hem de sistemik immün yanıtı etkilemektedir. Hem hücressel hem de humoral immün yanıtın değişik derecelerde etkilenmesi ile bir immüendisregülasyon ortaya çıkmaktadır. Bu disregülasyon çoğu zaman immünsüpresyon olarak karşımıza çıkmasına karşın aslında bu, travmaya karşı oluşan aşırı tepkinin dengeye oturtulması için yapılan bir homeostazistir. Konvansiyonel cerrahi sonrasında bu disregülasyon daha belirginleşmekte ve oluşan geçici immünsüpresyon hali beraberinde septik komplikasyonlar, tümör metastazının agresyonu ve yara iyileşmesi sorunlarını gündeme getirmektedir. Yapılan çalışmalar minimal invaziv cerrahi yöntemlerde bu immüendisregülasyonun daha az oluştuğunu göstermekle birlikte laparoskopik yöntemde kullanılan gazların ve gazlara ait ısı ve nem gibi faktörlerin immün sisteme ne gibi etkileri olduğu halen araştırma konusudur.

Beta-glukan, yıllardır pek çok hastalığın tedavisinde immünmodülatör ajan olarak kullanılmaktadır. İmmün sistem üzerinde oluşturduğu olumlu etkiler ortaya çıkarılırken onkolojik hastalıklar, otoimmün bozukluklar, sistemik enfeksiyonlar gibi konak immünitesinin birincil derecede rol aldığı durumlarda etkinliği klinik çalışmalarla gösterilmiş ve bu hastalıkların tedavisinde yardımcı ilaç olarak kullanım alanı bulmuştur.

Bizim çalışmamızın amacı laparoskopik cerrahinin temelini oluşturan pnömoperitonyumun ve preoperatif beta-glukan tedavisinin peritoneal immün sistem ve sitokin yanıtı üzerindeki etkilerini incelemektir.

Sonuçta elde edilen bulgular, pnömoperitonyumun peritoneal immün sistem üzerinde bir immüendisregülasyon yarattığını, hücre oranları bakımından ciddi etkiler oluşmasa da, sitokin yanıtını olumsuz etkilediğini göstermektedir. Bu etkiler, bire bir immünsüpresyondan çok ilk anda oluşan hiperreaksiyonun durdurulması için oluşan bir inhibitör refleks yanıt gibi görünmektedir. Preoperatif uygulanan beta glukan, hem hücressel immün yanıt üzerinde hem de sitokin yanıtı üzerinde olumlu değişikliklere neden

olmuştur. Özellikle immün yanıtları kontrol altında tutmak için çalışan regülatör T hücreler üzerinde anlamlı şekilde iyileştirici etkiler göstermiştir. Travma ile tetiklenen hiperinflamasyonun ve immüendisregülasyonun önlenmesinde negatif feedback mekanizmalarının en önemli unsurlarından biri olan regülatör T hücrelerdeki bu olumlu etki pek çok postoperatif komplikasyonun önlenmesinde yararlı olabilir. Düşük yan etki profili ve kolay kullanılabilirliği ile beta-glukan, cerrahi uygulanacak tüm hastalarda kullanılabilir.

Bizim çalışmamız deneysel laparoskopik cerrahi modelinde beta-glukan kullanımı ve bunun peritoneal regülatör T hücreleri üzerine etkileri bakımından literatürdeki tek çalışma olmasına karşın beta glukanın immün sistemin diğer öğelerine olan etkileri, ilacın farklı doz ve kullanım sürelerinde ne gibi etkilerinin olduğunun ortaya konabilmesi amacıyla ileri deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim vardır.

VII. ÖZET

Laparoskopik cerrahinin, peritoneal ve sistemik immün yanıt üzerindeki etkileriyle ilgili bilginiz henüz yeterli düzeyde değildir. Cerrahi travmanın yarattığı immüendisregülasyonu düzenlemek için değişik yöntemler denenmektedir. Bu çalışmanın amacı, pnömoperitonyum oluşturulmuş rat modelinde, preoperatif kullanılan beta-glukanın peritoneal immün sisteme ve sitokin yanıtına etkilerini incelemektir.

28 adet rat , şu şekilde 3 gruba ayrıldı: grup 1, n=9 (sham-operasyon yok); grup 2, n=9 (kontrol, 10 mmHg ile 30 dk pnömoperitonyum); grup 3, n=10 (beta-glukan, pnömoperitonyum öncesi 7 gün 100mg/kg/gün gavajla beta-glukan). Pnömoperitonyum uygulandıktan 24 saat sonra tüm ratların peritoneal yıkama sıvıları alınarak, flowsitometri ile CD4, CD8, CD25 tayini ve ELISA ile IL-4,IL-10, IL-12, IFN- γ , TGF- β tayini yapıldı.

Beta-glukan grubunda CD4⁺CD25⁺ T hücrelerde (Treg) her iki gruba göre ve IL-10 düzeylerinde sham grubuna göre anlamlı yükseklik saptandı (p<0.05). IFN- γ düzeyi kontrol grubunda sham grubuna göre yüksek bulunurken, beta-glukan grubunda kontrol grubundan anlamlı derecede düşüktü(p<0.05). CD4⁺ T hücrelerde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, CD8⁺ T hücreler beta-glukan grubunda yüksek bulundu. TGF- β düzeyi beta-glukan grubunda her iki gruptan daha yüksekti. IL-4 ve IL-12 düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmedi.

Pnömoperitonyum, peritoneal immünitede disregülasyona neden olmaktadır ancak preoperatif beta-glukan tedavisi, regülatör T hücre düzeylerini arttırarak bu disregülasyonun şiddetini azaltmakta ve oluşan inflamatuvar süreci süprese etmektedir. Bu çalışma, literatürde beta-glukanın deneysel laparoskopik cerrahi ve regülatör T hücreleri üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Bu nedenle beta glukanın immün sistemin diğer öğelerine olan etkileri, ilacın farklı doz ve kullanım sürelerinde ne gibi etkilerinin olduğunun ortaya konabilmesi amacıyla ileri deneysel ve klinik çalışmalara gereksinim vardır.

VIII. SUMMARY

Our knowledge about effects of laparoscopic surgery on peritoneal and systemic immune response is still lacking. In order to restore the immunodisregulation developed by surgical trauma, several methods are being tried. Aim of this study is to investigate the effects of beta-glucan on peritoneal immune system and cytokine response in rat pneumoperitoneum model.

Twenty eight rats were divided into three groups like; group 1, n=9 (sham-not operated); group 2, n=9 (control, 10 mmHg pneumoperitoneum for 30 min); group 3, n=10 (beta-glucan, 100 mg/kg/day beta-glucan by gavage, for 7 days before pneumoperitoneum). 24 h after pneumoperitoneum, samples of peritoneal fluid was collected from all rats and CD4, CD8, CD25 T cells counted by flowcytometry and levels of IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TGF- β measured by ELISA.

CD4⁺CD25⁺ T cells (Treg) were significantly higher in beta-glucan group from others and IL-10 levels were significantly higher in beta-glucan group when compared to sham ($p < 0.05$). IFN- γ was higher in control group when compared to sham and it significantly decreased in beta-glucan group compared with control ($p < 0.05$). There was no difference in CD4⁺ T cell ratio between all groups but CD8⁺ T cells were slightly higher in beta-glucan group. TGF- β was higher in beta-glucan group than others. There was no significant difference in IL-4 and IL-12 among all groups.

Pneumoperitoneum triggers a peritoneal immunodisregulation but beta-glucan treatment reduces the degree of this disregulation by increasing regulatory T cells and suppress the developing inflammation. This is the first study in the literature which investigates the effects of beta-glucan in experimental laparoscopic surgery and regulatory T cells. For this reason, to investigate the effects of beta-glucan on the other components of immune system and to determine the effects developing by different dosage and usage period of this drug further investigations are needed.

KAYNAKLAR

1. Novitsky YW, Litwin DEM, Callery MP. The net immunologic advantage of laparoscopic surgery. Surg Endosc 2004;18:1411–19.
2. Chiarugi M, Bucciante P, Celona G, et al. Laparoscopic compared with open appendectomy for acute appendicitis; a prospective study. Eur J Surg 1996;162:385–90.
3. Bouvy ND, Marquet RL, Hamming JF, et al. Laparoscopic surgery in the rat: beneficial effect on body weight and tumour take. Surg Endosc 1996;10:490–94.
4. Di Paolo N, Sacchi G. Anatomy and physiology of the peritoneal membrane. Contrib Nephrol 1990;84:10-26.
5. Slater NJ, Raftery AT, Cope GH. The ultrastructure of human abdominal mesothelium. J Anat 1989;167: 47–56.
6. Levine S. Postinflammatory increase of absorption from peritoneal cavity into lymph nodes: particulate and oily inocula. Exp Mol Pathol 1985;43:124-34.
7. Moore KL. The peritoneum and peritoneal cavity. Clinically Oriented Anatomy Third Edition Williams&Wilkins 1992;152-153.
8. Rofe AM, Bourgeois CS, Coyle P. Beneficial effects of endotoxin treatment on metabolism in tumour-bearing rats. Immunol Cell Biol 1992;70: 1–7.

9. Agalar F, Sayek İ. Peritoneal savunma mekanizmaları. Klinik ve Deneysel Cerrahi 1997;5:12-9.
10. Raftery A. Regeneration of parietal and visceral peritoneum in the immature animal:a light and electron microscopical study. Br J Surg 1973;60:969-75.
11. Bachus K, Doty E, Haney A. Differential effects of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha, indomethacin, hydrocortisone, and macrophage co-culture on the proliferation of human fibroblasts and peritoneal mesothelial cells. J Soc Gynecol Invest 1995;2:636-42.
12. Offner F, Feichtinger H, Stadlmann S, et al. TGF-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. Am J Pathol 1996;148:1679-88.
13. Hau T, Payne WD, Simmons RL . Fibrynolytic activity of the peritoneum during experimental peritonitis. Surg Gynecol Obstet 1979;148:415-8.
14. Fischer H, Ax W, Malchow H. Antibody producers. Klin Wochenschr 1969;47: 1019-25.
15. Christou NV. Systemic and peritoneal host defense in peritonitis. World J Surg 1990;14:184-90.
16. Wijffels JF, Hendrickx RJ, Steenberg JJ, et al. Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages. Res Immunol 1992;143:401-9.
17. Agalar F, Sayek I, Cakmakci M, et al. Effect of omentectomy on peritoneal defence mechanisms in rats. Eur J Surg 1997;163:605-9.

18. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. Camlıoğlu Y, Deniz G. ed; İstanbul:İstanbul Tıp Kitabevi 2007:95-9.
19. Wang X, Mosmann T. In vivo priming of CD4⁺T cells that produce interleukin(IL)-2 but not IL-4 or interferon(IFN)-gamma can subsequently differentiate into IL-4 or IFN-gamma secreting cells. J Exp Med 2001;194:1069-80.
20. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, et al. Cytokines and the Th₁/Th₂ paradigm in transplantation. Current Opinion in Immunology 1994;6:757-64.
21. Chen Q, Ghilardi H, Wang H, et al. Development of Th1-type immune responses requires the type 1 cytokine receptor TCCR. Nature 2000;407:916-20.
22. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. Camlıoğlu Y, Deniz G. ed; İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi 2007:168-70
23. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. J Exp Med 1996;184:387–96.
24. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995;155:1151–64.

25. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med 1998;188:287–96.
26. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic selftolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int Immunol 1998;10:1969–80.
27. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, et al. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. J. Exp. Med 2005; 201:1061-67.
28. Aderem AA. How cytokines signal messages within cell. J Infect Dis 1993;167 (suppl1):2-7.
29. Kılıçturgay K: İmmünolojiye Giriş. Güneş & Nobel Tıp Kitapevleri. Bursa. Baskı III. 2003; s: 72-73.
30. Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS: Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company. USA. 2nd Edition. 1994:240-60.
31. Kılıçturgay K: İmmünolojiye Giriş. Güneş & Nobel Tıp Kitapevleri. Bursa. Baskı III. 2003:132-36
32. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. Camlıoğlu Y, Deniz G. ed; İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi 2007:274-75

33. Jakowlew SB, Mead JE, Danielpour D, et al. Transforming growth factor-beta isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta. *Cell Regul* 1991;2:535-48.
34. Russell WE, Coffey RJ, Ouellette AJ, et al. Type beta transforming growth factor reversibility inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5126-30.
35. Letterio JJ, Roberts AB. TGF- β : A Critical Modulator of Immune Cell Function. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:244-50.
36. McCartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor-beta: a matter of life and death. *J Leukocyte Biol* 1994;55:401-9.
37. Wahl SM, Wen J, Moutsopoulos N. TGF-b: a mobile purveyor of immune privilege *Immunol Rev* 2006;213:213-27.
38. Border WA, Rouslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992;90:1-7.
39. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul* 1990; 1:875-82.
40. Ignatz RA, Massague' J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell* 1987;51:189-97.
41. Hackam DJ, Rotstein OD. Host response to laparoscopic surgery: mechanisms and clinical correlates. *Can J Surg* 1998;41:103-10.

42. Sietses C, Beelen RH, Meijer S, et al. Immunologic consequences of laparoscopic surgery: speculation on the causes and clinical implications. *Langenbeck's Arch Surg* 1999;384:250–58.
43. Visser CE, Tekstra J, Brouwer-Steenbergen JJ, et al. Chemokines produced by mesothelial cells: huGROalpha, IP-10, MCP-1 and RANTES. *Clin Exp Immunol* 1998;112:270–75.
44. Jonjic N, Peri G, Bernasconi S, et al. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med* 1992;176:1165–74.
45. diZerega GS. The peritoneum and its response to surgical injury. In diZerega GS, Malinak L, Diamond M and Linsk C (eds) *Treatment of Post Surgical Adhesions* New York: Wiley-Liss 1990:166-71.
46. Haney AF. Identification of macrophages at the site of peritoneal injury: evidence supporting a direct role for peritoneal macrophages in healing injured peritoneum. *Fertil Steril* 2000;73:988-95.
47. Davies MG, Hagen PO Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997;84:920–35.
48. Redmond HP, Hofmann K, Shou J, et al. Effects of laparotomy on systemic macrophage function. *Surgery* 1992;111:647–55.
49. Holzer K, Konietzny P, Wilhelm K, et al. Phagocytosis by emigrated, intra-abdominal neutrophils is depressed during human secondary peritonitis. *Eur Surg Res* 2002;34:275–84.

50. Stephan RN, Saizawa M, Conrad PJ, et al. Depressed antigen presentation function and membrane interleukin-1 activity of peritoneal macrophages after laparotomy. *Surgery* 1987;102:147–54.
51. Badia JM, Whawell SA, Scott-Coombes DM, et al. Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *B J Surg* 1996;83:347–48.
52. Sendt W, Amberg R, Schoffel U, et al. Local inflammatory peritoneal response to operative trauma: studies on cell activity, cytokine expression, and adhesion molecules. *Eur J Surg* 1999;165:1024–30.
53. Sido B, Teklote JR, Hartel M, et al. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004;18:439-54.
54. Lennard TW, Shenton BK, Borzotta A, et al. The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br J Surg* 1985;72:771–76.
55. Pappas TN, Schwartz LB, Eubanks WS, ed. *Atlas of Laparoscopic Surgery*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1996:20
56. Safran DB, Orlando R 3rd. Physiologic effects of pneumoperitoneum. *Am J Surg* 1994;167:281-6.
57. Gupta A, Watson DI. Effect of laparoscopy on immune function. *Br J Surg* 2001;88:1296–1306
58. Vitimberga FJ Jr, Foley DP, Meyers WC, et al. Laparoscopic surgery and the systemic immune response. *Ann Surg* 1998;227:326–34.

59. Redmond HP, Watson WG, Houghton T, et al. Immune function in patients undergoing open vs laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg* 1994;129:1240.
60. Da Costa ML, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. The effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of spontaneous tumor metastasis. *Surgery* 1998;124:516–25.
61. Trokel MJ, Bessler M, Treat MR, et al. Preservation of immune response after laparoscopy. *Surg Endosc* 1994;8:1385–8.
62. Lee SW, Feingold DL, Carter JJ, et al. Peritoneal macrophage and blood monocyte functions after open and laparoscopic-assisted cecectomy in rats. *Surg Endosc* 2003;17: 1996–2002.
63. Kim SY, Song HJ, Lee YY, et al. Biomedical Issues of Dietary fiber β -Glucan. *J Korean Med Sci* 2006;21: 781-9.
64. Kirmaz C, Bayrak P, Yilmaz O, et al. Effects of glucan treatment on the Th1/Th2 balance in patients with allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled study. *Eur Cytokine Netw* 2005;16:128-34.
65. Hendler SS, Rorvik D. *PDR for Nutritional Supplements* 1st ed. Thomson Healthcare 2001:54.
66. Pillemer L, Ecker EE. Anticomplementary factor in fresh yeast. *J Biol Chem* 1941;137:139.
67. Ross GD, Vetvicka V, Yan J, et al. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* 1999;42:61-74.

68. Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clin Microbiol Rev 2000;13:523-33.
69. Brown GD, Gordon S. Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. Immunity 2003; 19:311–15.
70. Battle J, Ha T, Li C, et al. Ligand binding to the (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan receptor stimulates NFkappaB activation, but not apoptosis in U937 cells. Biochem Biophys Res Commun 1998;249:499-504.
71. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. J Exp Med 2002;196:407-12.
72. Brown GD, Herre J, Williams DL, et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. J Exp Med 2003;197:1119-24.
73. Yılmaz T, Deniz G. Flow cytometry. İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü. İmmünoloji Bilim Dalı Yayınları No:1 1997
74. Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? Langenbecks Arch Surg 2004;389:475–84.
75. Strickland AK, Martindale RG. The increased incidence of intraabdominal infections in laparoscopic procedures. Surg Endosc 2005;19:874–81.
76. Bellinghausen I, König B, Bottcher I, et al. Inhibition of human allergic T-helper type 2 immune responses by induced regulatory T cells requires the combination of interleukin-10-treated dendritic cells and transforming growth factor-beta for their induction. Clin Exp Allergy 2006;36:1546-55.

77. Buunen M, Gholghesaei M, Veldkamp R, et al. Stress response to laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 2004;18:1022–28.
78. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345–52.
79. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation; an early marker of the postsurgical sepsis response. *Arch Surg* 1993;128:390–95.
80. Brune IB, Wilke W, Hensler T, et al. Downregulation of T-helper type 1 immune response and altered proinflammatory and antiinflammatory T-cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am J Surg* 1999;177:55–60.
81. Gitzelmann CA, Mendoza-Sagaon M, Talamini MA, et al. Cell-mediated immune response is better preserved by laparoscopy than laparotomy. *Surgery* 2000;127:65–71.
82. Valina VL, Velasco JM. The influence of laparoscopy on lymphocyte subpopulations in the surgical patient. *Surg Endosc* 1996;10:481–84.
83. Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, et al. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 Thelper cell balance, suggesting downregulation of cell-mediated and upregulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* 1996;119:316–25.

84. Yadavalli GK, Auletta JJ, Gould MP, et al. Deactivation of the innate cellular immune response following endotoxic and surgical injury *Exp Mol Pathol* 2001;71:209-21.
85. Lohr J, Knoechel B, Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev* 2006;212:149–62.
86. Fahlen L, Read S, Gorelik L, et al. T cells that cannot respond to TGFbeta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201:737–46.
87. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:419–24.
88. Huang X, Zhu J, Yang Y. Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4+ CD25+ regulatory T cells is antigenspecific and requires IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 2005;175:4283–91.
89. Li J, Li DF, Xing JJ, et al. Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Anim Sci* 2006;84:2374-81.
90. Li J, Xing J, Li D, et al. Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned piglets. *Arch Anim Nutr* 2005;59:303-12.
91. Zhang L, Yi H, Xia XP, et al. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. *Autoimmunity* 2006 ;39:269-76.

92. Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM, et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 2004;104:3804–12.
93. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, et al. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389–99.
94. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. Camlıoğlu Y, Deniz G. ed; İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi 2007:31
95. Meadows SK, Eriksson M, Barber A, et al. Human NK cell IFN-gamma production is regulated by endogenous TGF-beta. *Int Immunopharmacol* 2006;6:1020-8.
96. Allendorf JD, Bessler M, Whelan RL, et al. Postoperative immune function varies inversely with the degree of surgical trauma in a murine model. *Surg Endosc* 1997; 11:427–30.
97. Hildebrandt U, Kessler K, Plusczyk T, et al. Comparison of surgical stress between laparoscopic and open colonic resections. *Surg Endosc* 2003;17:242– 46.