

# Ertapenem ve Doripenemin İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinden Sitokin Salınımına Etkisi §

Emine YEŞİLYURT\*, Sevgi ÖZYEGEN ASLAN\*, Ayşe KALKANCI\*, Işıl FIDAN\*, M. Cihat OĞAN\*\*, Semra KUŞTİMUR\*

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı\*, Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi\*\*

## ÖZET

**Amaç:** Ertapenem ve doripenem karbapenem ailesinin yeni üyeleri olan ajanlardır. Antimikrobik ajanların etkinliği, yalnızca mikroorganizma üzerine direkt etkilerine değil, konağın immün sistem fonksiyonlarına da bağlıdır. Çalışmamızda, ertapenem ve doripenemin ısı ile inaktive edilmiş *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile uyarılmış insan mononükleer hücrelerinden sitokin üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Mononükleer hücreler ısı ile inaktive edilmiş mikroorganizmalarla uyarıldıktan sonra ertapenem ve doripenem hücre kültürüne eklenmiştir. İnkübasyondan sonra üst sıvıda interlökin-6 (IL-6), IL-10, IL-17, IL-23, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ 1) sitokin düzeyleri enzimle bağlanmış immünozorbent assay (ELISA) yöntemi ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** TGF- $\beta$  düzeyleri ertapenem ve doripenem içeren kuyucuklarda bu ajanları içermeyen kuyucuklara göre anlamlı düzeylerde artış göstermiştir. Diğer sitokinlerin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır.

**Sonuç:** TGF- $\beta$  immünregülatuar ve anti-inflamatuvar etkili bir sitokindir. TGF- $\beta$ 'nin ertapenem ve doripenemin anti-inflamatuvar etkisinin oluşumunda önemli bir rolü olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, ertapenem ve doripenemin direkt immünmodülatör etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ertapenem, doripenem, sitokin

## SUMMARY

**Influence of Ertapenem and Doripenem on Cytokine Secretion from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells**

**Objective:** Ertapenem and doripenem are the new members of the carbapenem family. Activity of antimicrobial agents depends not only on their direct effects on microorganisms, but also on the functional activity of the host immune system. In this study, it was aimed to investigate the effects of ertapenem and doripenem on cytokine secretion from human peripheral mononuclear cells stimulated with heat-inactivated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains.

**Materials and Methods:** Mononuclear cells were stimulated with heat-inactivated microorganisms, then ertapenem and doripenem were added on cell culture media. After incubation, interleukin (IL)-6, IL-10, IL-17, IL-23, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ 1) levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the culture supernatants.

**Results:** The levels of TGF- $\beta$  was found to be significantly increased in the wells that contained ertapenem and doripenem relative to the wells that did not contain these agents. There was no significant difference in the levels of the other tested cytokines.

**Conclusion:** TGF- $\beta$  is a potent cytokine with immunoregulatory and anti-inflammatory activities. It was determined that ertapenem and doripenem had direct immunomodulatory effects. Thus, it was suggested that TGF- $\beta$  might play a critical role in the anti-inflammatory effects of ertapenem and doripenem.

**Key words:** Ertapenem, doripenem, cytokine

**Alındığı tarih:** 19.03.2013

**Kabul tarihi:** 18.09.2013

**Yazışma adresi:** Işıl Fidan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler / Ankara

**e-posta:** isilfidan@yahoo.com

§ Bu çalışma "XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi"nde bildiri olarak sunulmuştur. (27-31 Ekim 2010 Girne, KKTC)

## GİRİŞ

Karbapenemler, ciddi enfeksiyonların tedavisinde güvenilir ve etkin olarak kullanılan güçlü, geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerdir. Karbapenem grubu antibiyotikler, hücre duvar sentezini inhibe eden ajanlardır<sup>(1)</sup>. AmpC ve genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamlara (ESBL) karşı stabil olmaları ile diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklerden ayrılırlar<sup>(2)</sup>. Türkiye’de imipenem, meropenem, doripenem ve ertapenem kullanılmakta olan karbapenem grubu antibiyotiklerdir<sup>(3)</sup>.

Doripenem ve ertapenem, parenteral olarak uygulanan karbapenem grubunun yeni üyeleri olan antimikrobik ajanlardır. Karbapenemler, özellikle genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (ESBL) üreten çok ilaca dirençli *Enterobacteriaceae* ailesi türlerine karşı etkili ilaçlardır<sup>(4)</sup>. Doripenem, parenteral 1- $\beta$ -metil karbapenem olup,  $\beta$ -laktamaz stabilitesi ve renal dihidropeptidaz inaktivasyonuna direnç özelliği vardır<sup>(5)</sup>. Ayrıca, imipenemden farklı olarak uygulama sırasında cilastatin eklenmesi gerekmez<sup>(1)</sup>. İmipeneme benzer şekilde gram-negatif ve gram-pozitif koklara karşı etkilidir ve meropeneme benzer şekilde gram negatif organizmalara etkinliği vardır. Geniş spektrumlu etkinliği ile gram pozitif bakterilere ve özellikle immünsupresif hastalarda enfeksiyonlara neden olan *Enterobacteriaceae* ailesi, anaerob bakteriler ve *Pseudomonas auroginosa* gibi non-fermentatif bakterilere karşı etkilidir<sup>(6,7)</sup>. Ertapenem uzun etkili parenteral grup 1 karbapenemdir. Komplike toplumdan kazanılmış enterik bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde önemli bir alternatiftir<sup>(4)</sup>. Ertapenem özellikle, ESBL üreten *Enterobacteriaceae* ailesi; doripenem çok ilaca dirençli *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı kullanılan karbapenemlerdir.

Enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin, konak immün yanıtı ve inflamatuar yanıtı etkiledikleri çeşitli çalışmalarda

gösterilmiştir<sup>(8)</sup>. Pek çok ajan antimikrobik etkileri yanında, immün sistemin komponentleri üzerine düzenleyici etkilere de sahiptir. Antibiyotiklerin immünmodulator etkileri; fagositoz, kemotaksis, endotoksin salınımı, tümörosidal etki ve sitokin üretimi üzerine arttırıcı veya azaltıcı etki şeklinde olabilir. Ayrıca, çeşitli çalışmalarda antimikrobik ajanların immün yanıtta görev alan pek çok hücreyi uyararak, fagositoz ve hücre içi öldürme kapasitesi gibi fonksiyonlarında arttırıcı etkiler oluşturduğu da gösterilmiştir<sup>(9)</sup>. Özellikle makrolid grubu antibiyotiklerin immün hücre fonksiyonunu ve doku inflamasyonunu düzenlediği ve bu şekilde immünmodulator etkileri olduğu belirlenmiştir<sup>(10)</sup>. Benzer şekilde,  $\beta$ -laktam antibiyotikler de bir yandan antibakteriyel etki gösterirken diğer yandan da immün hücre fonksiyonlarını etkileyerek immünmodulator etkiler de oluşturabilir<sup>(11)</sup>.

Çalışmamızda,  $\beta$ -laktam antibiyotik olan ve son yıllarda kullanıma giren ertapenem ve doripenemin ısıyla inaktive edilmiş farklı mikroorganizma türleri ile uyarılmış insan periferik kan mononükleer hücrelerinden (MNH) immün yanıtta önemli proteinler olan sitokin üretimi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu: MNH izolasyonu için heparinize kan örnekleri kullanıldı. Kan örnekleri sağlıklı kan vericilerinden elde edildi. İzolasyon “ficoll-hypaque density gradient centrifugation” yöntemi ile yapıldı. Ficoll-hypaque üzerine dilüe edilmiş kan örneği yayılıp, santrifüj edildi. Lenfositleri içeren buffy coat ayrı bir santrifüj tüpüne alındı ve fosfat buffer saline (PBS) tampon solüsyonu eklenip, santrifüj edildi. Lenfositlerin bulunduğu çökelti RPMI besiyeri ile süspanse edildi. Hücre canlılığı “trypan blue” yöntemi ile %95 olarak bulundu<sup>(12)</sup>.

**Mikroorganizma:** *P. aeruginosa* ATCC 15442 ve *Escherichia coli* ATCC 10536 suşları brain heart infusion broth (BHI) içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS içinde, yoğunluk  $10^8$  CFU/ml (colony forming unit) olarak ayarlandı. Isı ile inaktive edilmiş bakteri süspansiyonu elde etmek için  $100^\circ\text{C}$ 'da 30 dakika bekletildi.

**Hücre kültürü hazırlanması:** Periferik kan MNH'leri hücre kültürü kuyucuklarına  $2 \times 10^6$ /ml konsantrasyonda dağıtıldı. Isı ile inaktive edilmiş ( $10^8$  CFU/ml) mikroorganizma süspansiyonları da kuyucuklara eklendi. Periferik kan MNH'ler inaktive edilmiş mikroorganizmalarla uyarıldıktan sonra ertapenem ve doripenem ilave edildi. Kontrol kuyucukları olarak; yalnızca *E. coli* ve *P. aeruginosa* ve yalnızca doripenem ve ertapenem içeren kuyucuklar kullanıldı. Örnek ve kontrol kuyucuklarının her biri ikiye kuyucuk olarak çalışıldı. Plaklar %5  $\text{CO}_2$  etüvde 48 saat süre ile inkübe edildi. Plak içerikleri 24. ve 48. saatlerde tüpe aktarılıp, santrifüj edildi. Üst sıvı alınıp, sitokin düzeylerinin belirlenmesi için yapılacak ELISA çalışmasına kadar  $-30^\circ\text{C}$ 'da

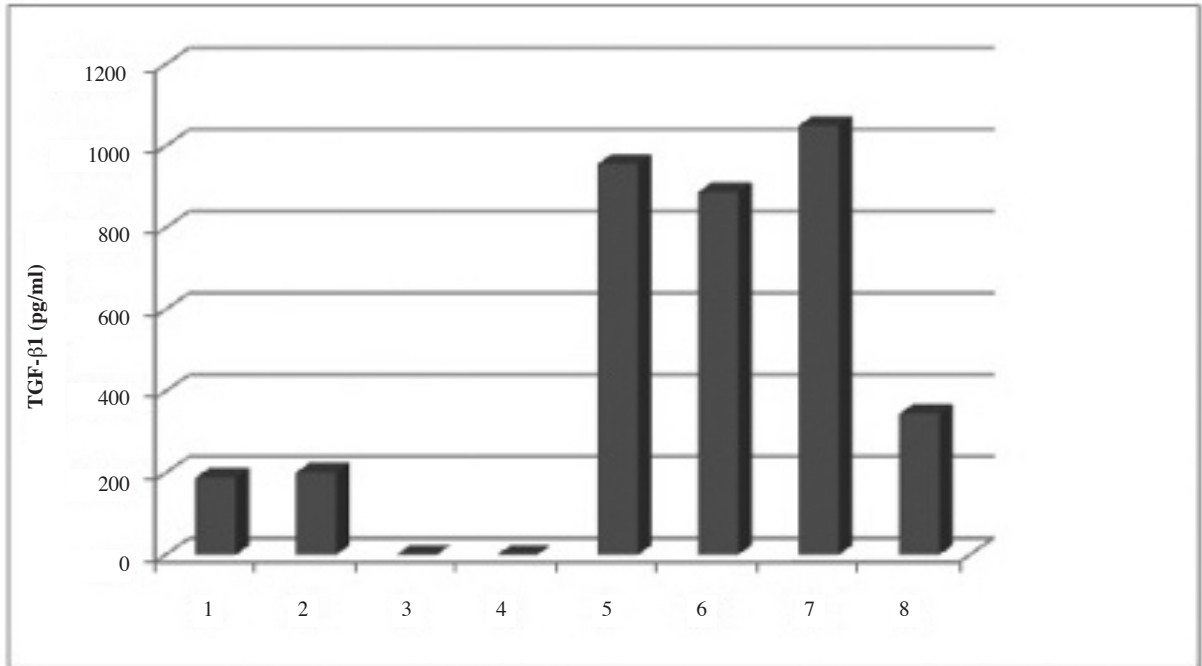
bekletildi<sup>(13)</sup>.

**Sitokin düzeyleri:** İnterlökin-6 (IL)-6, IL-10, IL-17, IL-23, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ 1), sitokinlerinin düzeyleri firmanın önerileri doğrultusunda ELISA yöntemi ile belirlendi (Biosource corp; MO, ABD). Sitokin düzeylerini belirlenmesinde, hücre kültürü örneklerinde çalışılmaya uygun kitler kullanıldı. Sitokin düzeyleri spektrofotometre ile 450 nm'de okunarak belirlendi. Sitokin standartları ile standart eğri çizilerek örneklerin sitokin konsantrasyonları belirlendi.

**İstatistiksel analiz:** Sonuçlar, tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Post Hoc analiz için Bonferroni testi kullanıldı ve  $p < 0.05$  olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

*E. coli* ve *P. aeruginosa* ile uyarılmış MNH



Şekil. Periferik kan mononükleer hücre kültürü süpernatantlarında TGF- $\beta$ 1 düzeyi (24. sa) (1: *E. coli*, 2: *P. aeruginosa*, 3: Doripenem, 4: Ertapenem, 5: *E. coli*+Doripenem, 6: *P. aeruginosa*+Doripenem, 7: *E. coli* + Ertapenem, 8: *P. aeruginosa*+Ertapenem).

kültürlerine ertapenem ve doripenem eklenmesi, bu antibiyotiklerin eklenmediği kuyucuklara göre TGF- $\beta$ 1 düzeylerinde hem 24, hem de 48. saatlerde artışa neden olmuştur ( $p < 0.05$ ). *E. coli* varlığında ertapenem ile TGF- $\beta$ 1 düzeylerindeki artış doripenem bulunan örneklerden daha fazla olmuş ama aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). *P. aeruginosa* ise doripenem varlığında TGF- $\beta$ 1 düzeylerinde daha fazla artışa neden olmuş ve bu artış ertapenem bulunan örneklerle göre istatistiksel olarak daha anlamlı düzeylere ulaşmıştır ( $p < 0.05$ ).

Çalışmamızda, *E. coli* ve *P. aeruginosa* ile uyandırılmış MNH kültürlerine doripenem ve ertapenemin eklenmesi hem 24. hem de 48. saatlerde incelediğimiz diğer sitokinler olan IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23 düzeylerinde antimikrobiyal ajanların eklenmediği örneklerle göre anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

## TARTIŞMA

Antibiyotiklerin direkt antimikrobik etkileri yanında bazı antibiyotiklerin anti-inflamatuvar etkiler oluşturabileceği konusu araştırmalarda önem kazanmaya başlamıştır. Günümüzde, özellikle makrolid grubu antibiyotiklerin konak immün hücre fonksiyonlarını düzenlediği ve pro-inflamatuvar mediatör birikimini azaltarak, immünmodulator etkiler oluşturduğu tanımlanmıştır<sup>(10)</sup>.

İmipenem ve meropenem gibi karbapenem grubu antimikrobik ajanların sitokin salınımı üzerine etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle insanlarda diğer karbapenem grubu antimikrobik ajanların sitokin profili üzerine etkileri konusunda çalışmalar yeterli sayıda değildir. Bu nedenle çalışmamızda, doripenem ve ertapenem antibiyotiklerin insan MNH kültürlerinde sitokin profilinde oluşturduğu değişikliklerin incelenmesi amaçlanmış ve bu amaçla in vitro MNH

kültürü ortamında bazı pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımında oluşan değişiklikler incelenmiştir.

Doripenem ve ertapenemin insan MNH'lerden sitokin salınımı üzerine olan etkilerini araştırdığımız çalışmamızda, incelenen sitokinlerden IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , düzeylerinde, her iki antibiyotiğin de belirgin değişikliğe neden olduğu belirlenemezken, insan MNH'lerden TGF- $\beta$ 1 salınımı bu ajanların varlığında artış göstermiştir.

Yardımcı T hücreleri (Th), antijen sunucu hücreler aracılığıyla antijeni tanıyarak, immün yanıtın başlamasında anahtar rol oynayan hücrelerdir. Ürettikleri sitokinler aracılığıyla Th1, Th2, Th17 alt gruplarına ayrılırlar. Th1 yanıtı IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokin üretimiyle, Th2 yanıtı ise IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  gibi anti-inflamatuvar sitokin salınımı ile ilişkilidir<sup>(14)</sup>.

Vianna ve ark.<sup>(15)</sup>, imipenem ve siprofloksasin-klindamisin kombinasyonu verilen sepsis geliştirilmiş farelerde, antibiyotik uygulamasının TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde azalma, IL-10 konsantrasyonunda ise 24 saat sonra bir artış oluşturduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda doripenem ve ertapenem bu sitokin düzeyleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

Brooks ve ark.<sup>(11)</sup>, seftazidim, seftriakson ve penisilin V gibi  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin IFN- $\gamma$  aktivitesi üzerine güçlü inhibitör etkisi olduğunu, meropenemin ise çok küçük değişiklikler oluşturduğunu gözlemlemiştir. Çalışmamızda doripenem ve ertapenem IFN- $\gamma$  üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

Buijs ve ark.<sup>(16)</sup>, deneysel olarak sepsis geliştirilmiş farelerde kuyruk veninden meropenemin sürekli olarak infüzyonunun pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve IL-6 serum düzeylerinde

artışa neden olduğunu ve sepsis patogenezinde önemli bir aracı olan endotoksin konsantrasyonu ile sitokin üretimi arasındaki ilişki nedeniyle sepsiste uygulanacak antibiyotik türü ve dozunun oldukça önemli olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri doripenem ve ertapenem varlığında bir artış göstermemiştir. Ancak, çalışmamızda 24. ve 48. saatlerdeki düzeylere bakılmıştır. Buijs ve ark.'nın<sup>(16)</sup> çalışmasında yapıldığı gibi antibiyotiklerin sürekli ve daha uzun süre uygulanmasının hücre kültürü ortamında bu sitokinlerin salınımında değişikliklere neden olabileceği düşünülmektedir.

Coopersmith ve ark.<sup>(17)</sup>, farelerde *P. aeruginosa* sepsis modelinde imipenemin pro-inflamatuvar sitokin salınımının baskılandığını ve farelerde yaşam süresini uzattığını belirlemiştir.

Maksin ve ark.<sup>(18)</sup>, gram-negatif nozokomiyal pnömonili hastalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde, imipenem tedavisi sonrasında anlamlı bir değişiklik gözlenmediğini bildirmiştir. Biz de çalışmamızda bu sitokin düzeylerinde doripenem ve ertapenem uygulaması sonrası belirgin bir farklılık gözlemedik.

Ziegeler ve ark.<sup>(19)</sup>, in vitro yaptıkları bir çalışmada, karbapenem grubu antibiyotiklerden olan imipenem bulunan kültür süpernatantlarında TNF- $\alpha$  ve IL-10 sitokin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik görülmediğini bildirmiştir.

Hilliard ve ark.<sup>(20)</sup> yaptıkları hayvan deneyinde, *Klebsiella* ile deneysel olarak solunum yolu enfeksiyonu oluşturdukları farelerde doripenem uygulamasının IL-10 sitokin düzeylerinde artışa neden olduğunu belirlemiş ve bu şekilde doripenemin anti-inflamatuvar yanıtı uyararak, akciğer hasarında azalmaya neden olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda doripenem ve ertapenem, ince-

lenen sitokinlerden yalnızca TGF- $\beta$ 1 düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. TGF- $\beta$ 1, konak savunmasında önemli rol oynayan, çok fonksiyonlu, güçlü bir immünregülatör sitokindir<sup>(21)</sup>. Anti-inflamatuvar ve immünsupresif özelliklere sahiptir ve inflamatuvar olayları inhibe eder<sup>(22,23)</sup>. Çalışmamızda, doripenem ve ertapenemin TGF- $\beta$ 1 düzeylerinde artışa neden olması, bu ajanların anti-inflamatuvar etkilerinin oluşumunda bu sitokinin etkin rol oynadığını düşündürmüştür. Olasılıkla, doripenem ve ertapenem bu şekilde immünmodülatör etkiler oluşturarak enfeksiyonların tedavisinde daha etkin rol oynayabilir.

Karbapenem grubu antibiyotiklerin immünmodülatör etkilerinin araştırılmasında genellikle meropenem ve imipenem kullanımıyla ilgili çalışmalar vardır. Çalışmamızın doripenem ve ertapenemin immünmodülatör etkilerinin araştırıldığı az sayıda çalışmalardan biri olması nedeniyle önemli olduğunu düşünmekteyiz. Ancak, çalışmamızın bu grup ilaçları kullanan hastalarda ve daha geniş kapsamlı olarak devam ettirilmesi önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, ertapenem ve doripenemin antimikrobik etkileri yanında, mikroorganizma ile uyarılmış periferik kan MNH'leri üzerine immünmodülatör etkiye sahip olabileceği ve özellikle anti-inflamatuvar etkilerinde bu mekanizmanın etkin rol oynayabileceği düşünülmüştür. Doripenem ve ertapenemin immün sistemin diğer komponentlerine olan etkilerinin belirlenmesi, özellikle sepsis ve kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisi için etkili bir ajan olmalarını sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Walsh F. Doripenem: a new carbapenem antibiotic a review of comparative antimicrobial and bactericidal activities. *Ther Clin Risk Manag* 2007; 3:789-94.
2. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:4943-60.

- <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
3. **Mülazımoğlu L.** 1986'dan günümüze karbapenemler. *ANKEM Derg* 2010; 24(Ek 2):E33-5.
  4. **Yan JJ, Wu JJ, Lee CC, Ko WC, Yang FC.** Prevalence and characteristics of ertapenem-nonsusceptible *Escherichia coli* in Taiwanese university hospital, 1999 to 2007. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:1417-25.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-1020-1>
  5. **Credito KL, Ednie LM, Appelbaum PC.** Comparative antianaerobic activities of doripenem determined by MIC and time-kill analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:365-73.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00910-07>
  6. **Betriu C, Gómez M, López-Fabal F, Culebras E, Rodriguez-Avial I, Picazo JJ.** Activity of doripenem against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:1179-81.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-0974-3>
  7. **Overturf GD.** Doripenem: An early look at a carbapenem not yet approved for pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29:163-5.  
<http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3181c9c118>
  8. **Fischer S, Adam D.** Effects of moxifloxacin on neutrophil phagocytosis, burst production, and killing as determined by a whole-blood cytofluorometric method. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2668-9.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.9.2668-2669.2001>
  9. **Özkan S, Fidan I, Yüksel S, İmir T.** Telitromisinin insan polimorf nüveli lökosit fonksiyonları üzerine etkisinin in-vitro araştırılması. *ANKEM Derg* 2006; 20:229-32.
  10. **Buret AG.** Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilmicosin. *Can J Vet Res* 2010; 74:1-10.
  11. **Brooks BM, Hart CA, Coleman JW.** Differential effects of  $\beta$ -lactams on human IFN- $\gamma$  activity. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:1122-5.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki373>
  12. **Kanof ME, Smith PD, Zola H.** Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol* 2001; Chapter 7:Unit 7.1.  
doi: 10.1002/0471142735.im0701s19.  
<http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im0701s19>
  13. **O'Mahony L, O'Callaghan L, McCarthy J, et al.** Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G839-45.  
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00112.2005>
  14. **Mak TW, Saunders ME.** The immune response. Basic and clinical principles. 5th ed. Cambridge: Elsevier Academic Press, 2006.
  15. **Vianna RC, Gomes RN, Bozza FA, et al.** Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. *Shock* 2004; 21:115-20.  
<http://dx.doi.org/10.1097/01.shk.0000111828.07309.26>
  16. **Buijs J, Dofferhoff AS, Mouton JW, van der Meer JW.** Continuous administration of PBP-2- and PBP-3-specific beta-lactams causes higher cytokine responses in murine *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* sepsis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:926-33.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm073>
  17. **Coopersmith CM, Amiot DM 2nd, Stromberg PE, et al.** Antibiotics improve survival and alter the inflammatory. *Shock* 2003; 19:408-14.  
<http://dx.doi.org/10.1097/01.shk.0000054370.24363.ee>
  18. **Maskin B, Fontán P, Spinedi EG, Gammella D, Badolati A.** Evaluation of endotoxin release and cytokine production induced by antibiotics in patients with gram-negative nosocomial pneumonia. *Crit Care Med* 2002; 30:349-54.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00003246-200202000-00014>
  19. **Ziegeler S, Raddatz A, Hoff G, et al.** Antibiotics modulate the stimulated cytokine response to endotoxin in a human ex vivo, in vitro model. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006; 50:1103-10.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-6576.2006.01112.x>
  20. **Hilliard JJ, Melton JL, Hall L, et al.** Comparative effects of carbapenems on bacterial load and host immune response in a *Klebsiella pneumoniae* murine pneumonia model. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:836-44.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00670-10>
  21. **Cerwenka A, Swain SL.** TGF- $\beta$ 1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes Infect* 1999; 1:1291-6.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)00255-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(99)00255-5)
  22. **Dinarelli CA.** Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 2007; 37(Suppl 1):S34-45.  
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737772>
  23. **Sivalingam SP, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C, Fong KY.** In vivo pro and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36:96-9.