

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**SEPSİSTE NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B VE TNF-ALFA
GEN VARYANTLARININ VE TNF-ALFA SERUM
DÜZEYİNİN İNCELENMESİ**

LEYLA ACAR

**DANIŞMAN
PROF.DR.H.ARZU ERGEN**

**MOLEKÜLER TIP ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

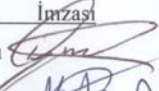
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Leyla ACAR tarafından hazırlanan Sepsiste Nükleer Faktör Kappa B ve TNF-alfa Gen Varyantlarının ve TNF-alfa Serum Düzeyinin İncelenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

17 / 06 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

- | | | |
|-----------------------------------|--|---|
| 1.Prof. Dr. İlhan YAYLIM | DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı |  |
| 2. Prof. Dr. Hulya YILMAZ AYDOĞAN | DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı |  |
| 3.Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU | DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı |  |
| 4.Prof. Dr. H.Arzu ERGEN | DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı |  |
| 5.Doç. Dr. Uzay GÖRMÜŞ | İst Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

LEYLA ACAR

İTHAF

Bu tezi sevgili Anne ve Baba'ma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum, bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan, insani ve ahlaki değerleriyle de örnek edindiğim, danışmanlığımı üstlenen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Arzu Ergen'e, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a, beni kendi öğrencilerinden ayırmayan, değerli hocam Prof. Dr. Sadrettin Pençe'ye ve tüm kıymetli hocalarıma, tez çalışmam için hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ve klinik süreçteki değerlendirmelerle alakalı destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Nazan Atalan'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, yardım ve desteklerini gördüğüm arkadaşarımdan; PhD. Canan Cacına'ya, PhD. Özlem Timirci Kahraman'a, PhD. Özlem Küçükhüseyin'e, MSc. Saime Turan'a, Mol. Bio Sibel Şabançelebi'ye, Bio. Betül Çevik'e,

Attığım her adımda hiçbir özveriden kaçınmayarak bana her zaman destek olan aileme, özellikle hayatım boyunca yol haritam olan sevgili babam Muhiddin Acar'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41743

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı.....	19
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
3.3. Kullanılan Gereçler	19
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	20
3.4.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	20
3.4.1.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X).....	20
3.4.1.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	20
3.4.1.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	20
3.5. Kullanılan Kitler	20
3.6. Kullanılan Yöntemler.....	20
3.6.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	20
3.6.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği ve Hazırlık Aşaması.....	21
3.6.1.2. Kan Örneklerinden Lizat Hazırlanması	21
3.6.1.3. DNA'ya Bağlanma.....	21
3.6.1.4. DNA Yıkama Aşaması.....	21
3.6.1.5. DNA Elüsyon Aşaması	22
3.6.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	22

3.6.3. Gen Polimorfizmlerinin Tespiti	22
3.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı	23
3.6.3.2. PZR Karışımının Hazırlanışı.....	23
3.6.3.3. NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF α (-308 G/A) Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	24
3.6.3.4. NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF α (-308 G/A) PCR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi ve PCR Ürünlerinin Kontrolü.....	25
3.6.3.5. NFkB1 -94 ins/del ATTG Polimorfizmi Tespiti İçin Restriksiyon Enzimi Kesimi	26
3.6.3.6. TNF α (-308 G/A) Polimorfizmi Tespiti İçin Restriksiyon Enzimi Kesimi .	27
3.6.5.Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	30
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	46
ETİK KURUL KARARI	54
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLOLAR LISTESİ

Tablo 2-1: Sepsis Tanı Kriterleri.....	4
Tablo 2-2: Sepsiste predispozan faktörler.....	8
Tablo 3-1: NFkB1 -94 ins/del ATTG için PZR karışımının hazırlanması.....	23
Tablo 3-2: TNF α (-308 G/A) için PZR karışımının hazırlanması.....	24
Tablo 3-3: NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmine ait amplifikasyon şartları.....	25
Tablo 3-4: TNF α (-308 G/A) polimorfizmine ait amplifikasyon şartları.....	25
Tablo 3-5: Van91I enzimi için kesim protokolü.....	26
Tablo 3-6: NcoI enzimi için kesim protokolü.....	27
Tablo 4-1: Çalışma grubuna ait biyokimyasal ve demografik parametreler.....	31
Tablo 4-2: Hasta grubuna özgü demografik parametreler.....	33
Tablo 4-3. Çalışma gruplarında NFkB1 -94 ins/delpolimorfizmi genotip ve allel dağılımları.....	34
Tablo 4-4. Çalışma gruplarında TNF α (-308 G/A)polimorfizmi genotip ve allel dağılımları.....	35
Tablo 4-5. Çalışma gruplarında serum TNF- α düzeyleri.....	35
Tablo 4-6.Çalışma gruplarında NFkB1 -94 ins/delve TNF- α (-308 G/A) genotip ve allel dağılımlarına göre serum TNF- α düzeyleri.....	36
Tablo 4-7:Enfeksiyon parametreleri ve gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin hasta grubunda gösterilmesi.....	38
Tablo 4-8. Hasta grubunda enfekte ajan tipine göre serum TNF- α düzeyleri.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Sepsis, Enfeksiyon ve SIRS ilişkisi.....	5
Şekil 2-2: LPS, TNF ve IL-1 ile uyarılabilen klasik NFkB yolağı ve inhibitörleri.....	13
Şekil 2-3: Farklı indüksiyon ajanları ile klasik ve alternatif NFkB sinyal yolağı.....	14
Şekil 3-1: NFkB1 94ins/del gen polimorfizmine ait %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	27
Şekil 3-2: TNF-alfa geninde promotor bölgedeki 308. nukleotiddeki G / A tek nukleotid değişiminin ait % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	29
Şekil 4-1: Hasta grubunda NFkB1 -94 ins/del polimorfizmi genotip dağılımlarına göre serum TNF- α düzeylerinin şematik gösterimi.....	37
Şekil 4-2: Hasta grubunda TNF- α (-308 G/A) polimorfizmi genotip dağılımlarına göre serum TNF- α düzeylerinin şematik gösterimi.....	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

SIRS: Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu
 TLR: Toll-Like Reseptörler
 TNF: Tümör Nekrosis Faktör
 SIRS: Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu
 MODS: Multiple Organ Disfonksiyonu Sendromu
 ACCP: Amerikan Göğüs Hastalıkları Derneği
 SD: Standart sapma
 OAB: Ortalama arter basıncı
 SvO₂: Mikst venöz oksijen satürasyonu
 PaO₂: Parsiyel arteryel oksijen basıncı
 FiO₂: İnspiratuar oksijen fraksiyonu
 INR: İnternasyonal normalize edilmiş oran
 aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı.
 SCCM: Yoğun bakım derneği
 DIK: Dissemine intervasküler koagülasyon
 DM : Diabetes Mellitus
 KBY: Kronik Böbrek Yetmezliği
 KKY: Konjestif Kalp Yetmezliği
 IL: İnterlökin
 PAF: Platelet Aktive Edici Faktör
 GM-CSF: Granülosit Monosit Koloni Stimulan Faktör
 LPS: Lipoprolisakkarid
 TRAF: TNF Receptor-Associated Factors
 NF-κB: nuclear factor-κB
 IFN: type I interferon
 IκB: inhibitör κB
 BAFF: B cell-activating factor of the TNF family
 c- IAP: c- inhibitors of apoptosis
 D: delesyon alleli
 DD: delesyon/ delesyon genotipi
 del: delesyon

DNA: Deoksiribonükleik Asit
dNTD: Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA : Etilendiamintetraasetik Asit
ELISA: Enzim bağı immün assay
FADD: Fas assosiye ölüm domaini
I : İnsersiyon alleli
II : İnsersiyon/ insersiyon genotipi
ICAM-1: Hücrelerarası adezyon molekülü
IFN- : İnterferon
IL- : İnterlökin
I κ B: İnhibitör kappa B
I κ K :İnhibitör kappa kinaz
İns : İnsersiyon
IP-10: Human interferon-inducible protein 10
OD: Optik yoğunluk
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RH: Rel homoloji
TACE: TNF- alpha converting enzyme
TNFR: TNF reseptörü
TRADD: TNF reseptör assosiye ölüm domain
TRAF: TNF reseptör assosiye faktör
UV: Ultraviyole
VCAM-1: Vasküler adezyon molekülü-1
BPI: Permeabilite artırıcı protein
LT β : Lenfotoksin Beta

ÖZET

Acar L (2015). Sepsiste Nükleer Faktör Kappa B ve TNF-alfa Gen Varyantlarının ve TNF-alfa Serum Düzeyinin İncelenmesi İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sepsis, bir çok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden öldürücü bir enfeksiyon hastalığıdır. Yapılan araştırmalarda dokularda oluşan enfeksiyon ve travmatik hasar sonucu vücutta hümmoral sistemin aktive olduğu ve çeşitli sitokinlerin salındığı gösterilmiştir. Nükleer Faktör Kappa B (NFkB) genleri tarafından kodlanan NFkB dimerleri, inflamasyonda rol oynayan ve aralarında Tümör nekrosis faktör-alfa (TNF- α)'nın da yer aldığı bir dizi proteinin transkripsiyonunu düzenleyen bir ailedir. Çalışmamızda NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) gen polimorfizmlerinin ve TNF- α serum düzeyinin incelenerek, hem bu polimorfizmlerinin TNF- α düzeylerine olan etkisi hem de sepsiste klinik ve prognostik parametrelerle birlikte ele alınarak olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla 72 sepsis hastası ve 104 sağlıklı kontrolde NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) gen polimorfizmlerini saptamak için PCR-RFLP ve TNF- α serum düzeylerini incelemek için ELISA teknikleri kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda çalışma grupları arasında her iki polimorfizm açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). Serum TNF- α düzeyleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak, çalışmamız her iki polimorfizm açısından da sepsis vakalarında ülkemizde yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Yaptığımız deneysel çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgular her iki polimorfizm ile sepsis riski arasında bir ilişki olmadığını ancak TNF α (-308 G/A) polimorfizmi açısından ise AA genotip ve A allelinin hastalarda artmış TNF- α düzeyleri ile ilişkili olduğunu öngörmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, inflamasyon, gen polimorfizmi, NFkB1 -94 ins/del ATTG, TNF α (-308 G/A)

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41743

ABSTRACT

Acar L (2015). The investigation of TNF-alpha and Nuclear Factor-Kappa B Gene Variants and of TNF-alpha Serum Levels in Sepsis. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Molecular Medicine. Master's of Science Thesis. Istanbul.

Sepsis is a multisystem disease, typically leading to hemodynamic changes, shock, organ dysfunction and organ failure and can be life threatening. Studies showed that humoral system is activated and various cytokines are released due to infections in tissues and traumatic damage. Nuclear Factor-Kappa B (NFkB) dimers are encoded by NFkB genes and regulate transcription of several crucial proteins of inflammation such as Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). In this study it was aimed to investigate the possible effect of polymorphisms on TNF- α serum levels with clinic and prognostic parameters of sepsis by determining the NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) gene polymorphisms and TNF- α serum levels. Thereby, 72 sepsis patients and 104 healthy controls were included to this study. In order to determine the polymorphisms of NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A), the PCR-RFLP method was performed and serum TNF- α levels were measured by Elisa technique. No statistically significant differences were found in these two polymorphisms between patient and control groups ($p < 0,05$). We did not observe any significant differences of serum TNF- α levels between study groups. Finally, this is the first study on these two polymorphisms conducted on sepsis patients in our country. Our results showed no association between sepsis risk and these polymorphisms. On the other hand, the AA and A alleles of the TNF- α (-308 G/A) polymorphism may be used as a predictor of elevated TNF- α levels in sepsis patients.

Key words: Sepsis, inflammation, gene polymorphism, NFkB1 -94 ins/del ATTG, TNF α (-308 G/A)

Istanbul University Scientific Research Projects Unit supported this study. Project No: 41743

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis, mikroorganizma ile vücudun bağışıklık, inflamasyon ve koagülasyon sistemlerinin etkileşimi sonucu birçok organı etkileyen, hemodinamik değişikliklere yol açan, şok ve organ yetmezliğine ilerleyerek ölüme neden olan klinik bir tablodur. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, sepsiste oluşan patolojik olayların birçoğunun anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Sepsis patogenezinin açıklığa kavuşturulması tanı, takip ve tedavi aşamalarındaki yeni gelişmeler açısından oldukça önemlidir. Yapılan araştırmalarda dokularda oluşan enfeksiyon ve travmatik hasar sonucu vücutta hümmoral sistemin aktive olduğu ve çeşitli sitokinlerin salındığı gösterilmiştir (1-3).

Nükleer faktör kappa B (NFkB) ailesi karsinogenez, hücre büyümesi, apoptozis, immün yanıt, inflamasyon, gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan bir grup transkripsiyon faktöründen oluşur. Çeşitli intrensek ve ekstrensek uyarılar ile aktif hale gelen NFkB, çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenlemekte ve aralarında TNF- α 'nın da bulunduğu sitokinler, kemokinler, immünglobulinler ve hücre adezyon molekülleri gibi bir dizi proteinin ekspresyonunu artırarak kronik inflamatuvar hastalıkların ortaya çıkış ve seyrinde önemli rol oynamaktadır. NFkB1 geninin promotor bölgesindeki bazı polimorfizmlerin kronik inflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemli olabileceği gösterilmiş ve bu polimorfizmlerden fonksiyonel olarak en önemlisi de -94 ins/del ATTG promotor polimorfizmidir (4).

Tümör nekrozis faktör (TNF- α) transkripsiyonu NFkB tarafından kontrol edilen bir sitokindir ve doğal immünite, kazanılmış immünite, hücre proliferasyonu ve apoptozis gibi bir dizi olayda rol oynamaktadır (5). TNF'nin alfa ve beta olmak üzere iki yapısal formu mevcut olup TNF-alfa çoğunlukla monosit/makrofajlardan, TNF-beta ise çoğunlukla T lenfositler ve doğal öldürücü hücrelerden salınmaktadır. TNF-alfa'nın daha çok iltihabi olaylarda önemli rol oynadığı, enfeksiyöz ajan varlığında veya doku hasarında 4- 8 saat içinde TNF artışı gözlenip 16- 24 saatte en üst düzeye ulaştığı ve uyarının devamlılığına göre sekresyonun devam ettiği rapor edilmektedir (6). TNF- α geni 6. kromozomun kısa kolunda lokalizedir (7). Genin promotor bölgesinin pozisyon -308'de guaninin adeninle yer değiştirdiği tek bir baz değişiminin olduğu tanımlanmıştır. Bir çok çalışma göstermiştir ki mutant allelin fonksiyonel varyantı A-308 alleli tarafından genin transkripsiyonel aktivitesini artırır . TNF- α A alleli, G alleleline göre daha güçlü transkripsiyonel aktivatördür ve yüksek TNF- α düzeylerine neden olur (8).

G alleli çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (9). Septik olgularda ise TNF- α düzeyinin hipotansiyon ve organ yetmezliğinin derecesi ile doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır (10).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF α (-308 G/A) gen polimorfizmlerinin ve TNF- α serum düzeyinin incelenerek, hem bu polimorfizmlerinin TNF- α düzeylerine olan etkisi hem de sepsiste klinik ve prognostik parametrelerle birlikte ele alınarak olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis ve Sepsisle İlgili Tanımlar

Sepsis; Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS)'ndan, Septik Şok ve Multiple Organ Disfonksiyonu Sendromu (MODS)'na kadar giden, konağın mikroorganizmaya vermiş olduğu sistemik inflamatuvar bir yanıt olarak tanımlanır (11,12). Sepsis ve benzeri klinik tablolar için tanımlama ve derecelendirme yapmak kolay olmayıp tanımlanması, izlenimi ve tedavisinde belli kriterlerin oluşturulması için, 1991 yılında Amerikan Göğüs Hastalıkları Derneği (ACCP) ve Yoğun Bakım Derneği'nin (SCCM) katılımıyla gerçekleştirilen toplantıda, bir araştırma takvimi oluşturmaya karar verilmiştir (13). Son olarak 2005 yılında yapılan düzenlemelerle, sepsis ve benzeri klinik tabloların tanısının en doğru şekilde ortaya konulması için tanımlamalar yeniden düzenlenmiş ve ortak parametreler ortaya konulmuştur (14). En güncel sepsis tanı kriterleri Tablo 2-1 'de gösterilmiştir (15).

Tablo 2-1: Sepsis Tanı Kriterleri (15)**Genel Kriterler:**

- a. Ateş ($> 38,3^{\circ}\text{C}$)
- b. Hipotermi ($< 36^{\circ}\text{C}$)
- c. Kalp hızı $> 90/\text{dakika}$ veya > 2 SD (yaşa göre)
- d. Takipne
- e. Bilinç değişiklikleri, belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte > 20 mL/kg)
- f. Hiperglisemi (diyabeti olmayan bir hastada plazma glikoz düzeyi > 120 mg/dL veya $7,7$ mmol/L)

İnflamasyon Belirteçleri

- a. Lökositoz (Lökosit sayısı $> 12,000/\text{mm}^3$)
- b. Lökopeni (Lökosit sayısı $< 4000/\text{mm}^3$)
- c. Normal lökosit sayısı ve immatür formlarının $\%10$ 'dan fazla olması
- d. Plazma C-reaktif protein > 2 SD
- e. Plazma prokalsitonin > 2 SD

Hemodinamik Belirteçler

- a. Arteriyel hipotansiyon (sistolik kan basıncı < 90 mmHg, OAB < 70 veya sistolik kan basıncında 40 mmHg'dan fazla düşme veya yaşa göre normal değerlerin 2 SD altına düşmesi)
- b. SvO₂ $> \%70$
- c. Kardiyak indeks $> 3,5$ L/dakika

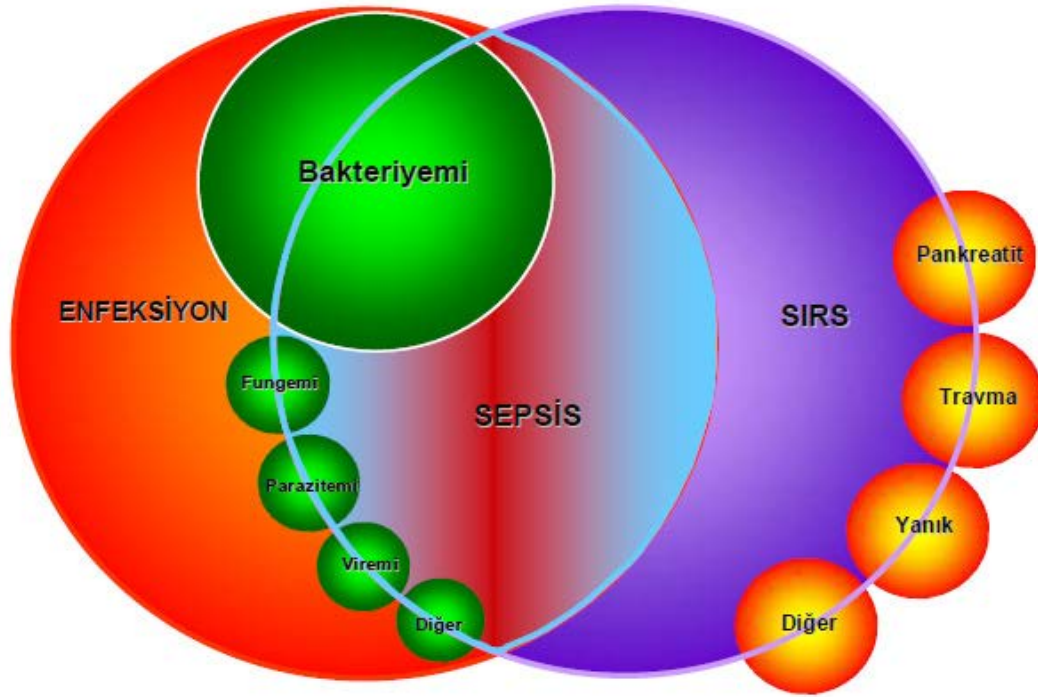
Organ Fonksiyon Bozuklukları

- a. Arteriyel hipoksi (PaO₂/FiO₂ > 300)
- b. Akut oligüri (idrar çıkışı $< 0,5$ mL/kg/saat veya 45 mL en az iki saat)
- c. Kreatinin artışı $> 0,5$ mg/dL
- d. Koagülasyon bozuklukları (INR $> 1,5$ veya aPTT > 60 saniye)
- e. İleus (bağırsak seslerinin olmaması)
- f. Trombositopeni (trombosit sayısı $< 100.000/\text{mm}^3$)
- g. Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin > 4 mg/dL veya 70 mmol/L)

Doku Perfüzyonu

- a. Hiperlaktatemi (> 1 mmol/L)
- b. Kapiller geri dolumda azalma

SD: Standart sapma, OAB: Ortalama arter basıncı, SvO₂: Mikst venöz oksijen satürasyonu, PaO₂: Parsiyel arteriyel oksijen basıncı, FiO₂: İnspiratuar oksijen fraksiyonu, INR: İnternasyonal normalize edilmiş oran, aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı.



Şekil 2-1: Sepsis, Enfeksiyon ve SIRS ilişkisi (13)

Enfeksiyon: Mikroorganizmaların, normalde steril konak dokularda bulunması veya dokulara invazyonu sonucu gelişen bir inflamatuvar yanıttır (Şekil 2-1) (13).

Bakteriyemi: Canlı bakterinin dolaşımda olması. Bakteriyemi tanısı kan kültür pozitifliği ile konur (Şekil 2-1) (13).

Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS): SIRS tanısı koyabilmek için aşağıdaki bulgulardan iki veya daha fazlasının mevcut olması gereklidir (13).

Vücut ısısının $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$ olması

Kalp atım hızının $>90/\text{dk}$ olması

Solunum hızının $>20/\text{dk}$ veya $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$ olması

Lökosit sayısının $>12\ 000/\text{mm}^3$ veya $<4\ 000/\text{mm}^3$ olması veya periferik yaymada % 10'un üzerinde band formunun bulunması.

Ciddi Sepsis: Sepsise organ disfonksiyonu veya hipoperfüzyonun eşlik etmesi durumu "Ciddi Sepsis" olarak tanımlanmaktadır (16). Ciddi sepsiste gözlenen hipotansiyonun,

sistolik kan basıncının 90 mmHg'dan küçük olması veya başlangıca göre 40 mmHg azalmış olması durumudur.

Septik Şok: Sepsise bağlı hipotansiyonun uygun sıvı replasmanına rağmen düzeltilememesi “Septik Şok” olarak tanımlanmaktadır. Septik şok ile birlikte organ disfonksiyonu ve hiperperfüzyona bağlı oligüri, laktik asidoz veya mental durum değişiklikleri gibi anormallikler gelişebilmektedir (16).

Refrakter Septik Şok: Yeterli sıvı replasmanına ve farmakolojik vazopressör ve inotrop destek tedavisine rağmen 1 saatten daha fazla süren hipotansiyon durumudur.

Çoklu Organ Yetmezliği Sendromu (MOF): Sepsis sonucu en az 24 saatlik bir dönemde üç veya daha fazla organda yetmezlik görülmesi durumudur (14). Sepsis, septik şok ile birlikte bozulmuş organ fonksiyonu, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği, erişkin solunum yetmezliği sendromu (ARDS) ve yaygın damar içi pıhtılaşma (dissemine intervasküler koagülyasyon; DIK) gibi klinik durumlar görülür (17).

2.2. Sepsis Etiyolojisi

Etiyolojide en sık rol alan ajanlar bakteriler olup virüs, parazit, mantar enfeksiyonlarında sepsis veya septik şoka neden olabilmektedir (18). Önceki yıllarda gram negatif bakteriler yüksek oranda iken, daha sonraki yıllarda gram pozitif bakterilerin öne çıktığı saptanmıştır. Son 20 yılda mantar enfeksiyonlarında % 207' lik bir artış olmuştur (19). Sepsis hastane içi yada hastane dışında gelişmiş olmasına göre sepsise neden olan mikroorganizmalar farklılık gösterip ve en çok rastlanan mikroorganizmalar; Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli ve Staphylococcus aureus'tur (20). Antibiyotiklerin kullanım sıklığına bağlı olarak 1950 yıllarında gram pozitif bakteriler ön planda iken tedaviler geliştirilerek 1980'li yıllarda ise gram negatif bakterilerin ön plana çıktığı görülmektedir (20). Gram negatif bakteriyel sepsislerde en sık rastlanılan etkenler arasında; E. coli, Enterobacter spp., Pseudomonas spp., Proteus spp., Acinetobacter spp. ve Klebsiella spp.'dir. Gram pozitif bakteriyel sepsislerde ise; koagülaz negatif stafilokoklar, S. aureus ve enterokok türleri en sık etkenler olarak izole

edilmektedir (20). Ciddi sepsis ve septik şok vakalarının %5'inde etken mantarlardır. Fungal sepsislerde genellikle kandida türleri etkindir. Bu kandida türleri ABD'de nazokomiyal enfeksiyonlarda en sık görülen 4. patojendir ve tüm patojenler arasında %40 ile en yüksek mortaliteye sahiptir. Fungal sepsisin insidansı 1979-2000 yılları arasında 3 kat artış göstermiştir (21). Bu durumu hazırlayan risk faktörleri arasında uzun süre geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, parenteral hiperalimentasyon, intravasküler kateter uygulaması ve kortikosteroid tedavisi sayılabilir (22, 23).

2.3. Sepsis Epidemiyolojisi

Sepsis gelişen hastalarda genellikle temelinde başka bir hastalık olduğu için ve klinik bulgulardan en az sepsis kadar bu hastalıkta sorumlu olabileceği için sepsis tanısının konması güçtür ve insidansı tam olarak saptanamamaktadır.

ABD'de her yıl 750.000 hastada sepsis gelişir ve bunun da yaklaşık 200.000'inin ölümcül olduğu farzedilmektedir (24). 2002 yılında 24 Avrupa ülkesinde yapılan, 198 yoğun bakım ünitesini içeren bir çalışmada, 2001 uzlası konferansı kriterlerinden yararlanılarak sepsis insidansı %37 olarak ve en sık enfeksiyon odağı olarak % 68 akciğerler, % 22 batin, % 20 kan ve % 14 üriner sistem bulunmuştur. Hastane mortalitesinin % 24,1 olarak saptanıldığı bu çalışmada, septik şokta mortalite % 54.1 olarak bulunmuştur (25). Ülkemizde sepsis sıklığı ile ilgili yeterli çalışma bulunmamakla birlikte Fırat Üniversitesinde yapılan bir çalışmada yoğun bakımda hastane kaynaklı sepsis oranı %17,2 olarak bulunmuş ve mortalite oranı %63 olarak kaydedilmiştir (26).

Sepsis oluşumunda ki predispozan faktörler Tablo 2.2.'de özetlenmiştir (20).

Tablo 2-2: Sepsiste predispozan faktörler (20).**Konağa Ait Faktörler**

- Altta yatan mortal hastalık
- Yaş (Yenidoğan, >65 yaş)
- Primer hastalık (Siroz, Diabetes Mellitus (DM), Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY), Konjestif Kalp Yetmezliği (KKY)
- Konak savunma mekanizmalarının zayıflaması (Nötropeni, malignite, disproteinemiler, kortikosteroid ve diğer immunosupressif tedaviler)
- Geniş travma ve yanıklar
- Lokal enfeksiyonlar
- Septik abortus, lohusalık
- Yakın geçmişte uygun olmayan antibiyoterapi

Terapötik Faktörler

- YBÜ’nde bakım ve /veya büyük cerrahi girişimler
- İnvaziv damar kateteri, Hemodiyaliz
- Fazla miktarda parenteral mayi veya kan/kan ürünleri verilmesi
- Diğer invaziv kateter ve enstrümantasyonlar (Üriner kateter ve enstrümantasyon, entübasyon, endotrakeal tüp, mekanik ventilatör

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki birçok gelişme sepsisteki patolojik olayların birçoğunun anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Konağın enfeksiyona karşı pasif kalmadığı, geniş spektrumlu, sonuçta hasar oluşturan endojen inflamatuvar mediatörler salındığı yapılan araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir. Vücutta hümmoral sistem aktive olur, çeşitli sitokinler salınır, sonuç olarakda sistemik inflamatuvar yanıt, hemostatik değişiklikler ve organ hasarının oluşmasıdır. Mikroorganizmaların bazı antijenik yapıları ve toksinleri (endotoksin (LPS), lipid A), peptidoglikan, egzotoksinler, süperantijenler, enzimler) inflamasyonu başlatır (27).

Hakkında en çok araştırma bulunan toksin, gram negatif endotoksinleridir. Lipopolisakkarid yapısında bulunan endotoksin lipid A bölümü toksisitesinden sorumlu olan kısımdır. İnflamasyona neden olan diğer faktörler de gram pozitif bakterilerin

hücre duvarı yapısal komponentleri, ekzotoksinler, kapsül antijenleri, mantarların hücre duvarı antijenleri, viral veya paraziter antijenlerdir. Bu toksinler CD14 reseptörüne dolaşımdaki mononükleer fagositik hücreleri bağlayarak uyarımı sağlarlar ve monositlerden tümör nekrozis faktör (TNF) interlökin 1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve trombositleri aktive eden faktör (PAF) salınmasına neden olurlar. IL-1 ve IL-6, T hücrelerini aktive ederek γ -interferon, IL-2, IL-4 ve granülosit monosit koloni stimulan faktörün (GM-CSF) salgılanmasını indükler (2, 27).

Sepsis ve septik şokun en önde gelen mikrobik nedeni SIRS'e yol açan kaskadı başlatan gram negatif bakterilerle olan enfeksiyonlardır. Sepsis ve septik şok, bakterinin kanda sadece geçici olarak var olabilmesinden dolayı her zaman bakteriyemi ile beraber görülmez. Sitokin sekresyonuyla biten kaskadın başlaması ve septik şok ile birlikte görülen erken fizyolojik değişikliklerden sorumlu olan gram negatif bakteri hücresinin bir iç komponenti olan lipopolisakkariddir (LPS). Dolaşımda bulunan LPS ya bakterisidal permeabilite artırıcı protein(BPI) veya LPS-bağlayıcı protein ile kompleks oluşturabilir. LPS-LPS bağlayıcı protein kompleksi kendisi için reseptör olan CD14 ile bağlanırken, LPS-BPI kompleksi tahrip edilir. LPS-LPS bağlayıcı protein kompleksi ile CD14 bir kez bağlandığında, sonunda nükleusa nükleer faktör kappa B(NF- κ B), translokasyonu ile biten intrasitoplazmik sinyal sistemi CD14 tarafından başlatılır. NF- κ B, nükleusta bulunduğu zaman interökin-1(IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, trombosit aktive edici faktör(PAF), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve interferon gama (IFN- γ) gibi çeşitli sitokinlerin transkripsiyonunu başlatan bir transkripsiyon faktörüdür. Bunlar ve ek olarak nitrik oksid, prostaglandinler, intraselüler adezyon molekülleri ve lökotrienleri içeren diğer potansiyel mediyatörler septik şokun patogeneğinde direkt ya da dolaylı olarak yer alırlar. Gram pozitif bakteriler, protozoonlar, virüsler, riketsiyalar ve helmintler (bu mikroorganizmaların hiçbirisi LPS içermez) de sepsis sendromuna neden olabilir. Bu durumlarda, sitokin indüksiyonu için alternatif yollar stimüle olmaktadır (28).

Sepsise neden olan mikroorganizmaya bakılmaksızın, inflamasyon yapıcı sitokinlerin sekresyonu ile karakterize yaygın son yolak aktive olur ve bu ateş, organ perfüzyonunda azalma, hipotansiyon ve diğer olası komplikasyonlarla sonuçlanır (28).

2.5. Sepsiste Klinik Belirti ve Bulgular

Sepsiste klinik belirti ve bulgular sepsis evresine, enfeksiyon odağına ve mikrobiyolojik etkene bağlı olarak değişebilmektedir. Organ fonksiyon bozukluğu gelişmemiş sepsiste klinik tabloda primer enfeksiyon odağına ve sistemik inflamasyona bağlı belirti ve bulgular baskındır. Sistemik enflamasyon bulgularıyla ilgili olarak sepsis evresinde (ağır sepsis gelişmemiş) bir pyelonefrit olgusunu örnek verecek olursak; pyelonefrite ait dizüri, kostolomber ağrı ve duyarlılık, bulantı ve kusma görülürken, sistemik inflamasyona bağlı olarak ise ateş, taşikardi, takipne görülebilir. Sepsis vakalarının büyük bir bölümü ateşle birlikte seyrederken bazılarında da hipotermi görülebilir ya da bunların her ikisi de görülmeyebilir. Hatta ateşin normal sınırlarda olabileceği de unutulmamalıdır (29).

Hasta hipotansiyon, trombositopeni, oligoüri ve kanamanın gözlenmesi durumunda sepsis bakımından değerlendirilmelidir (30).

2.6. Sepsiste Tedavi

Sepsis ve septik şok kılavuzu Dellinger ve ark. tarafından 2004 yayımlanmış olup 2008 yılında güncellenmiştir. Buna göre sepsiste tedavi uygulaması şu şekildedir; (31).

- 1- İlk resüsitasyon – Amaca yönelik erken tedavi (ilk 6 saat)
- 2- Tanı
- 3 -Antibiyoterapi
- 4- Enfeksiyon kaynağının kontrolü
- 5- Sıvı tedavisi
- 6- Vazopressörler
- 7- İnotrop tedavi
- 8- Steroidler
- 9- Rekombinant insan aktive protein C
- 10- Kan ürünleri
- 11-Sepsis kaynaklı akut respiratuar distress sendrom (ARDS) ’ unda mekanik ventilasyon

- 12- Sedasyon, analjezi, nöromusküler blokaj
- 13- Glisemi kontrolü
- 14- Renal replasman tedavisi
- 15- Bikarbonat tedavisi
- 16- Derin ven trombozu profilaksisi
- 17- Stres ülseri profilaksisi
- 18- Desteğin sınırlandırılmasının planlanması

2.7. Nükleer faktör kappa B (NFkB)

İlk kez 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından keşfedilen Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) bir transkripsiyon faktörüdür (32). NF- κ B ilk tanımlandığında, farelerde B lenfositlere özgü immunoglobulin K hafif zincir (light chain) geninin ekspresyonunu düzenleyen bir protein olarak tarif edilsede daha sonraki çalışmalarda, NF- κ B'nin B ve T lenfositler, fibroblastlar ve monositik makrofaj soyları gibi çeşitli hücre tiplerinde sentezlenen önemli bir düzenleyici protein olduğu saptanmıştır (33-35). Aktif hale gelen NFkB, immüno-inflamatuvar yanıtlar, apoptozis, hücre adezyonu, hücre siklusu, anjiyogenez gibi olaylarda etkili olan 200'den fazla genin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (36). Oksido-inflamatuvar kaskadın indüklendiği, yoğun olarak sitokin sekresyonu ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun arttığı akut respiratuar distress sendromu (ARDS), sepsis ve multi-organ yetmezliği gibi klinik durumlarda patofizyolojide önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (37-39).

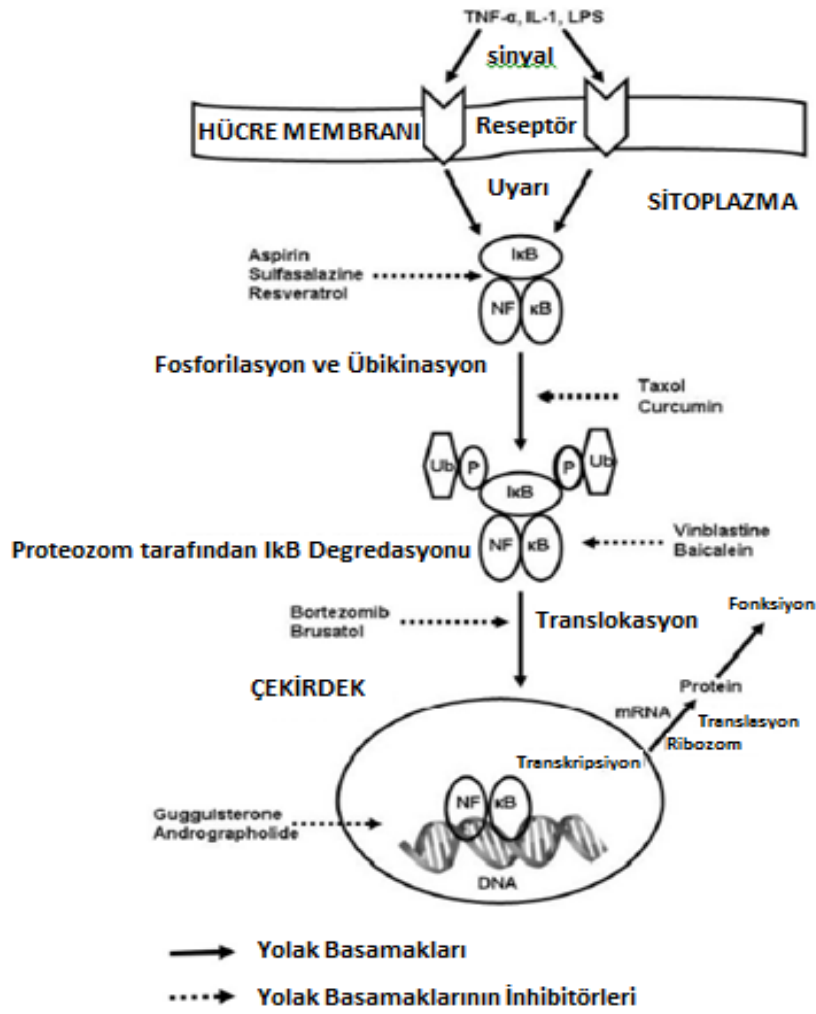
NF- κ B transkripsiyon faktörleri ailesini oluşturan NF- κ B1 (p105, p50), NF- κ B2 (p100, p52), p65/RelA, c-Rel ve RelB alt birimleri insanlarda *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *REL* ve *RELB* olmak üzere beş genin ürünüdür. Bu polipeptitler, homodimer veya heterodimer oluşturarak aktif NF- κ B proteinleri olarak aktivitelerini gösterirler (40). Rel/NFkB transkripsiyon faktörlerinin tüm üyeleri, amino terminal bölgelerinde **“kappa B” DNA bağlanma bölgesi** olarak bilinen (**“Rel Homoloji Bölgesi” (RHD)** de denilen), özgün, yüksek derecede korunmuş, ortak bir DNA bağlanma/dimerizasyon bölümü taşırlar (41, 42).

Rel proteinleri, transaktivasyon özelliklerine ve sentezlenmelerine göre kendi içlerinde de temel olarak iki gruba ayrılırlar. Birincisi, RelA(p65), RelB ve c-REL

proteinlerinden oluşur. Bu proteinler, olgunlaşmış şekilde sentez edilip, amino terminallerinde DNA'ya bağlanmanın kontrol edilmesi ile dimerizasyondan sorumlu olan ve karboksil terminallerindeki transkripsiyon aktifleyici bölgeleri için gerekli olan RHD bölümü taşır. ikincisi ise NFkB1(p105) ve NFkB2(p105)' den meydana gelir. Bu proteinler, büyük prekürsörler (p105 ve p100) olarak sentez edilirler. Amino terminalinde bulunan RHD'ye ek olarak C terminallerinde "**Ankyrin Tekrar Dizileri**" taşırlar. Ubikitin aracılı proteolitik süreçle bu bölgeler degrade olur ve olgun DNA bağlanma bölgeleri (p50 ve p52) oluşur. Bu yeni ürünler de RHD bölgeleri taşırlar fakat transkripsiyon aktifleyici bölgeleri yoktur (42).

NFkB birçok hücrede bir uyarı olmadığı zamanlarda sitoplazmada bulunmaktadır. Burada bir inhibitör protein olan inhibitör kappa B (IκB) ile kompleks oluşturan NFkB inaktif formundadır. Organizma bir uyarıya maruz kaldığında ise NFkB ile IκB ayrılır ve NFkB aktif hale geçer (43). NFkB, iki temel yolak aracılığıyla aktivite gösterir. Bunlardan birincisi, **Klasik (Kanonik) Yolak**'tır. Bu yolda temel olarak RelA-p50 dimeri yer alır. RelA-p50 dimeri, uygun stimülasyon olana kadar sitoplazmada IκB ailesinin inhibitör proteinleri ile birleşik halde bulunur (44,45). Stres, serbest radikaller, UV radyasyon, okside LDL, viral antijenler, TNF-α ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinler, LPS gibi bakteriyel antijenler, B ve T hücrelerinin aktivasyonu gibi çeşitli uyaranlarla hücrelerin stimülasyonu sonucunda aktivasyon gerçekleşir (41,46,47).

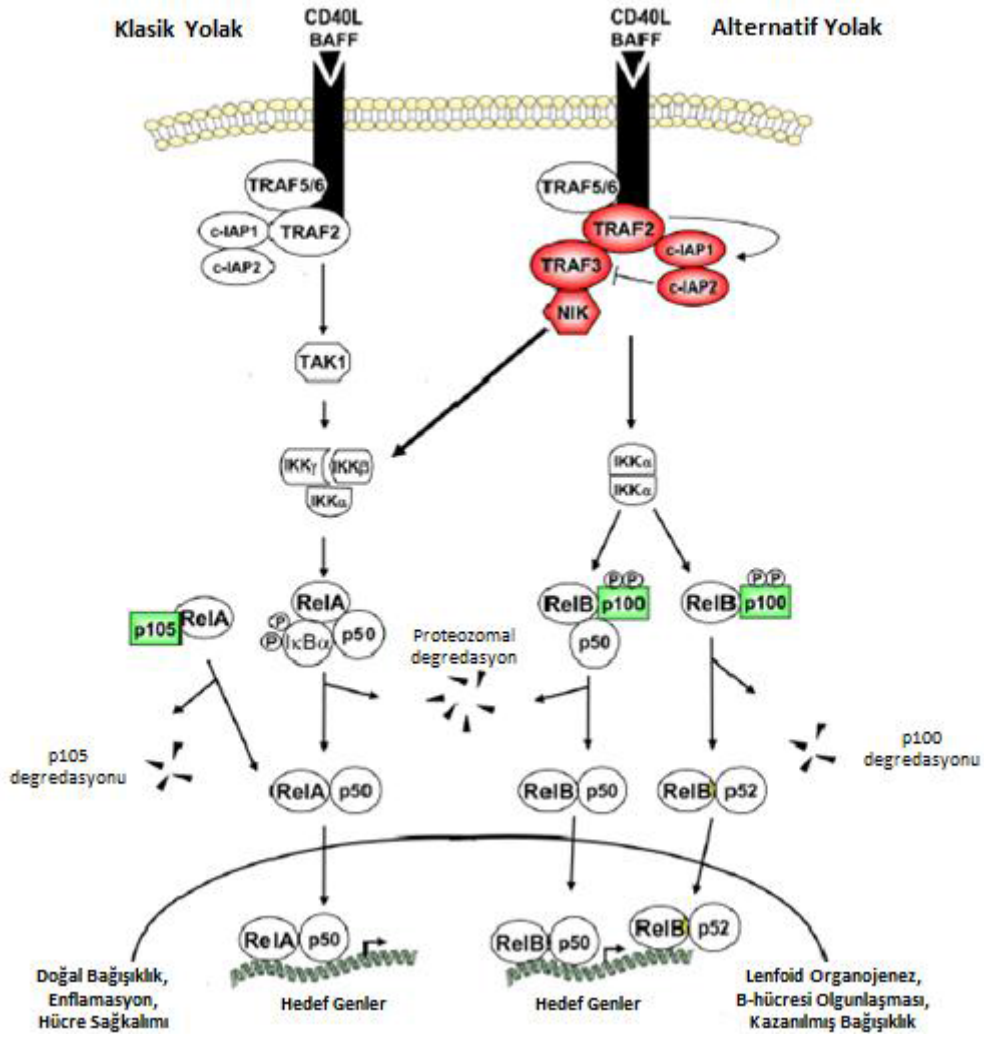
İnflamatuvar medyatörler IKK'yi N terminalinden fosforile ederek aktive eder. Bu sinyal, NFkB'nin birincil basamağı oluşturan inhibitör protein olan IκB'nin spesifik serin rezidülerinin (serin 32 ve 36) IKK tarafından fosforilasyonu ile devam eder. Daha sonra IκB'nin sırasıyla ubikitinasyonu, sonrasında da proteozomlarda degrade olur. Böylece kompleksten ayrılan NFkB alt ünitesi nükleusa transloke olarak ilgili gen mRNA'sının transkripsiyonunu indükler (44,45,48).



Şekil 2-2: LPS, TNF ve IL-1 ile uyarılabilen klasik NFκB yolağı ve inhibitörleri (41).

İkinci yolak, **Alternatif (Kanonik Olmayan) Yolak**'tır. AFF(TnFSF13B), BAFF(B-hücresi Aktive Edici Faktör), CD40 Ligandı, LTβ(Lenfotoksin Beta) gibi TNF süper ailesine ait daha az sayıda sitokin tarafından indüklenir (49,50). Klasik yolaktan farklı olarak, daha üst basamaklarında "NFκB İndükleyici Kinaz" (NIK) içerir. NIK, fosforilasyonu sağlar ve RelB'nin temel inhibitörü olan p100'ün 26S proteozom bağımlı sürecini yönlendiren IKK-α'yı aktifler. Bu sayede, serbestleşen RelB-p52 ve RelB-p50 nükleusa transloke olur ve DNA'ya bağlanır (51-53).

Alternatif yolağın işlevi ile ilgili şimdiye kadar yapılan tüm çalışmalardan çıkarılan en önemli sonuç, B hücrelerinin olgunlaşması, sağ kalım, sekonder lenfoid organların gelişimi, organizasyonu ve fonksiyonunda kritik role sahip olduklarının belirlenmesidir (48).



Şekil 2-3: Farklı indüksiyon ajanları ile klasik ve alternatif NFκB sinyal yolağı (44).
c-IAP: hücrel apoptoz proteini inhibitörü, TRAF: TNF reseptör ilişkili faktör.

NFκB' nin kronik inflamasyondaki önemli rolü TNF-α, IL-1, IL-2, IL-12, IL-16, IL-18 ve IFN gamma gibi sitokinlerin transkripsiyonu artırmasıdır (54). Otoimmün hastalıklar ve kronik inflamasyon ile seyreden çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde bu sitokinlerin önemi bilinmektedir (55).

NFκB, çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenlemekte ve aralarında TNF-α'nın da bulunduğu sitokinler, kemokinler, immünglobulinler ve hücre adezyon molekülleri gibi bir dizi proteinin ekspresyonunu artırarak kronik inflamatuvar hastalıkların ortaya çıkış ve seyrinde önemli rol oynamaktadır. NFκB1 geninin promotor bölgesindeki bazı polimorfizmlerin kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği gösterilmiş ve bu polimorfizmlerden fonksiyonel

olarak en önemlisi -94 ins/del ATTG promotor polimorfizmidir (4). NFkB1 geni 4. kromozomun kısa kolunda yerleşen (4q24) 156 kb'lık bir gendir. 25 ekzon ve uzunluğu 40000 ile 323 bç arasında değişen intronlardan oluşur (56). İnsan NFkB1 geni 50 kDa ağırlığında olup DNA'ya bağlanan p50 proteini dışında ikinci bir protein daha kodlar. Bu da 105 kDa ağırlığında DNA'ya bağlanmayan sitoplazmik bir molekül olan p105'dir. NFkB1 geninde tespit edilen varyasyonların birçoğu da fonksiyonel değildir (57).

2.8. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- α)

1975 yılında Lloyd Old ve arkadaşları fare ve tavşanlarda “Basil Calmette - Guerin” (BCG) ile retiküloendotelyal sistemin uyarılması ile lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu sonucu dolaşıma bir proteinin salındığını bulmuşlar ve bunu da Tümör Nekrozis Faktör (TNF) olarak adlandırmışlardır (58). TNF'nin alfa ve beta olmak üzere iki yapısal formu mevcut olup TNF-alfa çoğunlukla monosit/makrofajlardan, TNF-beta ise çoğunlukla T lenfositler ve doğal öldürücü hücrelerden salınmaktadır. Bu iki form moleküler açıdan birbirlerine çok benzemekte ve benzer biyolojik özellikler göstermektedir (6).

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF α), kaşektin olarak da adlandırılan ve 17-70 kDa ağırlığında bir sitokindir (59). Homotrimer bir yapıya sahip olan TNF α , özellikle makrofajlar ve monositler olmak üzere fibroblast, endotel hücreler, adipositler, B hücreleri gibi birçok hücre tarafından sentezlenmektedir (60-62). TNF- α geni 6. kromozomun kısa kolunda lokalizedir (63). 233 Aminoasit prekürsörünün işlenmesi ile 157 aminoasitlik polipeptid kodlanır (64). Genin promotor bölgesinin pozisyon -308'de guaninin adeninle yer değiştirdiği tek bir baz değişiminin olduğu tanımlanmıştır. Bir çok çalışma göstermiştir ki mutant allelin fonksiyonel varyantı A-308 alleli tarafından genin transkripsiyonel aktivitesini artırır. TNF- α A alleli, G allele göre daha güçlü transkripsiyonel aktivatördür ve yüksek TNF- α düzeylerine neden olur (8). G alleli çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (9).

1985 yılında ilk kez insan kaynaklı TNF- α klonlanmıştır ve daha sonra anti-TNF- α antikorlar ile solubl TNF reseptörleri üretilmiş ve birçok inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (65). TNF- α çok sayıda sitokin tarafından oluşturulan peptid mediyatör ailesinin bir üyesidir. Bu aileye ait diğer üyeler arasında

lenfotoksin- α , Fas ligand ve CD40 ligand yer alır. TNF- α doğal ve kazanılmış immünite, hücre proliferasyonu ve apoptoziste rol oynayan ve önemli proinflatuvar özelliklere sahip olan bir sitokindir (66).

TNF-alfa'nın daha çok iltihabi olaylarda önemli rol oynadığı, enfeksiyöz ajan varlığında veya doku hasarında 4- 8 saat içinde TNF artışı gözlenip 16- 24 saatte en üst düzeye ulaştığı ve uyarının devamlılığına göre salınımının devam ettiği rapor edilmektedir (6).

TNF- α hücre içinde N terminali olan tip II transmembranöz bir proteindir. Başlangıçta plazma membranında mevcut 26 kDa molekül ağırlığında pro- TNF- α 'nin hücre dışı domaini TNF- α converting enzyme (TACE, ADAM- 17) tarafından kesilir ve 17 kDa molekül ağırlığında solubl form oluşur. Biyolojik aktiviteleri birbirlerinden tamamen farklı olan bu iki tip TNF- α 'nın trimerik formları aktiftir (67). TNF- α 'nin sinyal iletim yolları oldukça karmaşıktır ve tam olarak aydınlatılamamıştır. TNF- α sinyal iletimindeki en önemli faktörlerden biri transkripsiyon faktörü NFkB aracılığı ile düzenlenmesidir. TNF- α - NFkB yolağını kontrol eden 300 civarında moleküler bağlantı tespit edilmiştir (68).

TNFR1 ve TNFR2 olarak adlandırılan iki çeşit TNF reseptörü bilinmektedir ayrıca reseptörlerinin hemen hemen bütün hücre tiplerinde var olduğu da gösterilmiştir (69, 70).

TNFR1 eritrositler dışında hemen her hücre tipinde mevcuttur ve ligandı solubl TNF- α 'dır. TNFR2 ise asıl olarak hematopoetik hücrelerde eksprese olur ve ligandı membrana bağlı TNF- α 'dır. TNF reseptörlerinin ekspresyonları farklı hücre tiplerinde ve normal ya da hastalıklı dokularda farklı olabilmektedir. TNF reseptörleri hücre membranına bağlı halde bulunabileceği gibi TACE tarafından kesilmiş solubl halde de bulunabilir. Solubl TNF reseptörü bir TNF- α bağlayıcısı gibi davranır ve TNF- α 'ya bağlanıp onun biyolojik aktivitesini inhibe etmek için hücre yüzey molekülü ile yarışır. Bu etkisinin tersine solubl-TNF reseptörü ayrıca trimerik TNF- α 'ya bağlanıp onu stabilize eder. Böylece hem TNF- α 'nın yarılanma ömrünü uzatır hem de TNF- α 'nın yavaş salınımını sağlayan bir kaynak gibi davranır (5, 66). TNF- α 'nın TNFR1 ve TNFR2'ye bağlanma afinitesi ve bağlandıktan sonra aktive edilen hücre içi sinyal yolları birbirinden oldukça farklıdır. Uyarıldıktan sonra TNFR1'in hücre içi domaini TNF reseptör assosiye ölüm domain (TRADD) proteinine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda ya Fas assosiye ölüm domain (FADD) proteini aracılığıyla apoptozis

indüklenir veya TNF reseptör assosiye faktör 2 (TRAF-2) ile proinflamatuvar yolak uyarılır ve NFkB aktivasyonu meydana gelir. Ancak TNFR2 TRADD/FADD yolağını aktive edemez. Etkisini yalnızca TRAF2 aracılığı ile gösterir. Sonuç olarak bir hücrede TNF- α ile uyarılma ile ortaya çıkan net sonuç bu iki reseptörün birbiri ile iletişimi sonucu belirlenir (67).

TNF'nin in vivo ve in vitro olarak en önemli indükleyicilerinden birinin LPS olduğu bilinmektedir. Yüksek dozda LPS veya gram negatif bakteriyel enfeksiyonlar septik şoka neden olmaktadır. TNF ile ön uygulama ya da TNF'ye karşı antikor kullanılarak fare ve baboonlarda yapılan çalışmalar TNF'nin septik şokta hayati bir rol oynadığını göstermiştir (71-73).

Lökositler ve endotelial hücreler inflamasyonun regülasyonu ile aktivitelerine bağlı olmak üzere proinflamatuvar ya da antiinflamatuvar sitokinler üretirler. TNF- α , IL-6 ve IL-1 β dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin akut ve kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneziinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (74). Her ne kadar TNF reseptörleri birçok hücre ve dokuda eksprese olsa da TNF- α 'nın birçok proinflamatuvar etkisi vasküler endotel ve endotel-lökosit etkileşimi üzerinden olmaktadır. TNF- α IL-8, MCP-1 ve IP-10 gibi çeşitli kemokinlerin sentezini ve endotel hücrelerinde E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Sonuç olarak TNF- α antijenden tamamen bağımsız olarak birçok farklı lökosit grubunu harekete geçirir (75).

2.9. Sepsiste NFkB ve TNF- α ilişkisi

Sepsis ve septik şokun en önde gelen mikrobik nedeni SIRS'e yol açan olaylar dizisini başlatan gram negatif bakterilerle olan enfeksiyonlardır. Bakteri kanda sadece geçici olarak bulunabilir; bundan dolayı sepsis ve septik şok her zaman bakteriyemi ile birlikte değildir. Gram negatif bakteri hücresinin bir iç komponenti olan lipopolisakkarid (LPS), sitokin sekresyonuyla kaskadın başlaması ve septik şok ile birlikte olan erken fizyolojik değişikliklerden sorumludur. Dolaşımda bulunan LPS ya bakterisidal permeabilite artırıcı protein(BPI) ya da LPS-bağlayıcı protein ile kompleks oluşturabilir. LPS-LPS bağlayıcı protein kompleksi kendisi için reseptör olan CD14 ile bağlanırken, LPS-BPI kompleksi tahrip edilir. LPS-LPS bağlayıcı protein kompleksi ile CD14 bir kez bağlandığında, CD14 sonunda nükleusa nükleer faktör kappa B(NF- κ B),

translokasyonu ile sonuçlanan intrasitoplazmik sinyal kaskadı başlatır. NF- κ B, nükleusta bulunduğu zaman tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interökin-1(IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, trombosit aktive edici faktör(PAF) ve interferon gama (IFN- γ) gibi çeşitli sitokinlerin transkripsiyonunu başlatan bir transkripsiyon faktörüdür. Bunlar ve nitrik oksid, intraselüler adezyon molekülleri, prostaglandinler, ve lökotrienleri içeren diğer potansiyel mediyatörler septik şokun patogeneğinde doğrudan veya dolaylı olarak yer alırlar (28). NF- κ B1, makrofaj ve T hücrelerinde proinflamatuvar ve hücreyel yaşamsal fonksiyonları yönetir. NF- κ B1 ve onun inhibitör protein NF- κ BIA (I κ B α , nükleer faktör-kappa B inhibitör alfa) geninde birçok polimorfik bölge bulunmuştur (76,77). Bu polimorfizmlerin NF- κ B'nin işlevini potansiyel olarak etkilediği saptanmıştır (78). NF- κ B'nin uygunsuz aktivasyonu, enflamatuvar artrit, septik şok, akciğer fibrozisi, diyabet, kanser, AIDS, arterosklerozis ve felç gibi inflamasyon ile ilişkili çeşitli hastalıklar ve patolojik durumlarla ilişkili olduğu saptanmıştır (48,79).

Sepsis ve septik şokun ağırlık derecesiyle sitokin gen polimorfizmleri arasında bir ilişki olup olmadığı son yılların önemli bir araştırma alanıdır. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar, konağın enfeksiyon hastalıklarına karşı duyarlılığını genetik faktörlerinde etkilediğini göstermiştir (80).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda NF κ B1 -94 ins/del ve TNF- α (-308 G/A) genotip polimorfizmlerinin ve TNF- α serum düzeyinin incelenerek, hem bu polimorfizmlerinin TNF- α düzeylerine olan etkisi hem de sepsiste klinik ve prognostik parametrelerle birlikte ele alınarak olası etkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grup, sepsise ilişkin herhangi bir patolojik bulgusu bulunmayan 104 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubudur. İkinci grup ise, Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Anestezi ve Reanimasyon Kliniği tarafından takip edilen ve sepsis tanısı konmuş 72 hastadan oluşmaktadır. Çalışmaya katılacak olan gönüllülere, yapılacak araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş gönüllü onam formu okutularak imzalatılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik değerlendirmeleri ve örnek alımları ilgili kliniklerce gerçekleştirilmiştir ve alınan kan örnekleri gerekli koşullar altında anabilim dalımıza ulaştırılmıştır.

Polimorfizm çalışması için sağlıklı ve sepsisli bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınıp, DNA izolasyonu yapılmış ve 72 sepsis hastası ve 104 sağlıklı kontrolde TNF- α genine ait polimorfizm analizleri yapılmıştır.

Ayrıca sağlıklı ve hasta bireylerin kuru tüpe alınan kan örneklerinden izole edilen serum örneklerinde TNF- α düzeyleri analizleri yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (Promega MBG), Asetik asit (Merck K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), dNTP seti (MBI Fermentas), Etanol (%99 Tekel), Etidyum bromür (Sigma E-8751), Taq polimeraz (Fermentas), DNA marker (50-100 bp DNA size marker; MBI Fermentas), Proteinaz K (Merck), Restriksiyon enzimleri (İnvitrogen), primer dizileri (Xcelris)

3.3. Kullanılan Gereçler

Elektroforez için güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P), Hassas terazi (Mettler), Görüntüleme sistemi (EL LOGIC 100, Kodak), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PZR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Eppendorf), Falkon santrifüj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (LKB 2013)

miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis), Buzdolabı (-20) (Regal), Buzdolabı (+4)(Arçelik), Santrifüj (Nüve Mf 048), Elısa plate okuyucu.

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0,2 mililitre 0,5 M etilendiamintetraasetat, 1 mililitre 1M Tris (pH 8,0), 200 miligram Bromfenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartılarak steril distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.4.1.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 mililitreye tamamlandı.

3.4.1.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0,5 M EDTA (pH 8,0) ve 800 ml distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.5. Kullanılan Kitler

INVITROGEN DNA İzolasyon Kiti

DIACLONE TNF- α ELISA Kit

3.6. Kullanılan Yöntemler

3.6.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Invitrogen Purelink Genomik DNA Kit ile kandan DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.6.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği ve Hazırlık Aşaması

Invitrogen Purelink Genomic DNA Kit içeriği; RNase, Proteinaz K, PureLink Genomik Liziz/Bağlama solüsyonu, Elution Buffer, Yıkama Solüsyonu 1 ve Yıkama Solüsyonu 2, PureLink Koleksiyon tüpü .

Başlamadan önce, DNA izolasyon kiti içerisindeki yıkama solüsyonları, her etiketin üstündeki yönergelere uygun olarak PureLink Genomik Yıkama Solüsyonu 1 ve PureLink Genomik Yıkama Solüsyonu 2'ye %96-100 etanol ekledi.

3.6.1.2. Kan Örneklerinden Lizat Hazırlanması

İlk olarak su banyosu veya ısı bloğu 55°C'ye ayarlandı. 200 µl taze veya dondurulmuş kan örneği steril bir mikrosantrifüj tüpü içine alındı. Örnek içine kit ile sağlanan Proteinaz K'dan 20 µl eklendi. Daha sonra örnek içine yine kit ile sağlanan RNaz A'dan 20 µl eklendi, vortekslenerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. 200 µl PureLink Genomik Liziz/Bağlama solüsyonu eklenir, homojen bir solüsyon eklemek için vorteksleyerek iyice karıştırıldı. Protein digesyonunu ilerletmek için 55°C'de 10 dk. Inkübe edildi. Lizata 200 µl %96-100 etanol eklendi. Homojen bir solüsyon elde etmek için vorteksleyerek 5 saniye iyice karışması sağlandı. Daha sonra DNA'ya bağlanma aşamasına geçildi.

3.6.1.3. DNA'ya Bağlanma

Koleksiyon tüpü içinde sağlanan spin kolonu paketten çıkarıldı. Genomik Liziz/Bağlama solüsyonu ve etanol ekli lizatı (~640 µl) PureLink spin kolona eklendi. Kolon, 1 dk. oda sıcaklığında 10.000xg'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünü atılarak kit ile sağlanan yeni bir PureLink Koleksiyon tüpü içine yerleştirildi. DNA yıkama aşamasına geçildi.

3.6.1.4. DNA Yıkama Aşaması

Kolona, etanol ile hazırlanan yıkama solüsyonu I'den 500 µl eklendi. Kolonu 1 dk. oda sıcaklığında 10.000xg'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünü atılarak kolon, kit ile sağlanan yeni bir PureLink Koleksiyon tüpü içine yerleştirildi. Kolona etanol ile hazırlanan Yıkama solüsyonu II'den 500 µl eklendi ve oda sıcaklığında maksimum

hızda 3 dk. santrifüj edildikten sonra toplama tüpü ayılarak DNA elüsyon aşamasına geçildi.

3.6.1.5. DNA Elüsyon Aşaması

Kolonu steril bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüp içine konuldu. Üzerine 25-200 µl PureLink Genomik Elüsyon Çözeltilisi eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk. İnkübe edildikten sonra, oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte toplanan purifiye genomik DNA saklandı. Daha fazla DNA kurtarmak için kolon yeni bir steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve aynı miktarda elüsyon çözeltisi kullanarak ikinci bir elüsyon aşaması yapıldı. Elde edilen pürifiye genomik DNA - 20°C’de saklandı.

3.6.2. Elde Edilen DNA’nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA’nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm’deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50\mu\text{g/ml}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA’nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1,8’dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8’den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2’den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.6.3. Gen Polimorfizmlerinin Tespiti

NFκB1 -94 ins/del ATTG ve TNFα (-308 G/A) lokusuna ait alleller polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için toplam 26 µl’lik PZR karışımı hazırlandı.

3.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/ μ l); (Fermentas EPO402): PZR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 unite olacak şekilde 26 μ l lik PZR reaksiyonuna 0,3 μ l eklendi. dNTP'ler (100 μ mol/ml) (Fermentas R0171) 100 mM'lık dNTP'lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10' ar μ l alınıp (toplam 40 μ l) 1 μ l'lik tüpe kondu ve üzerine 960 μ l distile su eklenerek (d₂H₂O) 1000 μ l 1mM 'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20 °C derin dondurucuda saklandı. PZR reaksiyonuna bu stoktan alınan dNTP karışımı kullanıldı. MgCl₂ (25mM/ml, Fermentas EP0402)'den 26 μ l'lik PZR karışımına protokole göre eklendi. 10 X DNA Taq PZR Tamponu (NH₄)₂SO₄'lü (Fermentas EP0402); Tris-HCl'den 100mM (pH 8,8, 25°C'de), 500mM KCl ve %0,8 Nonidet P40 içeren 10X Taq PZR tamponundan 26 μ l'lik PZR karışımına uygun hacimde eklendi.

3.6.3.2. PZR Karışımının Hazırlanışı

NFkB1 -94 ins/del ATTG ve bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir.

İleri primer: 5'-TTT AAT CTG TGA AGA GAT GTG AAT G -3'

Geri primer: 5'-CTC TGG CTT CCT AGC AGG G -3'

NFkB1 -94 ins/del ATTG bölgesindeki amplifikasyonun gerçekleştirilmesi için, toplam reaksiyon hacmi 26 μ l olacak şekilde Tablo3.1'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. Her örnek için iki PZR tüpü hazırlandı.

Tablo 3-1: NFkB1 -94 ins/del ATTG için PZR karışımının hazırlanması

PZR Karışımı	dH ₂ O	MgCl ₂	MgFree (Tampon)	dNTP	Primer	Taq DNA Polimeraz
Miktar (μl)	16,15	2,3	2,5	1,5	1,5	0,3

TNF α (-308 G/A) Polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir.

*TNF-a primer dizileri:

İleri primer:: 5'AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3'

Geri primer: 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG3'

TNF α (-308 G/A) polimorfizimlerinin tespitinin yapılmasında, her bir örnek için yine toplam reaksiyon hacmi 26 μ l olacak şekilde, Tablo3.2'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde, soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Tablo 3-2: TNF α (-308 G/A) için PZR karışımının hazırlanması

PZR Karışımı	dH ₂ O	MgCl ₂	MgFree (Tampon)	DNTP	Primer	Taq DNA Polimeraz
Miktar (μl)	17,75	1,75	2,5	1,5	0,5	0,3

Her iki reaksiyon için Taq polimeraz enzimi eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 24 μ l reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 2 μ l DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı.

3.6.3.3. NF κ B1 -94 ins/del ATTG ve TNF α (-308 G/A) Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

PZR karışımı her bir örnek için hazırlanarak Tablo 3-1'de ki NF κ B1 -94 ins/del ATTG, Tablo 3-2'de ki TNF α (-308 G/A) için amplifikasyon şartlarına göre daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PZR cihazına(Biorad Thermal Cycler)örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı (Tablo 3-3, tablo 3-4).

Tablo 3-3: NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmine ait amplifikasyon şartları

95 °C	5 dakika
94 °C	45 saniye
55 °C	45 saniye
72°C	45 saniye
72°C	5 dakika

Tablo 3-4: TNFα (-308 G/A) polimorfizmine ait amplifikasyon şartları

95 °C	5 dakika
94 °C	45 saniye
64°C	45 saniye
72°C	45 saniye
72°C	5 dakika

3.6.3.4. NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNFα (-308 G/A) PCR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi ve PCR Ürünlerinin Kontrolü

%2'lik agaroz jel hazırlanmak için, agarozdan 4 gr tartılarak ölçülü kap içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml olarak şekilde 1X TBE tamponu eklendi ve mikrodalga fırında ısıtılarak çözündürüldü. Ölçülü kabın sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde çözünmüş agaroz jel içine 4µl etidyum bromür ilave edildi. Hazırlanan jel, jel yatağına dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için önceden yüksekliği ayarlanmış tarak yerleştirilerek çeker ocak içinde donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

Jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren elektroforez tankı içine uygun şekilde konuldu. TBE tamponun jelin üzerini 2-3 ml geçecek miktarda olmasına dikkat edildi. 26µl PZR ürününden, 6µl alınıp 2µl yükleme tamponu ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Örnek karışımı alınarak kuyucuklara sırayla yükleme yapıldı. Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı dikkatlice kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 500 miliamper ve 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi. Örneklerin jel içinde istenilenden fazla yürümemesi için elektroforez işleminin süresine dikkat edilmelidir. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi.

3.6.3.5. NFκB1 -94 ins/del ATTG Polimorfizmi Tespiti İçin Restriksiyon Enzimi Kesimi

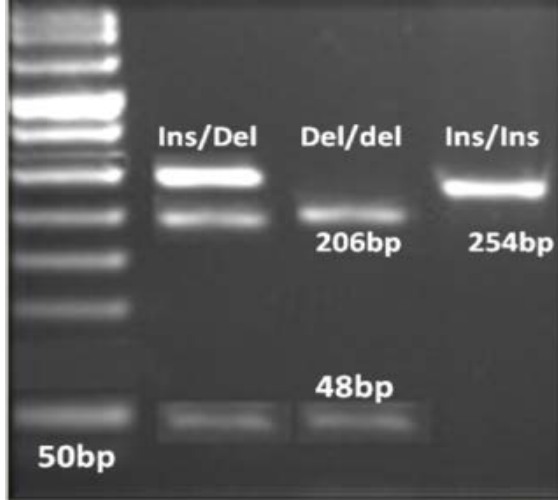
Amplifikasyon sonrası 254 baz çiftlik PCR ürünü Van91I restriksiyon enzimi ile 37°C’de 3 saat inkübe edilerek kesilmiştir.

Tablo 3-5: Van91I enzimi için kesim protokolü

Malzeme Adı	Miktarı
Apirojenik Su	4,5 µl
Buffer Tango	0,5 µl
Van91I	0,25 µl
PZR ürünü	5 µl

Amplifiye edilen bölgede Van91I restriksiyon enziminin 2 tane kesim noktası mevcuttur. Biri 255. bazda, diğeri ise ATTG ins/del bölgesi olan 207. bazdadır. ATTG insersiyonu olduğunda enzim bu bölgeyi tanıyarak kesim yapacaktır. ATTG delesyonu olduğunda ise enzim bu bölgeyi tanımayacak ve kesim yapmayacaktır. Buna göre; ATTG insersiyonu olduğunda enzim hem 207. bazdan hem de 255. bazdan kesim yapacağı için, DNA’nın her iki zincirinde insersiyon taşıyan bireylerde (II), 206 bç, 48

bç ve 25bç; DNA'nın her iki zincirinde delesyon taşıyan bireylerde (DD), enzim sadece 255. bazdan kesim yapacağı için, 254 bç ve 25 bç; DNA'nın bir zincirinde insersiyon diğer zincirinde delesyon taşıyan bireylerde ise (ID), 254bç, 206 bç, 48 bç ve 25 bçlik fragmanlara kesilecektir (Sekil 3.1).



Şekil 3-1: NFκB1 94ins/del gen polimorfizmine ait % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

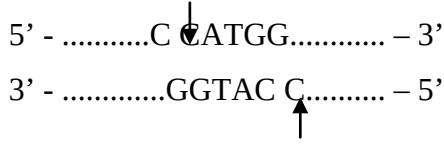
3.6.3.6. TNFα (-308 G/A) Polimorfizmi Tespiti İçin Restriksiyon Enzimi Kesimi

Amplifiye olan PZR ürünleri Nco I Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile 37C'de 3 saat inkübe edilerek polimorfik varyantlar tespit edilecektir. Kesim işlemi gerçekleştirilen ürünler %2'lük agaroz jelde gözlemlenecektir. Kesim işleminde kullanılan reaksiyon içeriği tablo 3-5'te belirtilmiştir.

Tablo 3-6: NcoI enzimi için kesim protokolü

Malzeme Adı	Miktarı
Apirojenik Su	4,5 µl
Buffer Tango	0,5 µl
NcoI	0,25 µl
PZR ürünü	5 µl

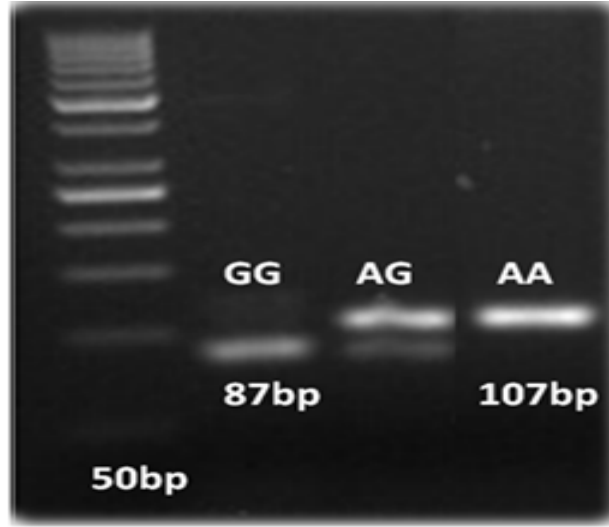
TNF α (-308) için verilen primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiş olan PCR ürünü 107 bp uzunluğundadır. NcoI bu PCR ürününü aşağıda gösterilen bölgeden keser.



Normal allel (GG genotipi) NcoI ile kesildikten sonra 87 ve 20 bp' den oluşan 2 fragmana ayrılır. Mutant allel (AA genotipi) ise enzimle kesilmemektedir (sadece PCR ürününe ait 107 bp' lik band görülür). Eğer hem 107 hem de 87 ve 20 bp olmak üzere toplam 3 bant oluşmuş ise GA genotipinin varlığından söz edilir.

Elde edilen kesim ürünlerinin analizi için:

- %2'lik agaroz jel hazırlandı.
- İlgili kesim enzimleri ile kesilen PZR ürünlerinden 8 μ l ve yükleme tamponundan 2 μ l alınarak karıştırılıp %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı.
- Kesim ürünleri, DNA moleküler marker (Fermentas PUC 19, 50 bp marker) ile birlikte yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: TNF-alfa geninde promotor bölgedeki 308. nukleotiddeki G / A tek nukleotid değişiminin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

3.6.4. Serum TNF-alfa düzeylerinin Tayini

Serum TNF-alfa düzeylerinin tayini için TNF-alfa elisa kiti (DIACLONE, Fransa) kullanılmıştır. Kit protokolüne uygun olarak temin edilen kanlar serum ayırma tüpleri kullanılarak ayrılmıştır. Prosedüre göre gün içerisinde serum ve plazması ayrılacak olan örnekler 1000xg hızda 15 dakika santrifüje alınmadan önce 2 saat oda sıcaklığında, gün içerisinde ayrılmayacak olanlar da +4°C 'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ayrılan serum örnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Elisa prosedürüne başlamadan önce serum örnekleri ve elisa kiti 30-60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından Biotin antikoru ve HRP-avidin kit içerisinde bulunan dilüsyon solüsyonları kullanılarak 1:100 oranında seyreltilmiştir. Yıkama solüsyonu da distile su kullanılarak 1:200 oranında dilüe edilerek hazırlanmıştır. Prosedüre uygun olarak örnek dilüsyon solüsyonu kullanılarak standartlar da hazırlanılarak prosedüre başlanmıştır.

İlk aşamada, plate kuyularına 100 µl standartlar ve serum örnekleri belirlenen kuyulara ayrı ayrı eklenilir ve sonrasında her kuyuya 50 µl biotin antikoru eklenerek 37°C'de 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu kuyular boşaltılarak 3 kere yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. 3. yıkamanın ardından kuyuların her birine 100 µl HRP-avidin ilave edilerek 37°C'de 30 dakikalık inkübasyon başlatılmıştır.

Ardından kuyular boşaltılarak 3 kere yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirilmiştir. 3. yıkamadan sonra kuyular boşaltılarak 100 µl TMB substratı eklenerek karanlık ortamda 12-15 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi beklenmiştir. Reaksiyonun sonlandırılması için 100 µl stop solüsyonu eklenerek 5 dakika içinde 450 nm dalga boyunda Elisa Plate okuyucu da absorbanslar okunmuştur. Standartların absorbansları kullanılarak standart eğri grafiği çizilmiş ve serum örneklerinin hesaplamaları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.6.5.Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizinde SPSS 11.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak alınmıştır.

Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare ve Fisher testi kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayma metoduna göre yapılmıştır.

Gruplar arası demografik verilerin karşılaştırılmasında Student's t, One-way Anova ve Mann Whitney U testleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza hasta grubu olarak sepsis tanısı konulmuş 21 kadın ve 51 erkek olmak üzere 72 birey, kontrol grubu olarak ise herhangi bir sepsis bulgusu taşımayan 20 kadın ve 84 erkek olmak üzere 104 sağlıklı birey dâhil edilmiştir.

Çalışma gruplarımıza ait biyokimyasal ve demografik bilgiler tablo 4-1’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel incelemede hasta ve kontrol grupları arasında yaş açısından istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Hasta grubunda sepsis tanısını oluşturacak şekilde kreatinin ($p<0,001$; %95 güven aralığı=0,89-1,50), BUN ($p<0,001$; %95 güven aralığı=36,37-47,90), WBC ($p<0,001$; %95 güven aralığı=8,12-11,85), CRP ($p<0,001$; %95 güven aralığı=0,69-1,28), laktat ($p<0,001$; %95 güven aralığı=10,08-15,87), açlık kan şekeri ($p<0,001$; %95 güven aralığı=31,84-61,92), plazma K ($p=0,043$; %95 güven aralığı=0,006-0,39), SGPT ($p<0,001$; %95 güven aralığı=117,17-316,15), SGOT ($p<0,001$; %95 güven aralığı=294,57-676,18), laktat dehidrogenaz ($p<0,001$; %95 güven aralığı=205,88-318,69), total bilirubin ($p<0,001$; %95 güven aralığı=1,28-3,95) düzeyleri ile hasta ateşi ($p<0,001$; %95 güven aralığı=0,32-0,72) sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Kan pH düzeyi ise istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0,001$; %95 güven aralığı =0,04-0,09).

Kontrol grubunda ise kan hemoglobin düzeyleri ($p<0,001$; %95 güven aralığı=3,17-4,08), platelet düzeyleri ($p<0,001$; %95 güven aralığı=88,10-157,52) ve HCO_3 düzeyi ($p<0,001$; %95 güven aralığı=2,43-4,20) hasta grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak artış göstermiştir.

Tablo 4-1: Çalışma grubuna ait biyokimyasal ve demografik parametreler

Parametreler	Hasta (n=72)	Kontrol (n=104)
Yaş (yıl)	64,60±11,45	62,28±11,34
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	51/21	84/20
Kilo (kg)	78,53±11,85	77,84±11,92
Boy (cm)	167,29±8,01	167,39±8,18
Ateş (°C)	37,02±1,02*	36,49±0,13

Kreatinin (mg/dl)	2,17±1,50*	0,97±0,34
Kanüreeazotu (BUN) (mg/dl)	62,79±28,96*	20,65±5,89
Hemoglobin (g/dl)	9,65±1,11	13,28±1,72*
WBC (kg/mm ³)	20714,43±14737,03*	7735,87±2253,08
Platelet (X100)	180272,22±126650,10	303088,43±93835,05 *
C-Reaktif Protein (CRP) (mg/L)	17,90±5,26*	0,50±0,05
pH	7,35±0,10*	7,42±0,31
PaO ₂	108,19±46,90	97,24±24,85
PaCO ₂	35,70±12,47	34,85±3,86
HCO ₃	21,43±4,34	24,75±1,23*
Laktat (mEq/L)	4,00±3,75*	1,02±0,44
Glukoz (mg/dl)	163,02±63,51*	116,14±37,33
Na ⁺ (mEq/L)	137,49±7,66	139,10±3,79
K ⁺ (mEq/L)	4,06±0,86**	3,86±0,43
Albumin	2,72±0,56	4,14±0,60
SGOT	513,78±98,96*	28,40±22,09
SGPT	244,82±51,20*	28,16±26,73
Total Bilirubin	3,31±2,81*	0,69±0,50
Laktat dehidrogenaz	483,23±268,16*	220,94±92,91
APACHE	29,53±5,52	-
Hipertansiyon varlığı (%)	(%72,2)	(%67,3)
Tip 2 diyabet varlığı (%)	(%16,7)	(%23,9)
Periferik arter hastalığı (%)	(%15,3)	(%7,7)
KOAH (%)	(%27,8)	(%7,7)

n: birey sayısı, Gruplararası farklılık ki-kare ve Student t testi ile incelenmiştir. *p<0,001

**p=0,043

Hasta grubuna özgü demografik parametreler tablo 4-2’de verilmiştir. Hastalarda en çok Pseudomonas, Acitenobacter ve Pnömoni enfeksiyonları varlığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4-2: Hasta grubuna özgü demografik parametreler

Parametreler	n/%
Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY)	7 (% 9,7)
Devamlı Venövenöz Hemofiltrasyon (CVVHDF)	24 (%33,3)
Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı (KOAH)	20 (%27,8)
Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon	11 (%15,3)
Kardiyak Arrest	12 (%16,7)
Malignite	14 (%19,4)
İnsülin Bağımlı Olmayan Diyabet (NIDDM)	12 (%16,7)
İnsülin Bağımlı Diyabet (IDDM)	10 (%13,9)
Acinetobacter enfeksiyonu varlığı	27 (%37,5)
Pseudomonas enfeksiyonu varlığı	28 (%38,9)
Klebsiella pneumonia enfeksiyonu varlığı	17 (%23,6)
Enterobakter enfeksiyonu varlığı	10 (%13,9)
Metisilene dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığı	19 (%26,4)
Metisilene duyarlı Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığı	6 (%8,3)
Escherichia coli enfeksiyonu varlığı	9 (%12,5)
Vankomisine dirençli Enterokok enfeksiyonu varlığı	4 (%5,6)
Corynebacterium striatum enfeksiyonu varlığı	4 (%5,6)
Aspergillus enfeksiyonu varlığı	1 (%1,4)

Serratia marcescens enfeksiyonu varlığı	1 (%1,4)
Streptococcus pneumoniae enfeksiyonu varlığı	5 (%6,9)
Pnömoni enfeksiyonu varlığı	23 (%31,9)

Çalışma gruplarımız arasında NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya rastlanmamıştır (Tablo 4-3).

Tablo 4-3. Çalışma gruplarında NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi genotip ve allel dağılımları

	Hasta (n=72)	Kontrol (n=104)
Genotip		
İns/ins	12(%16,7)	23(%22,1)
Del/del	39 (%54,2)	58(%55,8)
İns/del	21(%29,2)	23(%22,1)
Allel		
İns	45(%31,2)	69 (%33,2)
Del	99 (%68,8)	139 (%66,8)

n: birey sayısı

Tablo 4-4’de Çalışma gruplarında TNF α (-308 G/A) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları gösterilmiştir. Çalışma grupları arasında TNF α (-308 G/A) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları açısından anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Tablo 4-4. Çalışma gruplarında TNF- α (-308 G/A)polimorfizmi genotip ve allel dağılımları

	Hasta (n=72)	Kontrol (n=104)
Genotip		
GG	58(%80,6)	84(%80,8)
AA	3 (%4,2)	2(%1,9)
GA	11(%15,3)	18(%17,3)
Allel		
G	127(%88,2)	186(%89,4)
A	17(%11,8)	22(%10,6)

n: birey sayısı

Serum TNF- α düzeyleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5. Çalışma gruplarında serum TNF- α düzeyleri

Gruplar	Hasta (N=72)	Kontrol (N=104)
TNF-α düzeyi (pg/ml)	49,47 $\pm$ 24,79	47,94 $\pm$ 21,02

n: birey sayısı

Tablo 4-6'da çalışma gruplarında NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) genotip ve allel dağılımlarına göre serum TNF- α düzeyleri gösterilmiştir. Hasta grubunda TNF- α (-308 G/A) G alleli taşıyan bireylerde serum TNF- α düzeyinin, G alleli taşımayan bireylere göre istatistiksel olarak azaldığı gözlemlenmiştir (p:0,045). Ayrıca hasta grubunda TNF- α (-308 G/A) AA genotipi taşıyan bireylerde serum TNF- α düzeyleri GA (p=0,009, %95 güven aralığı: 10,71-71,66) ve GG (p=0,002, %95 güven aralığı: 16,92-72,33) genotipi taşıyan bireylere göre istatistiksel olarak artmıştır. Kontrol grubunun kendi içerisinde NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) genotip ve allel dağılımlarına göre TNF- α düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Çalışma grupları arasında da NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) genotip ve allel dağılımlarına göre TNF- α düzeyleri açısından anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

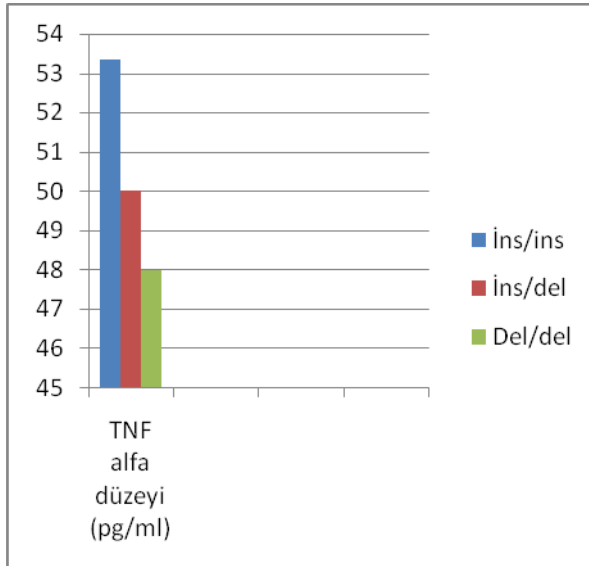
Tablo 4-6. Çalışma gruplarında NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) genotip ve allel dağılımlarına göre serum TNF- α düzeyleri

NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi	Hasta (n=72)	Kontrol (n=104)
Genotip		
İns/ins	53,34 $\pm$ 21,53 (n=12)	48,29 $\pm$ 20,53 (n=23)
Del/del	47,98 $\pm$ 22,48 (n=39)	46,57 $\pm$ 17,98 (n=58)
İns/del	50,02 $\pm$ 30,88(n=21)	51,04 $\pm$ 28,17 (n=23)
Allel		
İns	51,23 $\pm$ 27,53 (n=33)	49,67 $\pm$ 24,42 (n=46)
Del	48,69 $\pm$ 25,49 (n=60)	47,84 $\pm$ 21,28 (n=81)
TNF-α (-308 G/A) polimorfizmi		

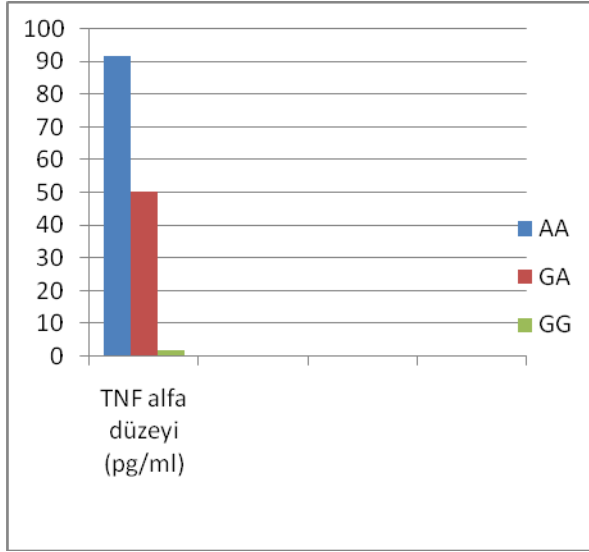
Genotip		
GG	47,08±20,00 (n=58)	46,77±21,87 (n=84)
AA	91,71±65,08 (n=3)**	64,78±1,96 (n=2)
GA	50,52±25,82 (n=11)	51,55±16,91 (n=18)
Allel		
A	59,35±38,37 (n=14)	52,87±16,51 (n=20)
G	47,63±20,86 (n=69)*	47,61±27,09 (n=102)

n: bireysayısı, *p=0,045; **GA (p=0,009) ve GG (p=0,002)

Şekil 4-1 ve şekil 4-2’de hasta grubunda NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) polimorfizmleri genotip dağılımlarına göre serum TNF- α düzeyleri şematik olarak gösterilmiştir. NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi açısından TNF- α düzeyleri ins/ins>ins/del>del/del şeklinde sıralanırken TNF- α (-308 G/A) polimorfizmi açısından AA>GA>GG şeklinde gözlemlenmiştir.



Şekil 4-1: Hasta grubunda NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi genotip dağılımlarına göre serum TNF- α düzeylerinin şematik gösterimi



Şekil 4-2: Hasta grubunda TNF- α (-308 G/A) polimorfizmi genotip dağılımlarına göre serum TNF- α düzeylerinin şematik gösterimi

Hasta grubunda gen polimorfizmleri ve enfeksiyon parametreleri arasındaki ilişki tablo 4-7’de gösterilmiştir. NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi Del/del genotipi taşıyan hastalarda Metisilene Dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığına anlamlı şekilde yüksek oranda rastlanılmıştır ($p=0,047$, $\chi^2=3,96$, OR=3,13, %95 güven aralığı= 0,98-9,95). TNF- α (-308 G/A) polimorfizmi GA genotipi taşıyan hastalarda da Metisilene Dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığının anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p=0,021$, $\chi^2=5,29$, OR=4,43, %95 güven aralığı= 1,16-16,84).

Tablo 4-7: Enfeksiyon parametreleri ve gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin hasta grubunda gösterilmesi

Enfeksiyon Parametreleri	NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi			TNF- α (-308 G/A) polimorfizmi		
	İns/ins (n=12)	Del/del (n=39)	İns/del (n=21)	GG (n=58)	AA (n=3)	GA (n=11)
Acinetobacter enfeksiyonu varlığı	4 (%33,3)	15 (%38,5)	8 (%38,1)	19 (%32,8)	2 (%66,7)	6 (%54,5)

Pseudomonas enfeksiyonu varlığı	4 (%33,3)	15 (%38,5)	9 (%42,9)	22 (%37,9)	-	6 (%54,5)
Klebsiella pneumoniae enfeksiyonu varlığı	1 (%8,3)	10 (%25,6)	6 (%28,6)	12 (%20,7)	1 (%33,3)	4 (%36,4)
Enterobakter enfeksiyonu varlığı	1 (%8,3)	8 (%20,5)	1 (%4,8)	8 (%13,8)	-	2 (%18,2)
Metisilene Dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığı	2 (%16,7)	14 (%35,9)*	3 (%14,3)	13 (%22,4)	-	6 (%54,5)**
Metisilene Duyarlı Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığı	2 (%16,7)	2 (%5,1)	2 (%9,5)	6 (%10,3)	-	-
Candida enfeksiyonu varlığı	-	1 (%2,6)	-	1 (%1,7)	-	-
Corynebacterium striatum enfeksiyonu varlığı	1 (%8,3)	2 (%5,1)	1 (%4,8)	3 (%5,2)	-	1 (%9,1)
Escherichia coli enfeksiyon	2 (%16,7)	4 (%10,3)	3 (%14,3)	6 (%10,3)	1(%33,3)	2 (%18,2)
Vankomisine Dirençli Enterokok enfeksiyonu varlığı	-	3 (%7,7)	1 (%4,8)	3 (%5,2)	-	1 (%9,1)
Aspergillus enfeksiyonu varlığı	-	1 (%2,6)	-	1 (%1,7)	-	-
Serratia marcescens	-	-	1 (%4,8)	1 (%1,7)	-	-

enfeksiyonu varlığı						
Streptococcus pneumoniae enfeksiyonu varlığı	2 (%16,7)	2 (%5,1)	1 (%4,8)	4 (%6,9)	1 (%33,3)	-

*p=0,047, **p=0,021

Tablo 4-8’de enfeksiyon ajanlarına göre hasta grubunda serum TNF- α düzeyleri gösterilmiştir. Enfekte olan birey sayısı istatistiksel olarak değerlendirme açısından yetersiz olmakla birlikte en yüksek TNF- α düzeylerinin Corynebacterium striatum enfeksiyonu varlığında, en düşük düzeyin ise Candida enfeksiyonu varlığında görüldüğü saptanmıştır.

Tablo 4-8. Hasta grubunda enfekte ajan tipine göre serum TNF- α düzeyleri

Enfeksiyon ajanları	TNF-α düzeyi (pg/ml) (n=72)
Candida enfeksiyonu varlığı(n=1)	36,72
Acinetobacter enfeksiyonu varlığı(n=27)	53,63 $\pm$ 35,60
Aspergillus enfeksiyon varlığı (n=1)	47,25
Corynebacterium striatum enfeksiyon varlığı (n=4)	55,72 $\pm$ 22,62
Pseudomonas enfeksiyonu varlığı(n=28)	46,49 $\pm$ 17,58
Klebsiella pneumoniae enfeksiyonu varlığı(n=17)	43,67 $\pm$ 9,53
Enterobakter enfeksiyonu varlığı(n=10)	44,71 $\pm$ 13,14
Metisiline dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığı(n=19)	42,71 $\pm$ 9,55

Metisilene Duyarlı Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığı(n=6)	43,27±8,59
Serratia marcescens enfeksiyonu varlığı (n=1)	71,17
Escherichia coli enfeksiyonu varlığı(n=9)	46,59±16,28
Vankomisine Dirençli Enterokok enfeksiyonu varlığı(n=4)	43,79±9,96
Streptococcus pneumoniae enfeksiyonu varlığı (n=5)	55,05±19,75

n: birey sayısı

5. TARTIŞMA

Sepsis, mikroorganizma ile vücudun bağışıklık, inflamasyon ve koagülasyon sistemlerinin etkileşimi sonucu birçok organı etkileyen, hemodinamik değişikliklere yol açan, şok ve organ yetmezliğine ilerleyerek ölüme neden olan klinik bir tablodur.

Organ disfonksiyonunun eşlik ettiği sepsis olgularında mortalitenin yüksek oluşunun nedenleri arasında; daha yoğun tedavi uygulanması, daha çok immünsüpresyon yapabilen ilaçların kullanımı, intravasküler ve üriner kateterizasyon gibi invaziv girişimlerin daha fazla yapılması, antibiyotik direnci olan mikroorganizmaların varlığı sayılabilir (11, 81).

Sepsis ve benzeri klinik tabloların tanısının en doğru şekilde ortaya konulması için 2005 yılında tanımlamalar yeniden düzenlenmiş ve ortak parametreler ortaya konulmuştur (14). En güncel sepsis tanı kriterleri Tablo 2-1 'de gösterilmiştir (15). Bu çalışmamızda, hasta grubunda sepsis tanısını oluşturacak şekilde kreatinin ($p<0,001$), BUN ($p<0,001$), WBC ($p<0,001$), CRP ($p<0,001$), laktat($p<0,001$), açlık kan şekeri ($p<0,001$), plazma K ($p=0,043$), SGPT ($p<0,001$), SGOT ($p<0,001$), laktat dehidrogenaz ($p<0,001$), total bilirubin ($p<0,001$) düzeyleri ile hasta ateşi ($p<0,001$) sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir.

Sepsiste incelenmesi gereken ilk iki molekül TNF- α ve interlökin-1 (IL-1) dir. Lökosit adhezyonu, lokal inflamasyon, nötrofil aktivasyonu, ateş gelişimi, eritropoezin baskılanması, yağ asidi sentezinde azalma ve albümin sentezinde azalma ile ilişkilidir. Bu sitokinlerin ciddi sepsis ile ilişkili olduğunu gösteren son kritik basamaklar bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmalarda hastalarda dolaşımdaki TNF- α düzeyi ile hasta sağkalımı arasında bir ilişki saptanmış (82).

Son yıllarda sepsisle ilgili en önemli gelişmelerden biri enfeksiyona inflamatuvar yanıtındaki bireysel farklılıklarda genetik faktörlerin ve polimorfizmlerin öneminin ortaya çıkarken, tek nükleotid polimorfizmi, TNF, IL-1, IL10, Fc- γ reseptör genleri gibi, mikroorganizmalara karşı inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde genlerin etkili olduğu görülmüştür. Sitokin genlerindeki polimorfizmler inflamatuvar ya da antiinflamatuvar sitokin üretimini ve konsantrasyonunu etkileyebilir. Bunu takiben hasta artmış ya da azalmış inflamatuvar yanıt verir. Tümör Nekroz Faktör α , IL-1, IL-6, IL-10 içeren çeşitli genetik polimorfizmlerin enfeksiyonlara yatkınlık ve septik şoklu

hastalarda mortalite artışı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Genetik faktörlerin sepsis fizyopatolojisinde rolünün anlaşılması ile bireysel korunma ve tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi mümkün olacaktır (83-85).

Çalışmamızda, NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) gen polimorfizmlerinin ve TNF- α serum düzeyini ve bu polimorfizmlerinin TNF- α düzeylerine olan etkisini sepsis hastalarında incelemeyi amaçladık.

Sitokin genlerinde polimorfizm (TNF reseptörleri, IL-1 reseptörleri) çalışmaları, Fc reseptörler, toll benzeri reseptörler, mannoz bağlayan proteinde mutasyonların ağır pnömokok, meningokok infeksiyonlarına ve septik şoka yol açtığını gösteren çalışmalar mevcuttur(86-88).

Çalışmamızda NFkB1 -94 ins/del polimorfizmi Del/del genotipi taşıyan hastalarda Metisilene Dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığına anlamlı şekilde yüksek oranda rastlanılmıştır (p=0,047). TNF- α (-308 G/A) polimorfizmi GA genotipi taşıyan hastalarda da yine Metisilene Dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonu varlığının anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir (p=0,021).

TNF- α geni 6. kromozomun kısa kolunda lokalizedir (7). Genin promotor bölgesinin pozisyon -308'de guaninin adeninle yer değiştirdiği tek bir baz değişiminin olduğu tanımlanmıştır. Bir çok çalışma göstermiştir ki mutant allelin fonksiyonel varyantı A-308 alleli tarafından genin transkripsiyonel aktivitesini artırır. TNF- α A alleli, G alleleine göre daha güçlü transkripsiyonel aktivatördür ve yüksek TNF- α düzeylerine neden olur (8). Bu bilgiye paralel olarak, çalışmamızda hasta grubunda TNF- α (-308 G/A) G alleli taşıyan bireylerde serum TNF- α düzeyinin, G alleli taşımayan bireylere göre istatistiksel olarak azaldığı gözlemlenmiştir (p=0,045). Ayrıca hasta grubunda TNF- α (-308 G/A) AA genotipi taşıyan bireylerde serum TNF- α düzeylerinin GA (p=0,009) ve GG (p=0,002) genotipi taşıyan bireylere göre istatistiksel olarak artışı saptanmıştır.

Tak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, NF- κ B'ye bağlı inflamasyonun baskılanmasıyla IL-1 β , IL-6 ve TNF- α proinflamatuvar proteinlerin hücredeki seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (89). Ayrıca Giachelia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, hücrede artmış IL-6 seviyeleriyle NF- κ B1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi delesyon alleli arasındaki pozitif ilişki saptanmıştır (90).

Barber ve arkadaşları yanıklı hastalarda -308 A alleli taşıyanlar ile GG homozigot bireyleri karşılaştırdıkları çalışmalarında ciddi sepsis gelişim riskinin -308 A alleli taşıyanlarda daha yüksek olduğunu saptamışlardır(91).

De Bont ve arkadaşları 1993'te neonatal sepsiste IL-6 ve TNF- α serum düzeylerinin anlamlı arttığını fakat IL-1 β 'nın hafifçe yükseldiğini bildirmişlerdir (92). Yine neonatal sepsiste 1994'te ülkemizden Özdemir ve arkadaşları ek olarak IL-1 β 'nın da arttığını saptamışlardır (93). Casey ve arkadaşları 1993'te sepsis sendromu kriterlerini taşıyan hastalarda mikrobiyolojik dokümanlarına bakılmaksızın TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerinin yüksek bulunduğunu ve yüksek IL-6 ile sağ-kalım arasında ters ilişki olduğu sonucuna ulaşmışlardır (94). Van Deuren 1994'te fulminant septisemide TNF- α düzeyinin enfeksiyonun erken evrelerinde kısa ve geçici bir süre ile yükseldiğini, IL-1 β yapımının ise hiçbir zaman uyarılmadığını belirtmiştir (95). Çalışmamızda serum TNF- α düzeyleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Tablo 4-5). Sepsis patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülen TNF- α 'nın gerçek önemi ve hastalık süresince etkin rol oynadığı dönemler, hastaların belli aralıklarla serum TNF- α takibine alındığı çalışmalarla belirlenmesi önerilmektedir.

Karban ve arkadaşlarının çalışmasında NFkB1 -94 del ATTG promotor alleli (Del)'nin nükleer proteinlere hiç bağlanmadığı ya da daha zayıf bağlandığı, NFkB1 -94 ins ATTG promotor allelinin (I) ise nükleer proteinlere daha güçlü bağlandığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak Del allelinin promotor aktivitesi düşük, I allelinin promotor aktivitesi ise yüksek olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, Del alleli, NFkB1 ekspresyonunda azalmaya neden olup, p50/ p105 NFkB heterodimerinin daha az düzeylerde üretilmesine ve inflamatuvar yanıtın azalmasına yol açabilir (4).

Çesitli kanserler, psoriasis, ülseratif kolit, romatoid artrit gibi bazı immünoinflamatuvar hastalıkların da bulunduğu çeşitli gruplarda NFkB1 -94 ins/del ATTG promotor gen polimorfizmi araştırılmıştır (96-98). Bu çalışmalarda elde edilen sonuçların birbiri ile çeliştiği görülmekte, aynı hastalık grubunun araştırıldığı çalışmalarda bile birbirinden farklı sonuçlar elde edilmistir. Tüm bu çelişkilerin nedeni olarak ırk farklılıkları gösterilmiştir (97,99,100). Çalışmamızda gruplarımız arasında NFkB1 -94 ins/del ATTG polimorfizmi genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya rastlanmamıştır.

TNF- α 'nın transkripsiyonu NFkB tarafından gerçekleştirilmektedir (4). Dolayısıyla artmış NFkB aktivitesinin TNF- α 'nın ekspresyonunda artışa neden olması beklenebilir. Ancak çalışmamızda gerek hasta grubunda gerekse kontrol grubunun kendi içerisinde NFkB1 -94 ins/del ATTG ve TNF- α (-308 G/A) polimorfizmleri genotip ve allel dağılımlarına göre TNF- α düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Çalışma grupları arasında da NFkB1 -94 ins/del ve TNF- α (-308 G/A) genotip ve allel dağılımlarına göre TNF- α düzeyleri açısından anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Ancak çalışmaya alınan olgu sayılarının artırılması ile bu konuda daha güvenilir sonuçlara ulaşılabilir.

Yaptığımız deneysel çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgular her iki polimorfizm ile sepsis riski arasında bir ilişki olmadığını ancak TNF- α (-308 G/A) polimorfizmi açısından AA genotip ve A allelinin hastalarda artmış TNF- α düzeyleri ile ilişkili olduğunu öngörmektedir.

Sonuç olarak sepsis tedavisinde ve genetik alanında birçok yenilik mevcut iken gelecekte gen tedavisinde, polimorfizm ile ilgili yapılan çalışmaların faydalı olacağını ve bu çalışmada elde ettiğimiz verilerin geniş katılımlı çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Alp E, Doğanay M. Sepsis: Tanımlar. Arman D, Uzun Ö (Editörler). Sepsis ve Tedavisi. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. s.9-17.
2. Bone RC. The patogenesis of sepsis. Ann Intern Med 1991;115:4
3. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003;348/2:138-150
4. Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ ve Bailey-Wilson JE. Functional annotation of a novel NFkB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. Human Molecular Genetics, 2004;13, 35-45.
5. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG ve Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacology Therapeutics, 2008;117, 244-79.
6. Neta R, Oppenheim JJ, Gillis S. The in-vivo effects of interleukin-1. I Bone marrow cells are induced to cycle after administration of interleukin-1.5. Immunol 1987;139:1861.
7. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. Hum Mol Genet 1992;1(5):353.
8. Mazaheri S, Hajilooi M, Rafiei. A. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with migraine without aura. J Neurol 2006; 253(12):1589-93.
9. Trabace S, Brioli G, Lulli P, Morellini M, Giacobazzo M, Cicciarelli G, Martelletti P. Tumor necrosis factor gene polymorphism in migraine. Headache 2002; 42(5):341-5.
10. Damas P, Reuter CA, Gysen P. Tumor necrosis factor and interleukin 1 serum levels during severe sepsis in humans. Crit-Care-Med 1989;17:975-8.
11. Witt MD, Chu LA: Yoğun Bakım Hastalarında İnfeksiyonlar. In: Bongard FS, Sue DY, editörler. Current Yoğun Bakım Tanı ve Tedavi Türkçe Baskısı. 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2004; 391-395.
12. Rodríguez A, Rello J, Neira J, Maskin B, Ceraso D, Vasta L et al. Effects of highdose of intravenous immunoglobulin and antibiotics on survival for severe sepsis undergoing surgery. Shock. 2005; 23(4):298-304.

13. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest.1992; 101(6):1644-1655.
14. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*, 2005; 6: 2-8. J
15. Yorgancı K, Sayek I. Sepsis ve ilgili tanımlamalar, *Yoğun Bakım Dergisi* 2005; 5(2): 75-79
16. Wilkinson JD, Pollack MM, Ruttiman UE, Glass NL, Yeh TS. Outcome of pediatric patient with multiple organ system failure. *Crit Care Med* 1986; 14:271-4.
17. Members of American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine* 1992; 20(6): 864-874.
18. Sands K, Bates D, Lanken P. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278: 234-240.
19. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348(16):1546-54.
20. Doğanay M. Sepsis. Willke A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları Kitabı'nda*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1996; 473-485.
21. Tavazzi L. Towards a more precise definition of heart failure aetiology. *Eur Heart J* 2001; 22:192-195.
22. Uzun Ö. Sepsiste Empirik Tedavi Yaklaşımı. Akalın HE, Kanra G (editörler). *Empirik Antibiyotik Tedavisi Kitabı'nda*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1994; 175- 186.
23. Ansoy A. Septisemi. *Petek* 2001; 1(4): 99- 107.
24. Bochud PY, Bonten M, Marchetti O, Calondra T. Antimicrobial Therapy for Patients With Severe Sepsis and Septic Shock: An Evidence-Based Review. *Crit Care Med* 2004; 32(11): 495-512

25. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical care medicine*. 2006;34(2):344-53.
26. Sevim E, Çelik İ, Karlıdağ G. Fırat Üniversitesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde Gelişen nazokomial sepsiste mortalite için risk faktörleri. *Fırat Tıp Dergisi* 2011 ; 16 (2): 71-77.
27. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-91.
28. Akalın H. Sepsis Sendromu. Dündar İH.(çeviri editörü). Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi kitabında. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. 231-9.
29. Yorgancı K. Sepsis patofizyolojisi *Yoğun Bakım Dergisi* 2005;5(2):80-84.
30. Novack V, Eisinger M, Frenkel A, Terblanche M, Adhikari NK, Douvdevani A et al. The effects of statin therapy on inflammatory cytokines in patients with bacterial infections: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Intensive Care Med* 2009; 35: 1255–1260
31. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive care medicine*. 2008;34(1):17-60.
32. Baldwin AS. The transcription factor NF- κ B and human disease, *The Journal of Clinical Investigation* 2001;107(1).
33. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: Last pieces in the NF- κ B puzzle? *Curr Biol* 1998; 8(1), 19-22.
34. Baeuerle PA ve Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12, 141-79.
35. Blank V, Kourilsky P ve Israël A. NF- κ B and related proteins: Rel/dorsal homologues meet ankyrin-like repeats. *Trends in biochemical sciences* 1992;17(4), 135-140.
36. Maeda S ve Omata M. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Science* 2008; 99, 836- 42.
37. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor κ B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Int Care Med* 1998; 24:1131-1135.

38. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of disease. *Clin Chem* 1999; 45: 7-17.
39. Abraham E. NF- κ B activation. *Crit Care Med* 2000; 28(4): N100-N104.
40. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology* 2000; 18, 621-663.
41. Luqman S, Pezzuto JM. NF κ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother.Res.* 2010; 24: 949-963.
42. Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF- κ B and cancer: how intimate is this relationship. *Mol.Cell Biochem.* 2010; 336: 25-37.
43. Trinh DV, Zhu N, Farhang G, Kim BJ ve Huxford T. The nuclear I κ B protein I κ B zeta specifically binds NF- κ B p50 homodimers and forms a ternary complex on κ B DNA. *Journal of Molecular Biology* 2008; 379, 122- 35.
44. Baud V, Karin M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2009; 8: 33-40.
45. Ikebe T, Takeuchi H, Jimi E, Beppu M, Shinohara M, Shirasuna K. Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production of oral squamous cell carcinoma. *Int.J.Cancer* 1998; 77: 578-585.
46. Baldwin AS, Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 1996; 14: 649-683.
47. Scheidereit C. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* 2006; 25: 6685-6705.
48. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25: 280-288.
49. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B2 in maturing B cells. *Nat.Immunol.* 2002; 3: 958-965.
50. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B et al. CD40 regulates the processing of NF- κ B2 p100 to p52. *EMBO J.* 2002; 21: 5375-5385.
51. Dejardin E, Droin NM, Delhase M et al. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF- κ B pathways. *Immunity.* 2002; 17: 525-535.

52. Derudder E, Dejardin E, Pritchard LL, Green DR, Korner M, Baud V. RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 23278-23284.
53. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol.Cell* 2001; 7: 401-409.
54. Atreya I, Atreya R ve Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine* 2008; 263, 591- 6.
55. O'Shea JJ ve Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28, 477-87.
56. Cogswell PC, Scheinman RI ve Baldwin AS Jr. Promoter of the human NF-kappa B p50/p105 gene. Regulation by NF-kappa B subunits and by c-REL. *Journal of Immunology* 1993;150, 2794-804.
57. Li H, Gao L, Shen Z, Li CY, Li K et al. Association study of NFKB1 and SUMO4 polymorphisms in Chinese patients with psoriasis vulgaris. *Archives of Dermatologic Research* 2008;300(8):425-33.
58. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975; 72: 3666-70.
59. Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B. *Advanced Immunology*, St Louis, C.V. Mosby, 1996.
60. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*, 2nd ed. Philadelpha, W.B. Saunders 1994.
61. Anderson WH, Davidson TM, Broide DH. Mast cell TNF mRNA expression in nasal mucosa demonstrated by in situ hybridization: a comparison of mast cell detection methods. *J Immunol Methods* 1995;145-155.
62. Callard R, Gearing A. *The Cytokine Facts Book*. Orlando, Academic Press, 1994.
63. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1(5):353.
64. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1997;1;94(7):3195-9.

65. Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA ve Goeddel DV. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *The Proceedings of the National Academy of Science* 1995; 82, 6060-4.
66. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology* 2008; 214, 149-60.
67. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW ve Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research* 2007; 48, 751-62.
68. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NFkappa B signal transduction pathway. *Nature Cell Biology* 2004; 6, 97-105.
69. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Third Edition. W.B. Saunders: Philadelphia, 1997; 250-77.
70. Babu KS. Role of tumor necrosis factor alpha in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2004; 24(4): 583-97.
71. Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet.* 1987; 1(8529): 355-7.
72. Cerami A, Beutler B. The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol. Today.* 1988; 9: 28-31.
73. Tracey KJ, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Curr. Opin. Immunol.* 1989; 1(3): 454-61.
74. Lee DCW and Lau ASY. Effects of Panax ginseng on Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Inflammation: A Mini-Review. *Molecules.* 2011; 16: 2802-16.
75. Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Reports* 2000; 2, 216-24
76. Campbell KJ ve Perkins ND. Regulation of NF-kappaB function. *Biochem Soc Symp* 2006; (73), 165-80.
77. Glavac D, Ravnik-Glavac M, O'Brien SJ, Dean M. Polymorphisms in the 3'untranslated region of the I κ B/MAD-3 (NFKBI) gene located on chromosome 14. *Human Genetics* 1994; 93(6), 694-696.

78. Curran JE, Weinstein SR ve Griffiths LR. Polymorphic variants of NF- κ B1 and its inhibitory protein NF- κ BIA, and their involvement in sporadic breast cancer. *Cancer Letters* 2002;188 (1-2), 103-107.
79. Baldwin AS. The transcription factor NF- κ B and human disease, *The Journal of Clinical Investigation* 2001;107(1).
80. Somec R, Amaglio N, Spierer and Rechavi G. Genetic predisposition to infectious pathogenes; a review of less familiar variants. *Pediatr Infect Dis J*, 2003; 22:457-61.
81. Kayhan Z. *Klinik Anestezi 3. Baskı*, Ankara: Logos Yayıncılık, 2004;899-903.
82. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, Larosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *N Eng J Med* 2001; 344(10): 699-709
83. Opal SM, Vera A, De Palo M. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117; 1162-1172.
84. O'Dwyer JM, Mankan AK, Stordeur P. The occurrence of severe sepsis and septic shock are related to distinct patterns of cytokine gene expression. *Shock* 2006; 26: 544-550.
85. Van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphism in infectious disease. *Intensive Care Med* 2000; 26: 98-102.
86. Somec R, Amaglio N, Spierer and Rechavi G. Genetic predisposition to infectious pathogenes; a review of less familiar variants. *Pediatr Infect Dis J*, 2003; 22:457-61.
87. Emonts M, Hazelzet JA, Groot R De and Hermans PWM. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infection. *Lancet Infect Dis*, 2003; 565-577.
88. Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D et al. Gene variants of the bactericidal / permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: Gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med*, 2001; 29(3):557-61.
89. Tak PP ve Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11.
90. Giachelia M, Voso MT, Tisi MC, Martini M. et al. Interleukin-6 plasma levels are modulated by a polymorphism in the NF- κ B1 gene and are associated with outcome following rituximab-combined chemotherapy in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2012; 53(3), 411-6.

91. Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet* 2004;41:808-13.
92. De Bont ES, Martens A, van Raan J, et al. Tumor necrosis factor α , interleukin 1 and interleukin 6 plasma levels in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 1993;33:380.
93. Ozdemir A, Oygur N, Gultekin M, et al. Neonatal tumor necrosis factor, interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 response to infection. *Am J Perinatol* 1994 Jul;11:282
94. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993 Oct 15;119:771.
95. Van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Demacker PN, et al. Differential expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of meningococcal infections. *J Infect Dis* 1994 Jan;169:157.
96. Butt C, Sun S, Peddle L, Greenwood C, Hamilton S et al. Association of nuclear factor-kappaB in psoriatic arthritis. *Journal of Rheumatology* 2005; 32, 1742-4.
97. Oliver J, Gómez-García M, Paco L, López-Nevot MA, Piñero A et al. A functional polymorphism of the NFKB1 promoter is not associated with ulcerative colitis in a Spanish population. *Inflammatory Bowel Disease* 2005;11, 576-9.
98. Orozco G, Sánchez E, Collado MD, López-Nevot MA, Paco L et al. Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2005; 65, 183-6.
99. Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kral G, Bouma G. A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *International Journal of Immunogenetics* 2005;32, 401-5.
100. Mirza MM, Fisher SA, Onnie C, Lewis CM, Mathew CG et al. No association of the NFKB1 promoter polymorphism with ulcerative colitis in a British case control cohort. *Gut* 2005; 54, 1205-6.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 380

Tarih : 20.02.2014

Konu : Doç Dr. H.Arzu ERGEN

Sayın Doç Dr. H.Arzu ERGEN
DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı

İlgi :DETAE nın 30/01/2014 gün ve 59 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Leyla ACAR'ın yürüteceği 2014/281 dosya numaralı "Sepsiste Nükleer Faktör Kappa B ve TNF-alfa Gen Varyantlarının ve TNF-alfa Serum Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 07/02/2014 gün ve 03 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


 Prof.Dr. A. Yagiz ÜRESİN
 İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
 Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Sepsiste Nükleer Faktör Kappa B ve TNF-alfa Gen Varyantlarının ve TNF-alfa Serum Düzeyinin İncelenmesi”			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç Dr. H.Arzu ERGEN			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyoloji			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul DETAE Moleküler Anabilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz : Deneysel Araştırma			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	30/01/2014		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☒		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐				
	SIGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	☐				
	İLAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:03	Tarih: 07/02/2014				
	İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Anabilim Dalında görevli Doç Dr. H.Arzu ERGEN'in sorumluluğunda ve Yüksek Lisans Öğrencisi Leyla ACAR'ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI				19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:				Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a .maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli iznin alınması gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	LEYLA	Soyadı	ACAR
Doğ.Yeri	SİVEREK	Doğ.Tar.	24.08.1987
Uyruğu	TC	TC Kim No	29753433668
Email	leylagenetik63@gmail.com	Tel	05464470617

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. DETAE MOLEKÜLER TIP ABD	
Lisans	İ.Ü. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ	2012
Lise	ŞANLIURFA LİSESİ	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	57,50	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	80,60	78,54	65,98
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi