

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

(DOKTORA)

**SEPSİSTE TLR-9 GEN POLİMORFİZMLERİNİN VE
SERUM DÜZEYİNİN İNCELENMESİ**

DOÇ.DR.NAZAN ATALAN

**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
Doktora Programında Nazan ATALAN tarafından hazırlanan "Sepsiste TLR9 Gen
Polimorfizmlerinin ve Serum Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez
sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

10 / 07 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Turgay İSBİR	Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
2.Prof. Dr. İlhan YAYLIM	İÜ DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı
3.Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU	İÜ. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı
4.Prof. Dr. Arzu ERGEN	İÜ. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı
5.Doç. Dr. Uzay GÖRMÜŞ	İst. Bilim Ü. Tıp Fak. 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.


NAZAN ATALAN

İTHAF

Bu tezi akademik çalışmalarına ilham olması dileğimle
kızım Ecem Nur Aksoy'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi sevgili hocam Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Doktora eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen tüm değerli hocalarıma; danışmanlığımı üstlenen Prof. Dr Arzu Ergen'e, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof Dr İlhan Yaylım'a,

Sadece doktora eğitimim ve akademik kariyerim süresince değil hayatımın her döneminde beni destekleyen, her türlü kaprisimi sabırla çeken, sevgilerini daima hissettiğim, varlıklarından güç aldığım, benim ben olmamı sağlayan başta sevgili annem Nezahat Atalan ve babam Bayram Atalan olmak üzere tüm aileme; kan kardeşlerim Suzan Atalan Oğuz'a, Özlem Atalan'a, Ünal Hakan Atalan'a, can kardeşlerim Tevfik Oğuz'a, Gözde Atalan'a, sevgili oğlum Atahan Oğuz'a ve biricik kızım Ecem Nur Aksoy'a ve Yaşar Özlen'e varlıkları için sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38207

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sepsis Epidemiyolojisi.....	4
2.2. Sepsis Etiyolojisi.....	6
2.3. Sepsisin Patofizyolojisi.....	7
2.4. Sepsiste Terminoloji.....	10
2.5. Sepsise Klinik Yaklaşım.....	13
2.6. Sepsiste Tedavi.....	14
2.6.1. Hızla Tanının Konması ve Hastanın Stabil Duruma Getirilmesi.....	18
2.6.2. Antibiyotik Tedavisi.....	20
2.6.3. Primer Odağın Tedavisi.....	20
2.6.4. Destek Tedaviler.....	21
2.6.5. Pedyatrik Hastada Ağır Sepsise Yaklaşım.....	23
2.7. Sepsiste Moleküler Mekanizmalar ve Toll Like Reseptörler	26
2.7.1. Toll-like Reseptörlerin Yapısı.....	27
2.7.2. Toll-like Reseptör Sinyal Yolu.....	30
2.7.3. Toll like Reseptör Ailesi ve Fonksiyonları.....	32
2.7.4. Toll like Reseptörlerin İmmun Yanıta Etkileri.....	34
2.7.5. TLR-9 ve Sepsis İlişkisi.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı	37
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.3. Kullanılan Gereçler	37
3.4. Kullanılan Çözeltiler	38
3.4.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	38
3.4.1.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)	38
3.4.1.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	38
3.4.1.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)	38
3.5. Kullanılan Kitler	38
3.6. Kullanılan Yöntemler	38
3.6.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	38
3.6.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği ve Hazırlık Aşaması	38
3.6.1.2. Kan Örneklerinden Lizat Hazırlanması	39
3.6.1.3. DNA'ya Bağlanma	39
3.6.1.4. DNA Yıkama Aşaması	39
3.6.1.5. DNA Elüsyon Aşaması	39
3.6.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	40
3.6.3. Gen Polimorfizmlerinin Tespiti	40
3.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı	40
3.6.3.2. PZR Karışımının Hazırlanışı	41
3.6.3.3. TLR-9 (C>T) ve TLR-9 (-1486 T>C) Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması	42
3.6.3.4. TLR-9 ve TLR-9 (-1486 T>C) PCR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi ve PCR Ürünlerinin Kontrolü	43
3.6.3.5. TLR-9 (C>T) Polimorfizmi Tespiti için Restriksiyon Enzimi Kesimi	43
3.6.3.6. TLR-9 (-1486 T>C) Polimorfizmi Tespiti İçin Restriksiyon Enzimi Kesimi	44
3.6.4. Serum TLR-9 düzeylerinin Tayini	46
3.6.5. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	46
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	70

ETİK KURUL KARARI	83
ÖZGEÇMİŞ	86

TABLOLAR LISTESİ

Tablo 2-1: Sepsis gelişimini kolaylaştıran faktörler	5
Tablo 2-2: Sepsiste proenflamatuvar ve antienflamatuvar yanıtlar	9
Tablo 2-3: SIRS tanı kriterleri	11
Tablo 2-4 : Sepsiste tanı kriterleri.....	12
Tablo 2-5 : Sepsiste Sağkalım Kampanyası bakım demetleri	15
Tablo 2-6: Öneriler: Başlangıç resüsitasyonu ve enfeksiyon konuları	16
Tablo 2-7: Öneriler: Pediatriye özel konular	17
Tablo 3-1: TLR-9 (C>T) için PZR karışımının hazırlanması.....	41
Tablo 3-2: TLR-9 (-1486 T>C) için PZR karışımının hazırlanması.....	42
Tablo 3-3: TLR-9 (C>T) polimorfizmine ait amplifikasyon şartları.....	42
Tablo 3-4: TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmine ait amplifikasyon şartları.....	43
Tablo 3-5: BstU1 enzimi için kesim protokolü.....	44
Tablo 3-6: AfiIII enzimi için kesim protokolü.....	45
Tablo 4-1: Çalışma Gruplarına ait demografik parametreler.....	50
Tablo 4-2: Çalışma gruplarına ait biyokimyasal parametreler	51
Tablo 4-3: Sepsis grubunda saptanan etken patojen mikroorganizmalar	52
Tablo 4-4. Çalışma gruplarında TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları.....	53
Tablo 4-5. Çalışma gruplarında TLR-9 (C>T) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları	53
Tablo 4-6 : Çalışma gruplarında serum TLR-9 düzeyleri.....	54
Tablo 4-7: Çalışma gruplarında TLR-9 (C>T) ve TLR-9 (-1486 T>C) genotip ve allel dağılımlarına göre serum TLR-9 düzeyleri	55
Tablo 4-8 : Sepsis grubunda enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizmalar ve gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin gösterilmesi.....	57
Tablo 4-9 :Sepsis grubunda enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizma tipine göre serum TLR-9 düzeyleri.....	58
Tablo 4-10: Çalışma gruplarında TLR-9 polimorfizmlerine ait haplotip frekansları.....	59
Tablo 4-11:Sepsis grubunda klinik parametreler ve genotip dağılımları arasındaki ilişkinin gösterilmesi.....	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: SIRS, sepsis ve ağır sepsis ilişkisi	3
Şekil 2-2: Sepsis patogenezindeki mediyatörler	8
Şekil 2-3: Organ disfonksiyonuna yönlendiren moleküler mekanizmalar	10
Şekil 2-4: TLR'lerin lokalizasyonları	Error! Bookmark not defined.
Şekil 2-5: TLR'lerin ligandları tanınması.	29
Şekil 2-6: Toll-like Reseptör Sinyal Yolu.....	30
Şekil 3-1: TLR-9 (C>T) gen polimorfizmine ait %2'lik agaroz jeldeki görüntü.....	44
Şekil 3-2: TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi değişimine ait %3'lük agaroz jeldeki görüntü.....	45
Şekil 4-1: Sepsis grubunda TLR-9 (C>T) polimorfizmi genotip dağılımlarına göre Serum TLR-9 düzeylerinin şematik gösterimi.....	56
Şekil 4-2 : Sepsis grubunda TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi genotip dağılımlarına göre Serum TLR-9 düzeylerinin şematik gösterimi.....	56
Şekil 4-3 : LD Grafiği.....	59

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

TLR:	Toll-like Reseptörler
TNF:	Tümör Nekrosis Faktör
SIRS:	Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
MODS:	Çoklu Organ Fonksiyon Bozukluğu Sendromu
DIC:	Yaygın Damar İçi Pıhtılaşma
CRP:	C-Reaktif Protein
PIRO:	Predisposition, Infection, Response, Organ Dysfunction
KNS:	Koagülaz Negatif Stafilokok
CMV:	Sitomegalo Virüs
ATS:	Amerikan Toraks Derneği
ESICM:	Avrupa Yoğun Bakım Derneği
ACCP:	Amerikan Göğüs Hastalıkları Derneği
SCCM:	Yoğun Bakım derneği
SIS:	Cerrahi Enfeksiyon Derneği
IL:	İnterlökin
LPS:	Lipopolisakkarid
PaCO ₂ :	Arteriyel Parsiyel Karbondioksit Basıncı
PaO ₂ :	Arteriyel Parsiyel Oksijen Basıncı
CARS:	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
SKB:	Sistolik Kan Basıncı
OAB:	Ortalama Arter Basıncı
SVR:	Sistemik Vasküler Direnç
YBÜ:	Yoğun Bakım Ünitesi
SSC:	Surviving Sepsis Campaign
ARDS:	Akut Respiratuvar Distres Sendromu
PEEP:	Pozitif End Expiratory Pressure
FIO ₂ :	İnspire Edilen Fraksiyone Oksijen
ScvO ₂ :	Santral Venöz Oksijen Satürasyonu
ACTH:	Adrenokortikotropik Hormon
CVVHF:	Devamlı veno-venöz hemofiltrasyon

VTE: Venöz Trombo Emboli
LMWH: Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
UFH: Unfraksiyone Heparin
TPN: Total Parenteral Nutrisyon
PRR: Motif Tanıma Reseptörü
LRR: Lösin Tekrar Motifleri
PAMP: Mikrobiyal Bağlantılı Moleküler Motifler
TIR: İntrasellüler Toll/IL-1 reseptör
MYD88: Myeloid Differentiation Primary-Response Protein
MAL: MYD88-Adaptor-Like Protein
TRIF: TIR Domain-Containing Adaptor Protein İnducing IFN β
TRAM: TRIF-Related Adaptor Molecule
IRAK: IL-1R-Associated Kinases
TRAF: TNF Receptor-Associated Factors
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MALP-2: Mikoplazmal Lipopeptid
JNK: JUN N-Terminal Kinase
BLP: Bakteri Lipopeptidi
NF- κ B: Nuclear factor- κ B
IRF: İnterferon-regulatory factors
AP1: Activator protein 1
IFN: Type I interferon
NLR: NOD-like receptor
I κ B: İnhibitör κ B
PI3K: Fosfoinositol-3 kinaz
TOLLIP: Toll Interacting Protein
PCR: Polymerase Chain Reaction
CpG: Sitozin fosfat Guanosin

ÖZET

Atalan N (2015). Sepsiste TLR9 gen polimorfizmlerinin ve serum düzeyinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp AD. Doktora Tezi. İstanbul

Enfeksiyona karşı konakta oluşan sistemik enflamatuvar yanıt olarak tanımlanan sepsis; ilerleyen sistemik enflamatuvar yanıt ile ağır sepsis ve septik şoka neden olabilen, bir yada birden çok organda fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden semptomlara yol açan, sık karşılaşılmamasına ve yüksek mortalitesine rağmen tanısı ve tedavisi oldukça zor olan bir sendromdur. Toll-like reseptörlerde (TLR) bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı savunmasında, interlökin (IL)-1, IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve diğer proenflamatuvar sitokinlerin üretimi ile birlikte birçok patojene karşı hem doğal immün cevabın oluşmasını hem de kazanılmış immün cevabın aktive olmasını sağlayan çok önemli role sahip transmembran proteinlerdir. Çalışmamızda TLR-9 serum düzeyi ile TLR-9 (-1486 T>C) ve TLR-9 (C>T) gen polimorfizmleri incelenerek, hem bu polimorfizmlerinin TLR-9 düzeylerine olan etkisi hem de sepsis klinik ve biyokimyasal parametreleriyle birlikte etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla 80 sepsis hastası ve 100 sağlıklı kontrol grubunda TLR-9 gen polimorfizmlerini saptamak için PCR-RFLP ve TLR-9 serum düzeylerini incelemek için ELISA teknikleri kullanılmıştır.

Sonuç olarak yaptığımız deneysel çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgular; sepsis ile her iki TLR-9 (C>T) ve TLR-9(-1486 T>C) polimorfizmleri arasında bir ilişki olmadığını, ağır sepsisin azalmış serum TLR-9 düzeyleri ile fakat sepsise bağlı doku hipoperfüzyonu olan laktatın >5 mmol/L olduğu olgularda ise artmış serum TLR-9 düzeyleri ile ilişkili olduğunu öngörmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, enflamasyon, polimorfizm, toll-like reseptörler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38207

ABSTRACT

Atalan N (2015). Analysis of Toll Like Receptor-9 Serum Level and Gene polymorphisms In Sepsis. Istanbul University, Institute Of Health Sciences, Molecular Medicine. Phd Thesis. Istanbul.

Sepsis, which is described as the systemic inflammatory response appearing in the host against infection, is a syndrome which can cause a serious sepsis and septic shock as well as such symptoms leading function disorder and organ failure in one or multiple organs through a progressing systemic inflammatory response. Despite its frequency and high level of mortality, its diagnosis and treatment are very difficult. They are transmembrane proteins which have a vital role which both creates a natural immune responses against lots of pathogens and activates the obtained immune response through the production of interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and other pro-inflammatory cytokines in toll-like receptors (TLR) in the defense of immune system against infections. In our study, we analyzed TLR-9 serum level and TLR-9 (-1486 T>C) and TLR-9 (C>T) gene polymorphisms by aiming at analyzing both the effect of these polymorphisms on TLR-9 levels and their effects together with their sepsis clinical and biochemical parameters. In this regard, PCR-RFLP technique was used in order to detect TLR-9 gene polymorphisms and ELISA technique was used in order to analyze TLR-9 serum levels in the control group of 80 sepsis patients and 100 healthy individuals.

In conclusion, our findings as a result of our experimental studies put forward that there is no relation between sepsis and both TLR-9 (C>T) and TLR-9(-1486 T>C) polymorphisms; however there is a relation between serious sepsis and decreased serum and increased serum TLR-9 levels, in the cases of lactate which has tissue hypoperfusion based on sepsis is >5 mmol/L.

Keywords: Sepsis, inflammation, polymorphism, toll-like receptors

Istanbul University Scientific Research Projects Unit supported this study. Project No: 38207

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis "Enfeksiyona sistemik enflamatuvar yanıt" olarak tanımlanır. Konakta enfeksiyona karşı gelişen, ağır sepsis ve septik şoka yol açabilen zararlı bir sistemik enflamatuvar yanıttır. Ağır sepsis ve septik şok ile bir yada birden çok organda fonksiyon bozukluğu ve yetmezliğe kadar giden semptomlara yol açan, sık karşılaşılmamasına rağmen tanı ve tedavisi oldukça zor olan bir sendromdur (1). Klinik tablo sepsisten septik şoka ve çoklu organ yetmezliği tablosuna doğru ilerledikçe mortalite de belirgin olarak artmaktadır. Lökositoz ya da lökopeni, ateş ya da hipotermi, açıklanamayan taşikardi ya da taşipne, mental durum değişiklikleri, renal ya da hepatik fonksiyonlardaki açıklanamayan değişiklikler, trombositopeni ya da yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC) varlığı, artmış oksijen tüketimi, açıklanamayan laktik asidoz, periferik vazodilatasyon bulguları, düşük sistemik vasküler direnç ya da artmış kalp debisinde sepsis düşünülmelidir (2).

Sepsis etkeni patojen mikroorganizma farklı olsa da klinik tablo aynıdır. Etkenler hastanın yaşı, hastanede ya da yoğun bakım ünitesinde yatıyor olup olmaması, altta yatan kronik hastalıklarının durumu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilir (3). Yüksek mortaliteye sahip septik hastaların yönetimini standardize etmek üzere hastaya sıralı yaklaşım ve tedavi önerileri sunan kılavuzlarla sepsiste sağkalımın artırılması amaçlanmaktadır.

Sepsis patofizyolojisi sistemik enflamasyon, koagülasyon ve bozulmuş fibrinoliz ile ilişkilidir. Moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmelerle patojen mikroorganizmalar ve doğal immun sistemin komponentleri arasındaki etkileşimlerin incelenmesiyle sepsis patogeneğinde mikrobiyal patojenler ve konak enflamatuvar yanıtının birlikte yer aldığını göstermektedir. Toll like reseptörler (TLR) bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı savunmasında, interleukin (IL)-1, IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve diğer proenflamatuvar sitokinlerin üretimi ile birlikte birçok patojene karşı hem doğal immün cevabın oluşmasını hem de kazanılmış immün cevabın aktive olmasını sağlayan çok önemli role sahip transmembran proteinlerdir (4).

TLR-9 mikrobiyal DNA için tanıma kalıbı taşıyan bir TLR'dür. Bakteri DNA'sı metillenmemiş CpG dinükleotidi ile endoplazmik retikulumda lokalize olan TLR-9'u aktive ederek doğal immun sistem yanıtını başlatır (5). Reseptörün bakteriyel endotoksin ve ekzotoksin tanıma kalıbındaki genetik değişiklikler yoğun bakım hastasında sepsis ve organ

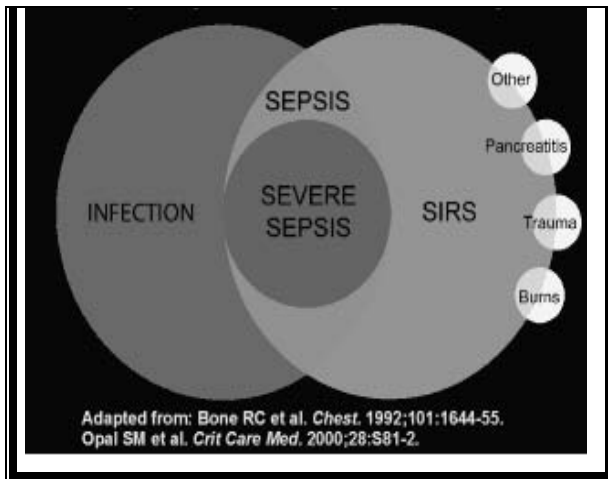
disfonksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir (6). Sepsiste renal dokularda TLR-9 ekspresyonunun geliştiği ve TLR-9'un polimikrobiyal septik akut renal hasar (ARH) patofizyolojisinde kritik bir öneme sahip olduğu belirtilmiştir (7).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda TLR-9 (-1486 T>C) ve TLR-9 (C>T) gen polimorfizmlerinin ve TLR-9 serum düzeyinin incelenerek, hem bu polimorfizmlerinin TLR-9 düzeylerine olan etkisi hem de serum TLR-9 düzeyinin sepsiste klinik ve prognostik parametrelerle birlikte ele alınarak olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Sepsis, enfeksiyona karşı konakta oluşan sistemik enflamatuvar yanıt olarak tanımlanır (8,9). Sepsis; ilerleyen sistemik enflamatuvar yanıt ile ağır sepsis ve septik şoka neden olabilen, bir yada birden çok organda fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden semptomlara yol açan, sık karşılaşılmamasına ve yüksek mortalitesine rağmen tanısı ve tedavisi oldukça zor olan bir sendromdur (10). Sepsiste temel patofizyolojik bozukluk, başlangıçtaki hasar bölgesinden uzak organlarda da gelişen ve kontrol altına alınamayan yaygın enflamatuvar yanıttır. Bu yanıt *sistemik enflamatuvar yanıt sendromudur (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS)* (11,12).

Ağır sepsis, septik şok ve organ fonksiyonlarındaki bozukluklar sepsiste rol oynayan bu temel patolojinin ilerlemesi sonucu gelişirler ve ilerleyen sepsisin evrelerini oluştururlar (13). Yaygın enflamatuvar yanıt organ fonksiyon bozukluğu veya yetmezliğine yol açarak hastanın *çoklu organ fonksiyon bozukluğu sendromu (Multi-organ dysfunction syndrome: MODS)* adı verilen bir sendrom ile kaybedilmesine kadar ilerleyebilir. MODS, ağır sepsis ve septik şokun ileri dönemlerinde karşılaşılan, organ sistem fonksiyon yetmezliklerinin görüldüğü, homeostazisin sürdürülmesi için destek ve diğer tedavilere gereksinim olan mortalitesi oldukça yüksek bir klinik tablodur (14,15).



Şekil 2-1 : SIRS, Sepsis ve Ağır Sepsis İlişkisi (8)

Konağa hasar veren tetikleyici bir olaya bağlı olarak aktifleşen anormal, akut sistemik enflamatuvar yanıt olarak tanımlanan SIRS, enfeksiyon ya da enfeksiyon dışı sebeplerle ortaya çıkabilir (8,9). Büyük cerrahi girişimler, hemorajik şok, pankreatit, yanık

veya iskemi ve reperfüzyon hasarı gibi durumlar ile tümör nekroz faktör (TNF) veya sitokinler gibi enflamatuvar mediyatörlerin dışarıdan verilmesi herhangi bir enfeksiyon veya etkeni ortada yokken de SIRS tablosunu oluşturabilir (Şekil 2-1) (16).

Sepsis, enfeksiyonun sistemik belirtileri ile birlikte muhtemel ya da belgelenmiş bir enfeksiyon varlığıdır (11). Lökositoz ya da lökopeni, ateş ya da hipotermi, açıklanamayan taşikardi ya da taşipne, mental durum değişiklikleri, renal ya da hepatik fonksiyonlardaki açıklanamayan değişiklikler, trombositopeni ya da yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC) varlığı, artmış oksijen tüketimi, açıklanamayan laktik asidoz, periferik vazodilatasyon bulguları, düşük sistemik vasküler direnç ya da artmış kalp debisinde sepsis düşünülmelidir (9). Hasta kliniğindeki açıklanamayan değişikliklerde sepsisi düşünmek ve araştırmak en doğru ve akılcı yaklaşımdır. Prokalsitoninde, sitokinlerde ya da C reaktif protein (CRP) seviyelerinde ki anlamlı yükselme de sepsisle ilişkili olabilmektedir (17,18). Klinik tablo sepsisten septik şoka ve çoklu organ yetmezliği tablosuna doğru ilerledikçe mortalite de belirgin olarak artar (12). Her sepsis olgusunda hemokültürde üreme olması gerekmediği gibi hemokültürde üreme olması ile tablonun ağırlığı arasında bir ilişki olmadığı da bilinmelidir (19).

2.1. SEPSİS EPİDEMİYOLOJİSİ

Ağır sepsis ve septik şok dünya genelinde her yıl milyonlarca insanı etkileyen, insidansı giderek artan ve her dört hastadan birinin ölümüne yol açan önemli sağlık problemleridir (9,12). Günümüzde sepsis ve septik şok yoğun bakım ünitelerindeki hastaların %35-40'ında saptanan en sık ölüm nedenidir (20). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 500.000 yeni sepsis olgusunun saptandığı, ABD ve İngiltere'de ağır sepsis ve septik şok sıklığının 66-132:100.000 olduğu bildirilmektedir (15,21).

Ağır sepsis olgularının önümüzdeki yıllarda da artması beklenmektedir. Çalışmalar ABD'de artan yaşlı nüfusuna, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalardaki ve bunlara bağlı gelişen enfeksiyonlardaki artışa ve giderek artan invazif cerrahi girişimlerin yapılmasına bağlı olarak sepsis olgularında her yıl % 1,5 artış öngörmektedir (22).

Ülkemizde sepsis olgularının sayısı konusunda yeterli bir bilgi yoktur. Hem çok farklı klinik tablolara yol açması hem de bildirim zorunlu olmaması nedeniyle

saptanabildiğinden daha sık bir enfeksiyon olduğu düşünülmektedir.

Avrupa'da sepsisin hem insidansı hem de mortalitesi belli başlı kanserlerden daha yüksektir (23). Kanserle yüksek mortaliteye sahip olma, yayılım gösterme, tıbbi ve cerrahi tekniklerle tedavi ihtiyacı ve hücrel düzeydeki bozukluk gibi benzerlikleri göz önüne alınarak sepsis bir kanser analogu gibi düşünülmüş ve TNM evreleme sisteminden yola çıkılarak sepsiste **PIRO** (*PIRO: P: Predisposition, I: Infection, R: Response, O: Organ dysfunction*) konsepti ortaya atılmıştır (9). Sepsiste PIRO derecelendirilmesi risk belirlenmesi ve hastalığın seyri açısından faydalı bulunmuştur (24,25). Bu konseptte göre;

P: Predispozisyon: Sepsis prognozunda predispozan faktörlerin rolü önemlidir. Bu faktörler arasında; genetik faktörlerin varlığı, büyük cerrahi girişim ya da travma geçirmiş, invaziv monitörizasyon uygulanmış, malignitesi olan, immunsupresif veya steroid tedavisi alan, çok genç (yenidoğan) veya çok yaşlı hastalar ile gram negatif ya da mantar enfeksiyonları sayılabilir. Sepsis gelişimini kolaylaştıran pek çok faktör vardır (12,21) (Tablo 2-1). Her ne kadar sepsis her yaşta görülebilirse de 50 yaşın üstünde bağışıklık sistemi zayıflamış ve kritik hastalarda daha sıktır (11). Yaşlı hastalar, enfeksiyonlara fizyolojik cevap oluşturabilme rezervleri daha kısıtlı olduğundan sepsise daha yatkın hastalardır. Ayrıca yaşlı hastalarda sepsis sıklıkla atipik ya da nonspesifik bir klinik tablo ile meydana çıkabilir, bu da hastalarda tanı karışıklıkları meydana getirebilir.

Tablo 2-1: Sepsis gelişimini kolaylaştıran faktörler (12, 21)

• Bağışıklık sistemindeki yetmezlikler (İmmunsupresyon, Nötropeni, yenidoğan yada ileri yaş) • Kronik hastalıklar (Diabetes Mellitus, Siroz, Kalp ve Böbrek yetmezliği) • Majör cerrahi yada invaziv işlem • Yabancı cisim varlığı (İdrar kateteri, damar içi kateter) • Tıkalıcı bir oluşum (Renal taş, safra kesesi taşı, ileus) • Steroid tedavisi • Yanık, travma, alkol ve madde bağımlılığı • Kemoterapi • Antibiyotik kullanımı
--

Sepsise en sık neden olan enfeksiyöz sebepler; ürosepsise neden olan üriner sistem enfeksiyonları, solunum sistemi enfeksiyonları, gastrointestinal enfeksiyonlar, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, santral sinir sistemi enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları ile varlığında damar içi kateterlerdir (26).

I (Infection, İnfeksiyon): İnfeksiyonun tipi, yeri, yaygınlığı, tedavinin başlama

hızı, şekli ve tedavide kullanılan antibiyotikler sepsisin prognozunda önemlidir (27).

R (Response, Yanıt): Sepsiste klinik bulgular ve hastalığın prognozu, enfeksiyona konak yanıtının sonucudur. Sepsis tedavisi, enfeksiyon etkeninden çok konak yanıtına yöneliktir. Hastalığın evrelendirilmesinde de bu yanıt sonucu oluşan biomarkerlerin kullanılması önerilmektedir (28).

O (Organ Dysfunction, Organ fonksiyon bozukluğu): Kanserde yapılan TNM sınıflamasına göre uzak organ metastazının varlığı karşılığı sepsiste organ fonksiyon bozukluğu olarak kabul edilmiştir. Sepsiste MODS'a gidiş yüksek mortalite ile birliktedir (29).

Sepsis dünyada halen yoğun bakım ünitelerindeki ölümlerin önemli bir nedeni olmayı sürdürmektedir. Mortalite; altta yatan hastalık, enfeksiyon etkeni, konağın enfeksiyona verdiği yanıt, etkin ve zamanında uygulanmış antimikrobiyal tedavi ve septik şok gelişimine bağlı olarak değişir. Tüm gelişmelere rağmen sepsiste mortalite %30-50 dolaylarında oldukça yüksektir (12).

2.2. SEPSİS ETİYOLOJİSİ

Sepsiste enfeksiyon etkenleri değişsede klinik tablo aynıdır (29,30). Etken patojen mikroorganizma hastanın yaşı, hastanede ya da yoğun bakım ünitesinde yatıyor olup olmaması, altta yatan kronik hastalıklarının durumu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilir (9).

Toplum kökenli sepsislerde genelde en sık rastlanan etkenler; *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*'dur. Hastane kaynaklı sepsislerde ise asıl belirleyici etken hastanenin hatta birimin florasıdır (31). Son yıllarda özellikle damar içi kateterle ilişkili sepsis artış göstermektedir. En sık etkenler arasında koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS), *S.aureus*, *Candida* cinsi mayalar, *P.aeruginosa* ve *Corynebacterium* sayılabilir (32). Splenektomize hastada *Haemophilus influenzae*, pnömokok, batın içi odak varlığında aerop ve anaerop mikst enfeksiyonlar, immun sistemi baskılanmış nütropenik bir hastada *Pseudomonas aeruginosa*, tamamen sağlıklı birinde ve ani başlayan sepsis tablosunda ise öncelikle pnömokok ve meningokok olasılığı düşünülmelidir (33). Antibiyotik tedavisi altındaki bir hastada *Pseudomonas aeruginosa* olasılığını düşünerek hızla etkili antibiyotiği seçmek mortaliteyi azaltabilecek en önemli noktadır (27). Yenidoğanda sepsis; etkenlerle intrauterin dönemde, doğum sırasında veya sonrasında

karşılaşmaya bağlı erken olarak ilk haftada ya da daha geç başlayabilir. Çoğu hastada etken; B grubu streptokoklar ve E.coli gibi bakterilerdir (34). Sitomegalovirus (CMV) sepsisten sorumlu tutulmuş, sepsis olgularında belirgin artışı saptanmış fakat ilişki tam olarak ortaya konamamıştır (35).

2.3. SEPSİSİN PATOFİZYOLOJİSİ

Sepsis patofizyolojisinde; sistemik enflamasyon, koagülasyon ve bozulmuş fibrinoliz yer alır. Moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmelerle, patojen mikroorganizmalar ve doğal immun sistem komponentleri arasındaki etkileşimlerin incelenmesi, sepsis patogenezinde mikrobiyal patojenler ve enflamatuvar yanıtın birlikte yer aldığını göstermektedir (16).

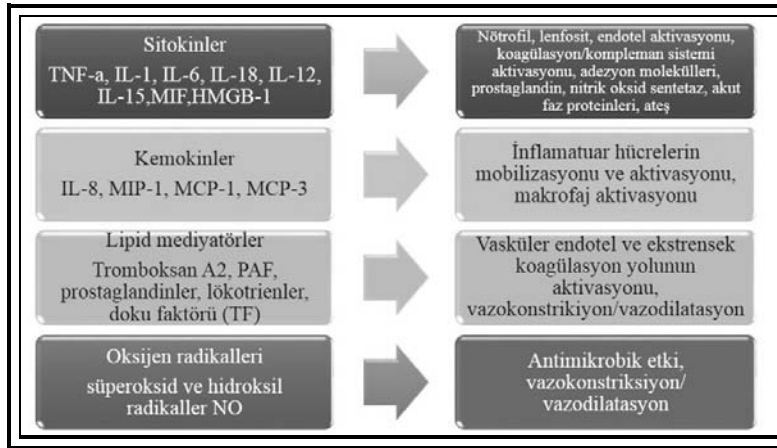
Sepsiste etken mikroorganizmalarda bulunan bazı antijenik yapılar ve toksinler enflamasyonla birlikte konakta karmaşık bir immun yanıt sürecini başlatarak SIRS geliştirirler. Bakterilerin Lipopolisakkarid (LPS) veya metillenmemiş CpG DNA fragmanları gibi ürünleri, mantarların hücre duvarındaki mannan ve galaktomannan gibi yapısal antijenleri, viral veya paraziter antijenler de enflamasyonu ve SIRS'i tetikleyebilir (36).

SIRS fizyopatolojisinde lökosit ve endotelial hücre aktivasyonu, koagülasyon ve kompleman sistem aktivasyonu ile sitokin salınması rol oynamaktadır. Hücre hipoksisi ve apoptoz nedeniyle oluşan organ disfonksiyonları, sepsisteki en önemli ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Şekil 2-2 de sepsis patogenezinde rol alan mediyatörler gösterilmektedir (37).

Mikroorganizmal yapılar hem makrofajları etkileyerek TNF, IL-1, IL-6, IL-12 ve interferon gibi mediyatörlerle proenflamatuvar sitokinlerin hem de nötrofilleri uyarak proteaz ve serbest radikallerin salınmalarına neden olur, kompleman sistemi, prostoglandin/lökotrien metabolizması, koagülasyon kaskadı ve diğer bazı sekonder interlökinler aktive olurlar (38).

Koagülasyon kaskadının tetiklenmesi; aktive protein C, anti-trombin III ve doku plazminojen inhibitörünün göreceli olarak azalmalarıyla trombin aktivasyonu ve koagülasyona yatkınlık gelişmektedir. Endotel hasarı ve endotel hücre disfonksiyonu sonucunda endotel bağımlı vasküler relaksasyon bozulur ve antiadhesiv özellikler kaybolur. Lökosit yüzeyindeki adhezyon moleküllerini aktive eden TNF, nötrofillerin endotel

hücrelerine yapışmasını sağlar. Aktive olan nötrofillerin degranüle olmasıyla açığa çıkan toksik oksijen radikalleri ve proteazlar endotel hücre hasarını artırır. Ayrıca endotoksin ve sitokinlerin etkisiyle salgılanan tromboksan, prostaglandin ve lökotrien gibi araşidonik asit metabolitleri kapiller permeabilitenin artışına ve endotel hasarına yol açar. Lokalize enfeksiyonun tedavisinde yararlı olan sitokinlerin aşırı uyarımı ve fazla sentezi olan ve *Sitokin Fırtınası* da denen bu durum ilerleyen dönemde endotel hücre hasarına, fibrin depolanmasına ve DIC'e yol açar (39).



Şekil 2-2: Sepsis Patogenezinde Rol Alan Mediyatörler (38,39)

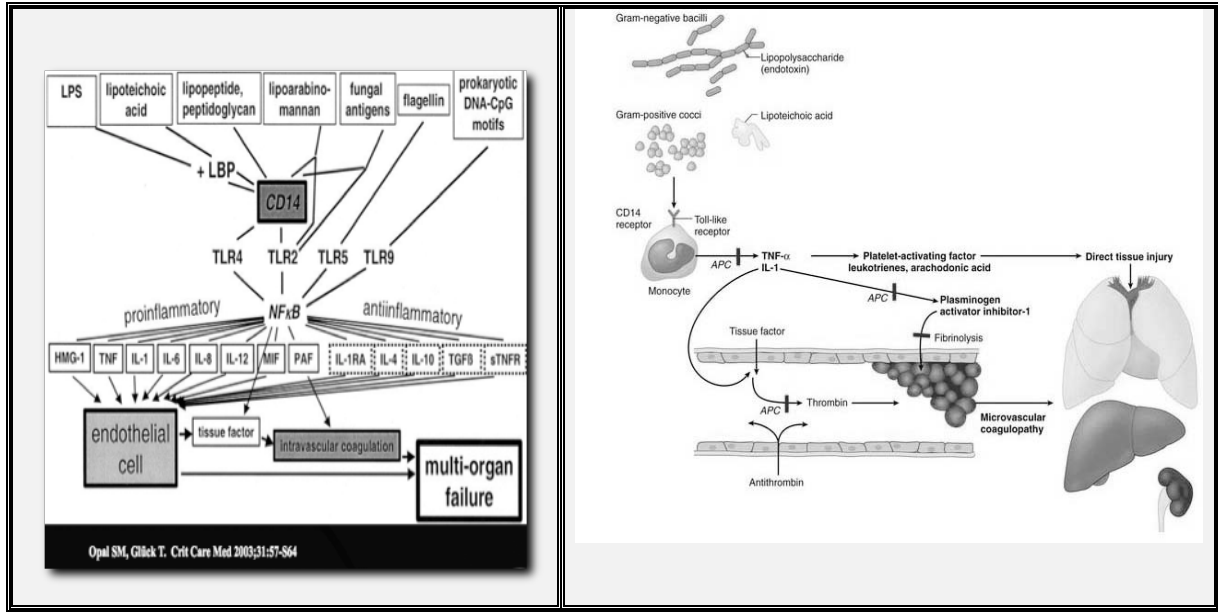
Doku mikrosirkülasyonunda devamlılığının sağlanması yaşamsal öneme sahiptir. Normal şartlarda mikrosirkülasyon arteriyel ve venöz yatakta, prekapiller ve postkapiller sfinkter tonusu ile sağlanır. Hipovolemi varlığında kan basıncı düştüğünde Anjiotensin II, epinefrin ve vazopresin etkisi ile oluşan refleks vazokonstriksiyon prekapiller arteriyoller ve postkapiller venüller vazokonstriksiyonu ile sistemik kan basıncını korur. Sepsisin ilk dönemlerinde intravasküler volümdeki azalmaya (Distribütif veya hipovolemik şok) cevap olarak prekapiller arteriyoller ve postkapiller venül konstruksiyonu ile ortalama arter basıncı sağlanmaya çalışılır (Kompazatuvar faz). Mikrosirküler yatak girişinin daralması kanın geçiş hızını (velosite) ve kapiller hidrostatik basıncını artırarak interstisyumdan damar yatağına sıvı çekilmesini (transcapillary refill) sağlar (40). Ancak sepsiste süren nitrik oksit salınımı, doku oksijen alımındaki bozukluklar, hidrojen iyonu ve laktik asit birikimi, artan (PaCO₂)ve vazoaktif substanslar nedeniyle mikrodolaşımda prekapiller sfinkter gevşerken postkapiller venüller ya yanıtsız kalır yada vazokonstriksiyon olur. Kan kapiller yatağın dışına sızar, endotel hasarı nedeniyle kapiller

geçirgenlik artarak interstisyel ödem, hemokonsantrasyon ve kan viskozitesinde artmaya neden olur (41). Koagülasyon sistemindeki aktivasyon ve fibrinolitik sistem inhibisyonu paralel olarak küçük damarlarda tıkanmaya ve iskemik hasarlanmaya sebep olur (42).

Sepsisin oluşturduğu bu aşırı enflamatuvar yanıt, antienflamatuvar moleküller ve sitokinler aracılığıyla düzenlenmeye çalışılır (37) (Tablo 2-2). Bu amaçla, IL-10, çözülebilir TNF inhibitör reseptörleri ve IL-1 reseptör antagonistleri gibi moleküller salınır. Lenfosit apoptozu, septik hastalarda bağışıklık sisteminin baskılanmasının başlıca nedenlerinden biridir. Septik hastaların çoğunda gözlenen bu T hücre yanıtının baskılanması durumu ve enerji, ilk başta oluşan proinflamatuvar yanıtı dengelemek için ortaya çıkan *Dengeleyici Antienflamatuvar Yanıt Sendromu (CARS, Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome)* denilen bir karşı yanıttır. Bu durum immunosupresif bir sonuca neden olarak enflamasyonun antienflamatuvar yanıtı, koagülasyonun ise fibrinolyze hakim konuma gelmesine ve ileriki dönemde ortaya çıkan organ disfonksiyonuna neden olabilir (36,43). Sonuçta mikrovasküler tromboz, hipoperfüzyon, iskemi ve doku hasarı ile ağır sepsis, septik şok ve çoklu organ yetmezliği ortaya çıkar (44) (Şekil 2-3).

Tablo 2-2: Sepsiste Proenflamatuvar ve Antienflamatuvar Yanıtlar (37)

Proenflamatuvar Yanıt	Antienflamatuvar Yanıt
Enflamasyonun tetiklenmesi ➤ Lökosit adezyonu ➤ Araşidonik asit metabolit aktivasyonu ➤ Kompleman aktivasyonu ➤ Nötrofil kemotaksisi Koagülasyonun tetiklenmesi ➤ Doku faktörünün artışı ➤ Membran koagülanlarının artışı Antikoagülan inhibisyonu ➤ Trombomodülin azalması ➤ P-antitripsin artışı Fibrinolizis inhibisyonu ➤ Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) artışı	*Enflamasyonun inhibisyonu ➤ TNF inhibisyonu ➤ Akut faz reaktanlarının güçlenmesi ➤ İmmünglobulinlerin artması ➤ T lenfosit fonksiyonlarının baskılanması ➤ Makrofaj fonksiyonlarının baskılanması *Koagülasyonun inhibisyonu ➤ Sitokinlerin koagülasyon aktivasyonunu baskılaması



Şekil 2-3: Sepsisteki Organ Disfonksiyonunun Moleküler Mekanizmaları (44)

2.4. SEPSİSTE TERMİNOLOJİ

Sepsis ve benzeri klinik tablolar için tanımlama ve derecelendirme yapmak zordur ve klinik bulgulardaki ve klinik seyirdeki farklılıklar nedeniyle tanıda gecikmeler sıkça yaşanmaktadır. Sepsisi tanımak, izlemek ve tedavide belli kriterleri oluşturabilmek için ortak bir terminolojinin geliştirilmesi amacıyla sepsis sendromunun çeşitli özelliklerinin tanımları ve dereceleri 1991 ve 2001’de düzenlenen iki uzlaşma konferansında tartışılmış bu konudaki dil birliği sağlanmış ve günümüzde herkes tarafından kullanılan sepsis tanımları yayınlanarak kullanılmaya başlanmıştır. 1992 yılında Amerikan Göğüs Hastalıkları Derneği (ACCP) ve Yoğun Bakım Derneği (SCCM) septisemi, sepsis sendromu ve refrakter şok tanımlarını sonlandırmış, “*Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS)*”, “*Sepsis*”, “*Ağır Sepsis*” ve “*Septik Şok*” terimleri tanımlanmıştır (8,45).

Tanımlanmış kriterlerin nonspesifik olması, patofizyolojideki yeni gelişmelerle birlikte tanımlamaların yetersiz kalması nedeniyle 2001 yılında Amerikan Toraks Derneği (ATS), Avrupa Yoğun Bakım Derneği (ESICM), ACCP, SCCM ve Cerrahi Enfeksiyon Derneği (SIS)’nin katıldığı Uluslararası Sepsis Tanımları Konferansı düzenlenmiş ve bu konferans sonucunda 1992 yılında yapılan tanımlamalar geçerli kalmakla birlikte, hastalık tanımına bir takım eklemelerde bulunulmuştur (9). Son olarak 2005 ve 2012 yıllarında

yapılan düzenlemelerle, sepsis tanısı ve tedavi prensipleri açısından en son parametreler ortaya konulmuştur (11,12). Tanımlar şu şekildedir:

Enfeksiyon; mikroorganizmaların varlığına karşı ortaya çıkan enflamatuvar yanıt ya da steril konak dokusunda mikroorganizmaların invazyonunu gösteren durumdur. *Bakteriyemi*; kanda canlı bakteri bulunmasıdır. *Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS)*; konağa hasar veren tetikleyici bir olaya bağlı olarak aktifleşen, anormal, sistemik enflamatuvar yanıtıdır (Tablo 2-3). *Sepsis*; enfeksiyonun sistematik belirtileri ile birlikte muhtemel ya da belgelenmiş enfeksiyon varlığıdır (Tablo 2-4). *Ağır Sepsis (Severe Sepsis)*; sepsis ile birlikte sepsis kaynaklı akut organ disfonksiyonu ya da doku hipoperfüzyonunun gelişmiş olduğu durumdur. *Sepsis kaynaklı hipotansiyon (Sepsis induced hypotension)*; hipotansiyonun başka nedeni olmaksızın sistolik kan basıncının (SKB) <90 mmHg ya da ortalama arteriyel basıncın (OAB) <70 mmHg olması veya diğer nedenlerin yokluğunda SKB'nin yaşa göre normal değerden >40 mmHg'lik bir değerde ya da iki standart sapmadan daha az olması şeklinde tanımlanır. *Septik şok (Septic Shock)*; uygun sıvı resüsitasyonuna rağmen devam eden sepsis kaynaklı hipotansiyon durumudur. İnotropik ya da vazoaaktif ilaç verilen hastalar perfüzyon anormallikleri saptandığında hipotansif olmayabilirler fakat yine de septik şok olarak kabul edilmelidirler. *Sepsis kaynaklı doku hipoperfüzyonu*; enfeksiyona bağlı hipotansiyon, yüksek laktat ya da oligüri olarak tanımlanır. *Çoklu organ yetmezliği sendromu (Multi organ dysfunction syndrome)* ise akut olarak hastalananlarda girişim yapılmadan homeostaz sağlanamayacak ölçüde organ işlev bozukluklarını tanımlar.

Tablo 2-3: SIRS'da Tanı Kriterleri (11)

- ❖ Lökositoz (BK >12 000 μL^{-1})
Lökopeni (BK < 4000 μL^{-1})
Normal BK sayısında immatür formların >%10 olması
- ❖ Kalp atım hızı yaş için normal değere göre > 90/dakika
- ❖ Solunum hızı > 20/dakika, PaCO₂ nin 32 mmHg'dan düşük olması, veya mekanik ventilasyon uygulaması
- ❖ Vücut sıcaklığı >38,0°C veya < 36,0 °C

Tablo 2-4 : Sepsiste Tam Kriterleri (12)**Belgelenmiş ya da şüpheli enfeksiyon ve aşağıdakilerden bazıları:****Genel Değişkenler:**

Belgelenmiş ya da şüpheli enfeksiyon ve aşağıdakilerden bazıları:

Ateş ($>38,3^{\circ}\text{C}$)

Hipotermi (Santral sıcaklık $<36^{\circ}\text{C}$)

Kalp atım hızı yaş için normal değere göre $>90/\text{dk}$ ya da yaşa göre normal değerin 2 standart sapma (SS) yukarısı

Takipne

Bilinç durumunda değişiklik

Belirgin ödem ya da pozitif sıvı dengesi (24 saatte $>20\text{mL/kg}$)

Diyabet yokluğunda hiperglisemi (plazma glukozu $>140\text{mg/dL}$ ya da $7,7\text{ mmol/L}$)

İnflamatuvar Değişkenler:

Lökositoz (BK $>12\ 000\mu\text{L}^{-1}$)

Lökopeni (BK $<4000\mu\text{L}^{-1}$)

Normal BK sayısında immatür formların $>\%10$ olması

Plazma C reaktif proteinin normal değerin 2 SS'den fazla olması

Plazma prokalsitoninin normal değerin 2 SS'den fazla olması

Organ Disfonksiyonu Değişkenleri:

Arteriyel hipoksemi ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 <300$)

Akut oligüri (Uygun sıvı resüsitasyonuna rağmen en az 2 saat boyunca idrar çıkışı $<0,5\text{mL/kg/saat}$)

Kreatinin artışı ($>0,5\text{mg/dL}$ ya da $44,2\mu\text{mol/L}$)

Koagülasyon anormallikleri (INR $>1,5$ ya da aPTT >60 saniye)

İleus (Barsak sesleri yok)

Trombositopeni (Trombosit sayısının $<100\ 000\mu\text{L}^{-1}$)

Hiperbilirubinemi (Plazma total bilirübini $>4\text{ mg/dL}$ ya da $70\mu\text{mol/L}$)

Doku perfüzyon değişkenleri :

Hiperlaktatemi ($>1\text{ mmol/L}$)

Azalmış kapiller yeniden dolum ya da deride beneklenme

BK: Beyaz küre, SKB: Sistolik kan basıncı, OAB: ortalama arter basıncı, INR:uluslararası normal oran, aPTT: aktive parsiyel tromboplastin zamanı

2.5. SEPSİSE KLİNİK YAKLAŞIM

Sepsiste; sepsise neden olan farklı etken mikroorganizmaya ve organ tutulumlarına bağlı olarak değişik klinik bulgular saptanabilir. Santral sinir sisteminde; kan beyin bariyeri, nörotransmitter ve reseptör fonksiyonları için gerekli enerji sunumunda oluşan değişikliklere bağlı olarak baş ağrısı, ense sertliği, uykuya eğilimden komaya kadar farklı şuur değişiklikleri ve fotofobi görülebilir.

Septik hastada kardiyovasküler sistemde; yetersiz sıvı alımı, yetersiz sıvı replasmanı veya insensibil kayıplardaki artış, mikrovasküler permeabilitedeki artış ya da hipoalbuminemi gibi sebeblere bağlı hipovolemi görülebilir (46). Direkt miyokard depresyonuna bağlı kardiyak kontraktilitede bozulma, taşikardi, adrenerjik reseptör down-regülasyonuna bağlı sistemik vasküler rezistansta (SVR) düşme, vazopresörlere yanıtın bozulması, kalp debisinde artma, dispne, ortopne, venöz basınçta artış saptanabilir (47).

Solunum sisteminde enfeksiyona bağlı artmış kapiller permeabilite ve perialveoller sıvı ve nötrofillerin artışı, koagülasyon defektlerinin neden olduğu pulmoner mikroembolilere bağlı olarak hipoksemi ve siyanoz, taşipne, yardımcı solunum kaslarının kullanılması ve balgam özelliğindeki değişiklikler gibi klinik belirtiler gelişebilir (48). Gastrointestinal belirtiler arasında kusma, diyare, karın ağrısı, karaciğer yetersizliği, kolestaz, genitoüriner sistemde sık diürez, dizüri, hematüri, yan ağrısı, renal yetersizlik görülebilir.

Sepsis acil bir klinik tablodur ve ancak hızlı, uygun ve yoğun tedavi ile mortalite azaltılabilir. Muayene SIRS'in şiddetine, hidrasyona, şok veya çoklu organ disfonksiyonunun varlığına ve hemodinamik resüsitasyonun yeterliliğine odaklanmalıdır (9). Sepsis düşünüldüğünde hasta öncelikle klinik parametrelerle değerlendirilmeli yeterli sıvı replasmanı ve oksijenizasyon sağlanarak stabil duruma getirilmeli, idrar çıkışı, mental durum, vital bulgular kaydedilmeli ve izlenmeye başlanmalıdır.

Periferik yayma, lökosit sayımı, tam idrar tetkiki, CRP ve prokalsitonin gibi laboratuvar parametreleri, radyolojik incelemeler ve vücut ısısı sepsis tanısı ve tedavinin takibinde önemlidir. Arteriyel kan gazları, laktat, karaciğer fonksiyonları, üre, kreatinin, fibrin yıkım ürünleri ve fibrinojen gibi parametreler klinik takiple beraber izlenmelidir.

Ayırıcı tanıda enfeksiyon dışı SIRS nedenleri hatırlanmalı, büyük cerrahi, travma, venöz tromboz, hematoma, miyokard yada akciğer enfarktüsü, transplant reddi, pankreatit, eritroderma gibi doku zedelenmeleri ya da tiroid krizi, akut adrenal yetmezlik

gibi metabolik tablolar, lenfoma gibi malignitelerde, tümör lizis sendromunda, subaroknoid kanamada, malign hipertermide veya kan ve kan ürünleri kullanımı, sitokinler, koloni stimüle edici faktörler, opiatlar ve nöroleptik sendrom tedavisinde kullanılan ajanlara karşı gelişen yanıtların sepsisle karışabileceği unutulmamalı fakat aksi kanıtlanmadıkça bu olgular sepsis olarak değerlendirilmelidir.

2.6. SEPSİSTE TEDAVİ

Sepsise yaklaşım multidisipliner olmalı, resüsitasyon acilde başlamalı, özellikle ciddi hipotansiyon sıvı resüsitasyonu ve semptomimetik ajanlarla tedavi edilemiyorsa ve /veya hastanın oksijenasyonu bozulmuş ise ($\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$) mutlaka yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yoğun bir tedavi ve takip protokolü ile izlenmelidir (12,49). Anestezistin merkezi konumda yer aldığı cerrah, enfeksiyon hastalıkları uzmanı ve radyoloğun yer aldığı multidisipliner ekip, hasta ve ailesi ile hızlı ve etkin tedavinin planlanması önemlidir.

Septik hastaların yönetimini standardize etmek üzere hastaya sıralı yaklaşım ve tedavi önerileri sunan "Surviving Sepsis Campaign (SSC)" sepsiste sürviyi arttırmak amacıyla 2004 yılında yayınlanan ilk SSC kılavuzu 2008 ve 2012 de güncellenmiştir. (12,14). Uluslararası Ağır Sepsis ve Septik Şokun Yönetimi Kılavuzu 2012; Sepsiste Sağkalım Kampanyasının ağır sepsis ve septik şok yönetimi için klinik uygulama kılavuzudur. Bu kılavuzda kanıtların kalitesi yüksekten (A) düşüğe (D) doğru yönlendirilmiş ve önerilerin gücünün güçlü (1) ya da zayıf (2) olarak belirlenmesi amacıyla "Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation (GRADE)" (Önerilerin Değerlendirmesini Dereceleme, Geliştirme ve Değerlendirme) kullanılmış, bazı öneriler de derecelenmemiştir (UG). Tablo 2-6'da kılavuzdaki başlangıç resüsitasyonu ve enfeksiyon konularına ait ve Tablo 2-7'de pediatrik hastalara özel öneriler belirtilmektedir (12). Kılavuzda öneriler üç gruba ayrılmıştır:

- 1) Doğrudan ağır sepsisi hedef alanlar
- 2) Kritik hastaların genel bakımını hedefleyenler ve ağır sepsiste yüksek önceliği olduğu düşünülenler
- 3) Pediatrik hususlar

Sepsis tedavisi başlıca dört başlık altında incelenebilir:

1. Hızla tanınımın konması ve hastanın stabil duruma getirilmesi
2. Hızla kandaki mikroorganizmaların temizlenmesi (Antibiyotik tedavisi)
3. Enfeksiyon odağının ortadan kaldırılması
4. Destek tedavisi

Tablo 2-5: Sepsiste Sağ Kalım Kampanyası Bakım Demetleri (12)

➤ <u>3 Saat İçinde Tamamlanması Gerekenler:</u> * Laktat seviyesini ölçün * Antibiyotiklerin uygulanmasından önce kan kültürlerini alın * Geniş spektrum antibiyotiklere başlayın * Hipotansiyon veya laktat ≥ 4 mmol/L olduğunda 30 mL/kg kristaloid uygulayın ➤ <u>6 Saat İçinde Tamamlanması Gerekenler :</u> * Ortalama arteriyel basıncı (OAB) ≥ 65 mmHg'de tutmak için (başlangıç sıvı resüsitasyonuna yanıt vermeyen hipotansiyonda) vazopresör uygulayın * Volüm resüsitasyonuna rağmen devam eden arteriyel hipotansiyon varlığında (septik şok) veya başlangıç laktat ≥ 4 mmol/L (36 mg/dL) olduğunda: - Santral venöz basıncı ölçün (SVB)# - Santral venöz oksijen satürasyonunu ölçün (ScvO2)# 7) Başlangıç laktat düzeyi yüksek ise tekrar laktat ölçün #

Kılavuzlarda yer alan kantitatif resüsitasyonda hedefler SVB ≥ 8 mmHg, ScvO2 $\geq 70\%$ ve laktatın normal düzeye gelmesidir.

Tablo 2-6: Öneriler: Başlangıç Resüsitasyonu ve Enfeksiyon Konuları (12)

A. Başlangıç Resüsitasyonu 1. Sepsise bağlı doku hipoperfüzyonu olan hastaların protokole bağlı, kantitatif resüsitasyonu. Resüsitasyonun ilk 6 saatindeki amaçlar: a) Santral venöz basınç 8-12 mm Hg b) Ortalama arteriyel basınç (OAB) $\geq$ 65 mm Hg c) İdrar çıkışı $\geq$ 0,5 mL/kg/saat d) Santral venöz (superior vena kava) veya miks venöz oksijen satürasyonu, sırasıyla %70 veya %65 (1C). 2. Yüksek laktat seviyeleri olan hastalarda laktatı normale getirecek resüsitasyonu hedefleme (2C). B. Sepsiste Tarama ve Performans Geliştirme : 1. Ağır sepsiste tedavide daha erken düzelme sağlamak için potansiyel olarak enfekte ağır hastaların rutin incelenmesi (grade 1C). 2. Ağır sepsiste hastane bazı performans iyileştirme çabaları (UG). C. Tanı 1. Antimikrobiallerin başlanmasında anlamlı gecikme (> 45 dk) yoksa, antimikrobiyal tedavi öncesinde kültürler (1C) 2. Enfeksiyon nedeninin ayırıcı tanısında varsa ve invazif kandidiazis ise, 1,3 beta-D-glukan analizi (2B), mannan ve anti-mannan antikor analizi (2C) kullanılması. 3. Potansiyel enfeksiyon kaynağını doğrulamak için görüntüleme çalışmaları (UG). D. Antimikrobiyal Tedavi 1. Septik şokun (1B) ve şok olmayan ağır sepsisin (1C) ilk saati içinde etkin IV antimikrobiallerin uygulanması. 2.a. Olası tüm patojenlere (bakteriyel ve/veya fungal veya viral) karşı etkin ve sepsis kaynağı dokulara uygun konsantrasyonlarda penetre olan, bir veya daha fazla ilaçla başlangıç ampirik antienfektif tedavi başlanmalıdır (1B). 2.b. Potansiyel deeskalasyon için antimikrobiyal rejim günlük değerlendirilmelidir (1B). 3. Başlangıçta septik görünen fakat sonrasında enfeksiyon kanıtı olmayan hastalarda, ampirik antibiyotiklerin kesilmesinde, klinisyene yardım için düşük prokalsitonin seviyeleri veya benzer belirteçler kullanılmalıdır (2C). 4.a. Ağır sepsisli nötropenik hastalarda (2B) ve Acinetobacter ve Pseudomonas spp gibi tedavisi zor, çoklu ilaç dirençli bakteriyel patojenlerin olduğu hastalarda (2B), ampirik tedavi kombinasyonu. Solunum yetmezliği ve septik şokla birlikte olan ağır enfeksiyonlu hastalarda, geniş spektrum beta laktam ve aminoglikozid veya florokinolon ile kombinasyon tedavisi P. Aeruginosa bakteriyemisi içindir (2B). Bakteriyemik Streptococcus pneumoniae enfeksiyonlarına bağlı septik şok tanılı hastalarda beta laktam ve makrolid kombinasyonu uygulanmalıdır (2B). 4.b. Ampirik kombinasyon tedavisi 3-5 günden fazla uygulanmamalı, duyarlılık profili bilinir bilinmez en uygun tekli antibiyotik tedavisine deeskalasyon yapılmalıdır (2B). 5. Tedavi süresi genellikle 7-10 gündür; yavaş klinik yanıt, drene edilemeyen enfeksiyon odağı, S. aureus bakteriyemisi; bazı fungal veya viral enfeksiyonlar, veya nötropeniyi içeren immunolojik yetm olan hastalarda, daha uzun olabilir (2C). 6. Viral orijinli septik şok veya ağır sepsisli hastalarda mümkün olan en erken sürede antiviral tedaviye başlanmalıdır (2C). 7. Enfeksiyon kaynaklı olmadığı saptanan ağır inflamatuvar durumları olan hastalarda antimikrobiyal ajanlar kullanılmamalıdır (UG). E. Kaynak Kontrolü: 1. Acil kaynak kontrolü için değerlendirme gerektiren özel anatomik enfeksiyon tanılarının, mümkün olduğunca çabuk araştırılması ve tanı konması ve mümkünse, tanı konduktan sonraki 12 saat içinde kaynak kontrolü için girişimde bulunulmalıdır (1C). 2. Potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak enfekte peripankreatik nekroz saptandığında, canlı ve cansız dokuların uygun sınırı oluşana kadar kesin girişimin ertelenmesi en iyisidir (2B). 3. Ağır septik hastada kaynak kontrolü gerektiğinde, en az fizyolojik travma yaratacak olan girişim uygulanmalıdır (UG). 4. İntravasküler girişim materyali ağır sepsis/septik şokun olası kaynağı ise, diğer vasküler girişim sağlandıktan sonra, hemen çıkarılmalıdır (UG). F. Enfeksiyonun Önlenmesi 1.a. Selektif oral dekontaminasyon ve selektif dijestif dekontaminasyon, ventilatör ilişkili pnömoni insidansını azaltıcı yöntem olarak başlatılmalı ve araştırılmalıdır (2B). 1.b. Oral klorheksidin glukonatın, ağır sepsisli YB hastalarında, ventilatör ilişkili pnömoni riskini azaltmak için orofarengeal dekontaminasyon şekli olarak kullanılması (2B). UG:Grade yok
--

Tablo 2-7: Öneriler: Pediyatriye Özel Noktalar (12)

A. Başlangıç Resüsitasyonu 1. Solunum distressi ve hipoksemi için yüz maskesiyle veya yüksek akımlı nazal kanül ile oksijen veya nazofarengeal CPAP ile tedaviye başlanmalıdır. Dolaşımı desteklemek amacıyla, santral yol mevcut değilse sıvı resüsitasyonu ve inotrop infüzyonu için periferik intravenöz veya intraosseöz yol kullanılabilir. Eğer mekanik ventilasyon uygulaması gerekiyorsa uygun kardiyovasküler resüsitasyon uygulanması entübasyon sırasında gelişebilecek olan kardiyovasküler instabiliteyi engelleyecektir (2C). 2. Septik şokta başlangıç terapötik resüsitasyon hedefleri: kapiller dolum zamanı ≤ 2sn, yaşına uygun kan basıncı, perifer ve santralde eşit olacak şekilde normal nabız sayısı, ılık ekstremiteler, idrar çıkışı >1 mL/kg/saat ve normal mental durumdur. Daha sonra ScvO₂ ≥ 70 ve 3,3-6,0 L/dk/m²'lik kardiyak indeks hedeflenmelidir (2C). 3. Septik şok tedavisinde Amerikan Yoğun Bakım Derneği-Pediyatrik İleri Yaşam Desteği (ACCM-PALS) kılavuzu takip edilmelidir (1C). 4. Refrakter şok varlığında pnömotoraks, perikardiyal tamponad ve endokrin aciller düşünülmeli ve tedavi edilmelidir (1C). B. Antibiyotikler ve Kaynak Kontrolü 1. Ağır sepsis tanısından sonraki ilk 1 saatte ampirik antibiyotiklere başlanmalıdır. Mümkünse antibiyotiklere başlanmadan önce kan kültürleri alınmalı, ampirik ilaç seçimi epidemik ve endemik ekolojiye göre yapılmalıdır (1D). 2. Refrakter hipotansiyon olan toksik şok sendromunda klindamisin ve anti toksin tedaviler uygulanmalıdır (grade 2D). 3. Erken ve agresif kaynak kontrolü uygulanmalıdır (1D). 4. Eğer tolere edilirse Clostridium difficile koliti enteral antibiyotikler ile tedavi edilmelidir. Daha ağır tablolarda oral vankomisin tercih edilmelidir (1A). C. Sıvı Resüsitasyonu: İnotropik ve mekanik ventilasyona erişimin kolay olduğu gelişmiş YB'lerde hipovolemik şokun başlangıç resüsitasyonu 5-10 dk içerisinde 20 mL/kg'a kadar izotonik kristaloid veya albümin boluslarıyla başlamalı hepatomegali ve rallerin gelişimine yol açmadan hipotansiyonun geri döndürülmesi, idrar çıkışının artması, kapiller dolum zamanı ve periferik nabızların düzelmesi hedeflenerek titre edilmeli eğer hepatomegali ve raller gelişirse inotropik destek başlanmalıdır (2C). D. İnotropik/Vazopresörler/Vazodilatörler 1. Sıvı resüsitasyonuna yanıt alınamayan çocuklarda santral venöz yol sağlanana kadar periferden inotropik desteğe başlanmalıdır (2C). 2. Kalp debisi düşük, sistemik vasküler direnci yüksek ve kan basıncı normal olan hastalara inotropiklere ek olarak vazodilatör tedavi verilmelidir (2C). E. Ekstrakorporeal Membran Oksijenasyonu (ECMO): Refrakter pediyatrik septik şok ve solunum yetersizliği için ECMO düşünülmelidir (2C). F. Kortikosteroidler: Sıvı tedavisine refrakter, katekolaminlere dirençli şok ve şüphe edilen/kanıtlanmış klasik adrenal yetersizliğinde hidrokortizon tedavisi önerilmektedir (1A). G. Protein C ve Aktive Protein Konsantresi : Artık kullanılmadığından herhangi bir öneri yapılmamıştır. H. Kan Ürünleri ve Plazma Tedavileri 1. Çocuklardaki hemoglobin hedefleri erişkinlerdeki gibidir. Şok resüsitasyonu sırasında 10 g/dL, stabilizasyonu ve iyileşme dönemi sonrasında daha düşük ($>7,0$ g/dL) hedeflenmelidir (1B). 2. Çocuklardaki trombosit transfüzyon hedefleri erişkinlerdeki gibidir (g 2C). 3. Çocuklarda progresif diseminan intravasküler koagülasyon, sekonder trombotik mikroanjiyopati ve trombotik trombositopenik purpurayı içeren sepsise bağlı trombotik purpura bozukluklarında plazma tedavisi uygulanmalıdır (2C). I. Mekanik Ventilasyon : Mekanik ventilasyon sırasında akciğer koruyucu stratejileri uygulanmalıdır (2C) J. Sedasyon/Analjezi/İlaç Toksisitesi 1. Mekanik ventilasyon desteği altındaki sepsis tanılı kritik hastalarda sedasyon, sedasyon hedefi konularak uygulanmalıdır (1D). 2. Ağır sepsis sırasında ilaç metabolizması yavaşladığından ilaç düzeyleri toksisite açısından izlenmelidir (1C). K. Glisemik Kontrol: Hiperglisemi erişkinlerdeki gibi ≤ 180 mg/dL hedeflenerek kontrol edilmelidir. Yenidoğan ve çocuklarda insülin salgılanamaması veya insülin direnci olabileceği için insülin tedavisine glukoz infüzyonu eşlik etmelidir (2C). L. Diüretikler ve Renal Replasman Tedavisi : Şok tablosu düzeldiğinde sıvı yükünü ortadan kaldırmak için diüretik kullanılmalı eğer diüretikler başarısız olursa vücut ağırlığından >10 sıvı yüklenmesini engellemek amaçlı devamlı venovenöz hemofiltrasyon (CVVH) veya aralıklı diyaliz uygulanmalıdır (2C). M. Derin Ven Trombozu (DVT) Profilaksisi : Ağır sepsis tanılı puberte öncesi çocuklarda herhangi bir öneri yapılmamıştır. N. Stres Ülser Profilaksisi : Ağır sepsis tanılı puberte öncesi çocuklarda herhangi bir öneri yapılmamıştır. O. Nutrisyon : Enteral yoldan beslenebilen çocuklara enteral nutrisyon, beslenemeyenlere ise parenteral nutrisyon verilmelidir (2C).

Kategorilere göre temel tavsiye ve öneriler şunları içermektedir:

2.6.1. Hızla Tanının Konması ve Hastanın Stabil Duruma Getirilmesi:

Hemodinamik Resüsitasyon:

Teşhisten sonraki ilk saatlerde sepsik hastanın erken kantitatif resüsitasyonu çok önemlidir. Sepsiste sağ kalın kampanyası bakım demetleri içinde resüsitasyondaki ilk 3 ve 6 saat hedefleri olarak sıralananlar tabloda belirtilmektedir (Tablo 2-5) (12). Sepsiste başlangıç sıvı yüklemesi sonrasında devam eden hipotansiyon veya kan laktat konsantrasyonunun ≥ 4 mmol/L olması *doku hipoperfüzyonu* olarak tanımlanmaktadır (12). Uygun ortalama arteriyel basıncın sürdürülmesi için sıvı resüsitasyonuna minimum 30 mL/kg *kristaloid* solüsyonlar ile başlanması, erken dönemde hastanın sıvı açığını kapatmadan vazopressör başlanmaması önerilmektedir. Sıvı yüklemesi esnasında nabız basıncında veya atım hacmindeki değişimler gibi dinamik ya da arterial basınç veya kalp hızındaki değişiklikler gibi statik değişkenler üzerinden hemodinamik iyileşmeyi ya da doku oksijenasyonunda artış veya serum laktat artışında durmayı görene kadar sıvı uygulamasına devam edilmesi önemli miktarda kristalloid resüsitasyonu gerektiren hastalarda nişasta formülasyonlarından kaçınmak amacıyla albümin ilavesi önerilmekte fakat ağır sepsiste ve sepsik şokta sıvı resüsitasyonunda hidroksietil nişastanın (HES) kullanımı önerilmemektedir (12).

Vazopresör ve inotropik tedavi

Preoperatif resüsitasyonda öncelikli hedef; dokulara yeterli oksijen sunumunu sağlamaktır. Sepsik hastada yeterli kardiyak dolum ve sıvı resüsitasyonuna rağmen kalp debisi düşük seyrediyorsa tedaviye vazopresör eklenmelidir. Vazopresör tedavide ilk önce OAB'nın 65 mmHg'ye çıkartılması hedeflenmelidir. Sepsiste Sağkalım Kampanyası: Uluslararası Ağır Sepsis ve Sepsik Şokun Yönetimi klinik uygulama 2012 Kılavuzunda vazopresör tedavide ilk seçenek olarak *noradrenalin* önerilmektedir. Ek ajana ihtiyaç duyulduğunda ve yeterli kan basıncı sağlanamadığında *adrenalin* noradrenaline ilave edilebilir veya potansiyel olarak noradrenalinin yerine kullanılabilir. *Vazopressin* hedef OAB'na ulaşmak veya noradrenalinin dozunu azaltmak amaçlı 0.03 U/dk'nın üstündeki dozlarda noradrenaline eklenebilir. Düşük doz vazopressin sepsis ilişkili hipotansiyonun tedavisinde tek başına başlangıç vazopresör olarak önerilmez.

Dopamin sepsik hastada çok iyi seçilmiş koşullar dışında önerilmemektedir (12).

Taşiaritmi riski düşük olan ve gerçek veya rölatif bradikardisi olan hasta grubu için dopamin noradrenaline alternatif bir vazopresör ajan olarak kullanılabilir. Düşük doz dopamin renal koruma amaçlı kullanılmamalıdır. Kardiyak indeksi önceden belirlenmiş normalin üstü seviyelerine çıkarma stratejisi kullanılmamalıdır.

Fenilefrin vazopresör olarak septik şokun tedavisinde; noradrenaline bağlı ciddi aritmi gelişimi, kalp debisinin yüksek olduğunun bilinmesi ve kan basıncının persistan düşüklüğü veya kombine inotrop/vazopresör ilaçlar ve vazopressin'e rağmen hedef OAB'na ulaşılamaması gibi durumların dışında önerilmez:

Dobutamin infüzyonu 20 µg/kg/dk'nın üzerinde uygulanmalı veya artmış kardiyak dolum basıncı ve düşük kalp debisi ile seyreden miyokardiyal disfonksiyon ya da yeterli intravasküler volüme ve yeterli OAB'a ulaşılmış olmasına rağmen hipoperfüzyon bulgularının devam etmesi durumunda vazopresörlere eklenmelidir. Hipoperfüzyon ilişkili laktik asidemisi olan, ≥ 7.15 pH'lı hastalarda hemodinamik iyileşme veya vazopresör ihtiyacını azaltma maksatlı sodyum bikarbonat tedavisi kullanılmamalıdır.

Kan ve Kan Ürünü Uygulaması

Dokuya oksijen sunumu yetersiz olduğunda *eritrosit transfüzyonu* yapılmasını destekleyen kanıt yoktur. Pek çok çalışma doku hipoperfüzyonu, iskemik koroner arter hastalığı ya da akut kanama yokluğunda hemoglobin hedefinin 7-9 g/dL olması gerektiği yönündendir (50). Doku hipoperfüzyonu ortadan kalktığında; miyokardiyal iskemi, ciddi hipoksemi, akut kanama veya iskemik koroner arter hastalığı gibi nedenlerin olmadığı erişkin hastalarda hemoglobin konsantrasyonu ancak < 7.0 g/dL'e düştüğünde hedef hemoglobin konsantrasyonu olan 7.0-9.0 g/dL'e ulaşmak için eritrosit transfüzyonunu önerilmektedir (12). Ağır sepsis ilişkili anemide *eritropoietin* spesifik tedavi olarak kullanılmamalıdır. *Taze donmuş plazma* kanaması olmayan veya invaziv bir girişim planlanmayan hastalarda pıhtılaşmayla ilgili anormal laboratuvar değerlerini düzeltmek için kullanılmamalıdır. *Antitrombin* ağır sepsis ve septik şokta tedavisinde uygulanmamalıdır. Ağır sepsisli hastalarda profilaktik olarak trombosit süspansiyonu; belirgin bir kanama olmasa dahi *platelet* seviyesi $\leq 10\ 000\ \text{mm}^3$ olduğunda veya önemli oranda kanama riski varken *platelet* seviyesi $\leq 20\ 000\ \text{mm}^3$ olduğunda verilmelidir. Aktif kanama varlığında ya da hastaya cerrahi veya invaziv bir işlem uygulanacak ise daha yüksek *platelet* seviyesi ($\geq 50\ 000\ \text{mm}^3$) sağlanmalıdır.

2.6.2. Antibiyotik Tedavisi:

Tedavi amacı, septik şokun veya ağır sepsisin ilk saati içinde etkin IV geniş spektrumlu antimikrobiyallerin uygulanmasıdır. Bakteriyel, fungal veya viral, olası tüm patojenlere karşı etkinliğe sahip ve sepsis kaynağı farz edilen dokulara uygun konsantrasyonlarda penetre olan, bir veya daha fazla ilaçla başlangıç ampirik tedavi başlanmalıdır. Mutlaka parenteral, en uygun dozda ve bakterisidal antibiyotikler seçilmeli ve antibiyotik tedavisine başlanmasını >45dk geciktirmeyecek şekilde tedaviye başlamadan kültürantibiyoqram için uygun örnekler (12). Kan kültürlerinin aerob ve anaerob ve en az birinin perkütan, diğerinin de kateterden olmak üzere 2 set alınması, invaziv kandidiazis şüphesinde beta d-glukan ve anti-mannan antikor ölçümlerinin de yapılması önerilmektedir. Potansiyel deeskalasyon için antimikrobiyal rejim günlük olarak değerlendirilmeli, kültür sonuçlarına göre antibiyoterapi yeniden düzenlenmelidir. Başlangıçta septik görünen fakat sonrasında enfeksiyon kanıtı olmayan hastalarda, ampirik antibiyotiklerin kesilmesinde, klinisyene yardım için düşük prokalsitonin seviyeleri veya benzer belirteçler kullanılmalı, ampirik kombinasyon tedavisi 3-5 günden fazla uygulanmamalı, duyarlılık profili bilinir bilinmez en uygun tekli antibiyotik tedavisine deeskalasyon yapılmalıdır (12, 51).

2.6.3. Primer Odağın Tedavisi:

Enfeksiyon odağının saptanması, alternatif tanıların dışlanması, enfeksiyona yönelik cerrahi veya radyolojik girişimlerin yapılması açısından diagnostik görüntüleme önem taşımaktadır. Enfeksiyon kaynağı için bir odak belirlendi ise odak ortadan kaldırılmalıdır. Absenin drenajı veya nekrotik dokuların debridmanı gibi cerrahi girişimlerin erken etkin antimikrobiyal tedavi ile kombine edilmesi ağır sepsis vakalarının tedavisinde temel rolü oynar. Vücuttaki yabancı cisimler odak olarak düşünülüyorsa mutlaka çıkarılmalıdır (12). Drenaj ve debridman gibi steril dokuların kontaminasyonuna neden olan anatomik problemlerin giderilmesine yönelik girişimler deneyimli bir cerrah tarafından acilen, en az fizyolojik hasar ile eğer mümkünse perkütan yöntemler tercih edilerek uygulanmalıdır.

2.6.4. Destek Tedaviler:

Sepsiste Solunum yetmezliği ve Sepsis İlişkili Akut Respiratuvar Distres Sendromunda (ARDS) Mekanik Ventilasyon Yönetimi: Sepsiste solunum yükü ve akciğer yetmezliği nedeniyle oksijen ihtiyacı artar. Solunum sıkıntısı olmayan sepsis hastalarında bile mutlaka oksijen desteği sağlamak gerekir. Hastalarda bilinç bozuluyorsa, solunum sıkıntısı, solunum hızı $> 40/\text{dk}$ ise ve oksijen desteğine rağmen hipoksemi sürüyorsa hemen entübasyon ve mekanik ventilasyon uygulanmalıdır (12). Sepsis ilişkili ARDS'de hedef tidal volüm tahmini vücut ağırlığına göre 6mL/kg olmalıdır. ARDS'li hastalarda üst limit plato basıncı hedefi $\leq 30\text{ cm H}_2\text{O}$ olmalı, düşük PEEP seviyelerinden daha çok yüksek PEEP değerlerine dayalı strateji kullanılmalıdır (52).

Ağır hipoksemisi olan sepsisli hastalarda rekrutment manevraları, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranı $\leq 100\text{ mm Hg}$ olan sepsis ilişkili ARDS'li hastalarda pron pozisyon uygulanmalı, mekanik ventilatör desteği altındaki sepsis hastalarının yatak başları kontrendike olmadıkça, aspirasyon riskini sınırlandırmak ve ventilatör-ilişkili pnömoni gelişimini engellemek için 30-45 derecede olacak şekilde yükseltilmelidir (12). Doku hipoperfüzyonu bulguları olmayan yerleşmiş sepsis ilişkili ARDS'si olan hastalarda liberal sıvı tedavisinden daha çok konservatif sıvı stratejisi tercih edilmelidir. Sepsis-ilişkili ARDS'de bronkospazm gibi spesifik endikasyonların olmaması durumunda tedavide beta 2-agonistler kullanılmamalıdır.

Sepsiste Sedasyon, Analjezi ve Nöromusküler Blokaj: Mekanik olarak ventile edilen sepsisli hastalarda ventilasyondan ayrılma ve sedasyon protokolleri uygulanmalı, devamlı veya aralıklı uygulanacak sedasyon minimize edilmelidir. ARDS bulunmayan septik hastalarda nöromusküler bloke edici ajanlardan (NMBA) sakınılmalı, erken sepsis-ilişkili ARDS hastalarında ve $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 150\text{ mm Hg}$ olan hastalarda NMBA uygulaması 48 saati geçmemelidir.

Ağır sepsisli mekanik ventilasyon ile ventile edilen hastaların mekanik ventilasyondan ayrılabilme kabiliyetlerini değerlendirmek için weaning protokolü olarak düzenli bir şekilde spontan solunum denemeleri uygulanmalı; uyandırılabilir, vazopresör ajan desteği olmayan hemodinamik olarak stabil, yeni bir potansiyel ciddi durumu olmayan, düşük ventilasyon ve ekspiryum sonu basınç ihtiyacı ve yüz maskesi veya nazal kanül ile güvenli bir şekilde sağlanabilecek düşük FIO_2 ihtiyacı olan spontan solunum denemeleri başarılı hastanın ekstübasyonu denenmelidir (12).

Glukoz kontrolü : Ağır sepsisli YB hastalarında kan şekeri yönetiminde protokolize edilmiş yaklaşım; iki ardışık kan şekeri seviyesinin >180 mg/dL olduğunda insülin uygulamasına başlanması şeklindedir. Bu protokolize edilmiş yaklaşım kan şekerinde ≤ 110 mg/dL'den ziyade ≤ 180 mg/dL seviyesini hedeflemektedir (12).

Kortikosteroid kullanımı: Sepsis tedavisinde sadece yeterli sıvı resüsitasyonu ve vazopresör tedavisi ile hemodinamik stabilite sağlanamıyorsa *hidrokortizon* 200 mg/gün dozunda IV önerilmektedir. Ancak hidrokortizon alması gereken septik şoklu erişkin hasta grubunu belirlemede ACTH stimülasyon testi kullanılmamalıdır. Steroid tedavisi alan hastalarda vazopresör ihtiyacı ortadan kalktığında steroid azaltılmalı, düşük doz hidrokortizon verilecek ise hidrokortizonun devamlı infüzyon şeklinde kullanımı önerilmektedir (12).

Renal replasman tedavisi : Ağır sepsisli ve akut renal yetmezlikli hastalarda devamlı replasman tedavisi ile aralıklı hemodiyalizin etkinliği birbirine eşittir. Hemodinamik olarak stabil olmayan septik hastalarda sıvı yönetimini kolaylaştırmak için devamlı tedavi yöntemi kullanılmalıdır (12).

Derin ven trombozu profilaksisi : Ağır sepsisli hastalar venöz tromboemboliye (VTE) karşı günlük subkütan düşük-moleküler ağırlıklı heparin (LMWH) ile farmakoprofilaksi almalıdır. Eğer kreatinin klirensi <30 mL/dk ise dalteparin veya daha düşük renal metabolizma derecesine sahip LMWH'nin bir diğer formu veya UFH kullanılmalıdır (12). Trombositopeni, ciddi koagülopati, aktif kanama, yakın zamanlı intraserebral kanama gibi heparin kullanımı için kontraendikasyonu olan septik hastalarda farmakoprofilaksi verilmemeli ancak kontraendikasyon yoksa dereceli kompresyon veya aralıklı kompresyon cihazları gibi mekanik profilaktik tedaviler verilmelidir. Risk ortadan kalktığında farmakoprofilaksiye yeniden başlanmalıdır.

Stres ülser profilaksisi: Kanama risk faktörlerine sahip ağır sepsis/septik şoktaki hastalarda stres ülser profilaksisi olarak H_2 reseptör blokörlerinden (H_2RA) daha çok proton pompa inhibitörleri tercih edilmelidir (12). Risk faktörü olmayan hastalarda profilaksi verilmemelidir

Nütrisyon: Ağır sepsis ya da septik şok teşhisinden sonraki ilk 48 saatte tolere ettiği sürece, yalnızca IV glukozdan ziyade oral veya gerekli ise enteral nütrisyon uygulanmalıdır. Ağır sepsis/septik şok teşhisinden sonraki ilk 7 günde IV glukoz ve enteral nütrisyon, tek başına total parenteral nütrisyonu (TPN) veya parenteral nütrisyon ile enteral nütrisyonun kombinasyonuna tercih edilmelidir (12). Ağır sepsisli hastalarda spesifik

immünomodülasyon ajanları içeren beslenme türü yerine spesifik immünomodülasyon ajanları içermeyen beslenme türü kullanılmalıdır.

Hasta Bakım Hedeflerini Oluşturma : Hasta bakım hedefleri ve prognoz hakkında YB'a yatıştan sonraki ilk 72 saati geçmeyecek şekilde hasta ve hasta yakınları ile görüşülmeli, uygun olduğu yerde palyatif bakım ilkelerini kullanarak hasta bakım hedefleri, tedavinin ve yaşam-sonu bakım planının içine dahil edilmelidir.

2.6.5. Pedyatrik Hastada Ağır Sepsise Yaklaşım:

Gelişmiş ülkelerdeki modern YB'larda çocuklarda sepsis temel ölüm nedenlerinden birisi olmakla birlikte ağır sepsise bağlı mortalite erişkinlerle karşılaştırıldığında çok daha düşüktür (yaklaşık %2-10). Sepsis, ağır sepsis, septik şok ve çoklu organ fonksiyon bozukluğu veya yetersizliği sendromlarının tanımları erişkin tanımlarına benzerdir ancak yaşa uygun nabız, solunum hızı ve lökosit eşik değerleri kullanılmalıdır (12).

Pedyatrik Hastada Başlangıç Resüsitasyonu : Düşük fonksiyonel rezidüel kapasite nedeniyle ağır sepsis gelişen küçük infantlar ve yenidoğanlarda erken entübasyon gereksinimi olabilir. Solunum distressi ve hipoksemi gelişen çocuklarda tedaviye yüz maskesi ya da yüksek akımlı nazal kanül ile oksijen veya nazofarengeal CPAP ile tedaviye başlanılmasını önerilmektedir (12).

Septik şokta başlangıç terapötik resüsitasyon hedeflerinin; kapiller dolum zamanı ≤ 2 sn, yaşına uygun kan basıncı, perifer ve santralde eşit olacak şekilde normal nabız sayısı, ılık ekstremiteler, idrar çıkışı >1 mL/kg/saat ve normal mental durum olması önerilmektedir. $ScvO_2 \geq 70\%$ ve $3,3-6,0$ L/dk/m²'lik kardiyak indeks daha sonra hedeflenmelidir. Septik şokun tedavisi için Amerikan Yoğun Bakım Derneği- Pedyatrik İleri Yaşam Desteği kılavuzu kullanılabilir. Refrakter şok durumunda pnömotoraks, perikard tamponadı ve hipoadrenalizm ve hipotiroidi gibi endokrin acillerin araştırılması ve tedavi edilmesi önerilmektedir (12). Bazı hastalarda intraabdominal hipertansiyon da akla getirilmelidir.

Pedyatrik Hastada Antibiyotikler ve Kaynak Kontrolü: Erken ve agresif enfeksiyon kaynak kontrolü yapılmalı ve ağır sepsis tanısından sonraki ilk 1 saatte ampirik

antibiyotiklere başlanmalıdır. Mümkünse önce kan kültürleri alınmalı ancak kültür alınması antibiyotik uygulamasını geciktirmemelidir (12). Ampirik ilaç seçimi; H₁N₁, Metisilin dirençli S. aureus, klorokin dirençli malarya, penisilin-dirençli pnömokok enfeksiyonlarının varlığı veya yakın zamanda YB'ye yatış, nötropeni olması gibi epidemik ve endemik ekolojiye göre yapılmalıdır.

Pediyatrik Hastada Sıvı Resüsitasyonu/ İnotropik/ Vazopresörler/ Vazodilatörler: İnotropik ve mekanik ventilasyona erişimin kolay olduğu gelişmiş YB'larda hipovolemik şokun başlangıç resüsitasyonu 5-10 dk içerisinde 20 mL/kg'a kadar izotonik kristaloid veya albümin boluslarıyla başlamalı, hepatomegali ve rallerin gelişimine yol açmadan hipotansiyonun geri döndürülmesi, idrar çıkışının artması, kapiller dolum zamanı ve periferik nabızların düzelmesi hedeflenerek titre edilmelidir. Eğer hepatomegali ve raller gelişirse sıvı resüsitasyonu yerine inotropik destek başlanmalıdır (12).

Sıvı resüsitasyonuna yanıt alınamayan çocuklarda santral venöz yol sağlanana kadar periferden inotropik desteğe başlanmalı, kalp debisi düşük, sistemik vasküler direnci yüksek ve kan basıncı normal olan hastalara inotropiklere ek olarak vazodilatör tedavi verilmelidir. Tip III fosfodiesteraz inhibitörleri (amrinon, milrinon, enoksimon) ve kalsiyum sensitivitesini artıran levosimendan reseptör desensitizasyonunu ortadan kaldırarak yardımcı olabilirler. Septik şok tanılı çocukların yaklaşık %25'inde mutlak adrenal yetmezlik vardır. Adrenal yetmezlik için risk taşıyan hastalar: ağır septik şok ve purpura olan çocuklar, kronik hastalık için daha önce steroid tedavisi alan ve hipofizer veya adrenal bozukluk olan çocuklardır. Sıvı tedavisine refrakter, katekolaminlere dirençli şok ve şüphe edilen/kanıtlanmış klasik adrenal yetersizliğinde hidrokortizon tedavisini önerilmektedir (12).

Pediyatrik Hastada Mekanik Ventilasyon/ECMO/Sedasyon/İlaç Toksisitesi: Mekanik ventilasyon sırasında akciğer koruyucu stratejilerini önerilmektedir (12). ARDS tanılı bazı hastalarda fonksiyonel rezidüel kapasiteyi sağlamak ve oksijenasyonu düzeltmek için yüksek düzeyde PEEP ve 6-8 mL/kg efektif tidal hacim oluşturmak ve yeterli CO₂ atılımı sağlamak için 30-35 cmH₂O üzerinde tepe basınçları gerekebilir. Septik şok veya sepsisle-ilişkili solunum yetersizliği olan yenidoğan ve çocuklarda Ekstrakorporeal Membran Oksijenasyonu (ECMO) uygulanabilir (12).

Mekanik ventilasyon desteği altındaki sepsis tanılı kritik hastalarda sedasyonun, sedasyon hedefi konularak uygulanması önerilmektedir. Propofol üç yaş altındaki çocuklarda fatal metabolik asidoz ile ilişkilendirildiğinden uzun dönem sedasyon amacıyla kullanılmamalı, etomidat ve/veya deksmedetomidin septik şokta hemodiamik stabilite için gerekli olan adrenal aksı ve sempatik sinir sistemini inhibe ettiklerinden kullanılmamalı veya dikkatle kullanılmalıdır. Ağır sepsis sırasında ilaç metabolizması yavaşladığından ilaç düzeylerinin toksisite açısından izlenmesi önerilmektedir (12).

Kan Ürünleri ve Plazma Tedavileri : Yoğun bakımda ağır sepsis gelişen çocuklar için optimal hemoglobin değeri bilinmemekte erişkinlere benzer hemoglobin ve trombosit transfüzyon hedefleri önerilmektedir. Düşük ScvO₂ (<%70) olan şok resüsitasyonu sırasında 10 g/dL hemoglobin düzeyi iken stabil durumdaki şok ve hipoksemi ile iyileşme dönemi sonrasında daha düşük (>7,0 g/dL) hemoglobin düzeyi hedeflenir (12).

Glisemik Kontrol ve Nütrisyon:: Hiperglisemi ile artmış ölüm riski ve uzamış hastane kalış süreleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Riskin yenidoğan ve çocuklarda yüksek olmasının nedenleri; glukoneogenez için glikojen depoları ve kas kitlesinin rölatif azlığı ve bu heterojen popülasyonda bazı çocukların endojen insülin salgılamaması, bazılarında ise yüksek insülin düzeylerine rağmen insülin direnci olmasıdır. Hiperglisemi erişkinlerdeki gibi ≤ 180 mg/dL hedeflenerek kontrol edilmeli fakat yenidoğan ve çocuklarda insülin tedavisine glukoz infüzyonu eşlik etmelidir (12). İnfantlara hipoglisemi gelişme riski nedeniyle 4-6 mg/kg/dk dozunda glukoz alımı veya içerisinde %10 dekstroz içeren izotonik sıvı (yenidoğanda 6-8 mg/kg/dk) ile idamenin sağlanması gerekir. İnsülin tedavisi hipoglisemi riski göz önünde bulundurularak sık glukoz takibi ile yapılmalıdır. Enteral yoldan beslenebilen çocuklara enteral nütrisyon, beslenemeyenlere ise parenteral nütrisyon uygulanabilir.

Diüretikler ve Renal Replasman Tedavisi : Şok tablosu düzeldiğinde sıvı yükünü ortadan kaldırmak için öncelikle diüretik kullanılmalı eğer diüretikler başarısız olursa hastanın vücut ağırlığından >%10 sıvı yüklenmesini engellemek amacıyla devamlı venovenöz hemofiltrasyon (CVVHF) veya aralıklı diyaliz uygulanmalıdır (12).

2.7. SEPSİSTE MOLEKÜLER MEKANİZMALAR VE TOLL-LİKE RESEPTÖRLER

Bağışıklık sistemi, doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık sistemi olmak üzere iki bölümde incelenen bir vücut savunma sistemidir. Bu iki sistem birbiriyle bağlantılı hassas bir denge içinde çalışarak konağı patojenlere karşı korur.

Doğal bağışıklık; nonspesifik bağışıklıktır. Konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma özelliğine sahip bir savunma sistemidir. Doğal bağışıklık patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek savunma sistemini başlatabilmektedir. Doğumdan itibaren bir patojenle karşılaşıldığında doğal bağışıklık makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler (Naturel killer, NK) ve doğal öldürücü T hücreleri (Naturel Killer T, NKT) ile immun yanıt oluşturabilir (39). Ancak doğal bağışıklık kazanılmış spesifik bağışıklığa göre, patojenleri tanıyan reseptörler açısından daha kısıtlı bir spektruma sahiptir.

Kazanılmış bağışıklık ise T (hücreyel) ve B (humoral) hücrelerin aracılığı ile olan bağışıklık sistemidir. Bu bağışıklık spesifiktir ve sadece patojeni hedefler. Doğal bağışıklığa göre antijenle tekrarlayan karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşturma gibi üstünlüklere sahiptir. Kazanılmış immun sistemin, antijen tanıma kapasitesi büyük bir reseptör grubuyla spesifisiteyi sağladığı için doğal immun sisteme göre daha geniştir.

Doğal immun sistemin patojenlerde tanıyarak immun yanıt oluşturduğu evrimsel olarak korunmuş ortak moleküler yapılara “*Patojen ilişkili moleküler kalıplar (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP)*” denir (53). Bakteriyel hücre duvarı gibi yapıları oluşturan PAMP’lar mikrobiyal sağkalım için kritik önem taşımaktadır. Mikroorganizmalardaki bu moleküller mutasyonlarla silinemez ya da değiştirilemezler böylece evrimsel olarak korunmuş sayılırlar. Patojenlerde korunan bu özellikler; bakterilerde hücre yüzeyi, LPS, lipoproteinler, lipopeptidler, ve lipoarabinomannan; bakteriyel kamçıdan flagellin gibi proteinler; virüslerin çift zincirli RNA’sı veya bakteriyel ve viral DNA’nın metillenmemiş CpG adaları ve diğer RNA ve DNA’lardır (54).

Doğal immun sistem hücreleri üzerinde PAMP’leri tanıyan reseptörlere de “*Patojen tanıyan reseptör (Pathogen Recognition Receptor, PRR)*” adı verilmektedir. Bu patojen tanıyan reseptörler; endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Bunlardan sinyal ileten reseptör grubunu da Toll-like reseptörler (**TLR**, Toll-like Receptor) oluşturmaktadır (55). Evrim sırasında gelişen ve tüm hayvan ve bitki sınıflarında

var olan doğal immünitelerdeki TLR'ler mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen ya da hücre stresi gibi tehditlerle ilişkilendirilen PAMP'ları tanıyarak immün sistemi harekete geçirirler. (56).

Günümüzde TLR'lerin, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı savunmasında anahtar rolü oynayan moleküller olduğu düşünülmektedir. Toll-like reseptörler, konak immünesinde, birçok patojene karşı hem doğal immün cevabın oluşmasını hem de kazanılmış immün cevabın aktive olmasını sağlayan çok önemli role sahip transmembran proteinlerdir (4). TLR'lerin bakteriler ve bitkilerde eski zamanlardan beri bağışıklık sisteminin korunmuş bileşenleri oldukları ve enfeksiyon karşısında konak savunmasında gerekli oldukları düşünülmektedir (57).

2.7.1. Toll-like Reseptörlerin Yapısı:

Toll-like reseptörler hem lenfoid hem de nonlenfoid dokuda, makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen, ligandların tanınmasından sorumlu ekstrasellüler bölge, transmembran heliks bölümü ve sinyal yollarının başlangıcı intrasellüler toll-like/interlökin-1 reseptör (Toll/Interleukin Receptor, TIR) bölümünden oluşan transmembran proteinleridir. İnsanlarda TLR sitoplazmik bölgesi, memeli IL-1 reseptörünün sitoplazmik bölgesine benzemesi nedeniyle Toll/IL-1 reseptör bölgesi olarak adlandırılır. TIR domaini protein-protein interaksiyonları için önemlidir ve tipik olarak doğal bağışıklık ile bağlantılıdır (58).

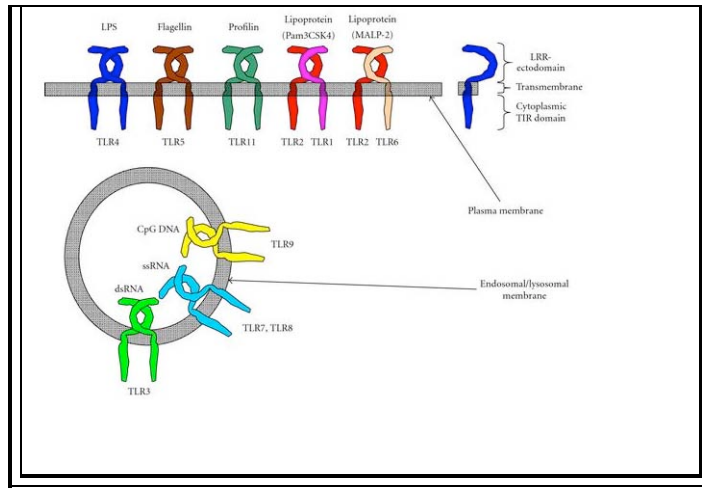
Reseptörlerin ekstrasellüler bölgesinde karakteristik olarak her biri 20-29 aminoasitlik kısa protein modüllerinden oluşan lüsinden zengin tekrar (Leucine-Rich Repeats, LRR) bölgeleri bulunur. Bu ligand bağlanması için önemli olan LRR bölgeleri, PRR'lerin ortak özelliğidir ve sinyalleşme ile ilişkilidir (59). LRR'lerin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (60). *Drosophila* Toll'unun TIR alanı ile benzerlik gösteren IL-1 reseptörü yaklaşık 200 aminoasitten oluşur (61).

TIR alanının 3 alt grubu bulunmaktadır:

- Alt grup TIR 1 bölgelerini içeren proteinler; makrofajlar, monositler, dendritik hücreler tarafından üretilen interlökin reseptörlerdir ve hepsi ekstrasellüler immünglobulin sahaları bulundururlar
- Proteinin alt grup TIR 2 bölgesini içerenleri klasik TLR'lerdir ve mikrobiyal kökenli molekülleri direkt ya da indirekt olarak bağlarlar.
- TIR 3 bölgelerini içeren proteinlerin 3. bir alt grubu; proteinlerin 1 ve 2. alt grupları

arasında sinyallemeye aracılık eden sadece sitosolik adaptör proteinlerden oluşur.

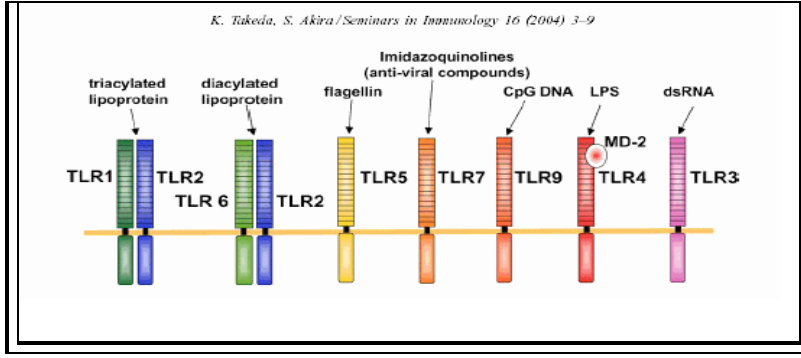
İnsanlarda TLR ailesinin fonksiyonel olarak 12 üyesi (TLR-1/12) ve bu reseptörler için pekçok ligand tanımlanmıştır. TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 ve TLR-10 hücre yüzeyinde lokalizedirler ve patojenlere spesifik molekülleri tanır. TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9 ise sitoplazmada özellikle endozomlarda lokalize olarak bulunurlar (62) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4 : TLR'lerin lokalizasyonları (62)

Doğal immün sistem hücrelerinde bulunan TLR'ler PAMP bölgelerini taşıyan endojen veya eksojen ligandlar tarafından uyarıldığında aktive olarak patojenlere karşı konakçı cevabı ve otoimmün yanıt oluştururlar. İntrasitoplazmik TIR domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur, antimikrobiyal protein ve enflamatuvar sitokinler sentezlenir. Ayrıca dendritik hücrelerin matürasyonu ve antijen sunum kapasitelerindeki artış ile doğal immün sistem, kazanılmış immün sistemi tehlikeye doğru yönlendirir (63).

Toll ailesi proteinlerinin ekstraselüler kısmı 550-980 aminoasitten oluşan oldukça geniş bir yapısı ve birden çok ligand yani bağlayıcı alanı mevcuttur (64). Her bir TLR'nin ligand spesifitesi farklıdır (65) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5 : TLR'lerin ligandları tanınması (65)

2.7.2. Toll-like Reseptör Sinyal Yolu:

Toll-like reseptörler, canlıların ya da yapıların farklı tiplerinde yerleşim gösteren farklı bağlayıcılar tarafından bağlanır ve etkin hale getirilirler. Etkinleştirildiklerinde bir sinyali başlatmak için aracı molekülleri hücrelerin sitoplazmaları içerisinde çağırırlar (65,66) (Şekil 2-6). Sinyallemeyle ilişkili olarak dört aracı molekül bilinmektedir. Bu aracı protein molekülleri;

1. MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88)
2. TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein)
3. TRIF [TIR domain-containing adaptor protein inducing Interferon beta (IFN β)]
4. TRAM (TRIF related adaptor molecule) 'dır.

Bu araçlar hücre içindeki diğer molekülleri, sinyal yükselten;

- a) IRAK 1 (Interleukin 1 receptor (IL-1R) associated kinases 1)
- b) IRAK 4 (IL-1R associated kinases 4)
- c) TBK 1 (TANK-binding kinase 1)
- d) IKK i (I κ B kinase i) gibi belli protein kinazlarla etkinleştiriler.

Sonuç olarak enflamasyon yanıtını planlayan genlerin baskılanmasına ya da tetiklenmesine öncülük ederler.

TLR ilişkili sinyal yollarının uyarılması sonucunda IL-1, IL-6, TNF- α ve diğer proenflamatuvar sitokinlerin üretimi ile birlikte kazanılmış immün sistemin aktive olmasında rol oynayan “eş zamanlı uyarı moleküllerinin” ekspresyonu da gerçekleşmiş olur. Böylece hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemleri birlikte aktive edilmiş olur.

2. MyD88 bağımsız sinyal yolu;

Başlıca TLR-3 ve TLR-4 tarafından kullanılmaktadır. Bu sinyal yolunda TLR-3, TRIF üzerinden TRAF (TNF receptor associated factor)ve IRF 3'ü (Interferon regulatory factor 3) uyararak tip 1 interferon cevabına neden olur. TLR-4 ise TRAM üzerinden TRIF'ı uyararak bu cevaba neden olur (69). Ayrıca TLR-7, TLR-8 ve TLR-9'un TRAF 3 ve IRF 7 üzerinden tip 1 interferon cevabı geliştirdiği gösterilmiştir. MyD88 ve TIRAP proenflamatuvar sitokinlerin (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10), TRIF ve TRAM ise interferonların yapımından sorumludur (70). TLR-5, TLR-11, TLR-4 ve TLR-2/TLR-1 ya da TLR-2/TLR-6 heterodimerleri, hücre yüzeyinde ilgili ligandlarına bağlanırken; TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9 mikrobiyal ya da konak kökenli nükleik asitleri tanıdıkları endozomlarda yer alırlar. TLR-4 hem plazma membranı hem de endozomda konumlanmıştır (56).

TLR sinyalini ilgili ligandların sebep olduğu reseptör uyarımı başlatır. Sonrasında TLR'lerin TIR domenleri, MYD88 ve MAL (MYD88-adaptor-like protein) ya da TRIF ve TRAM proteinleri ile etkileşime girer. TLR-4, MYD88 sinyalini TRIF sinyaline dönüştürmek amacıyla plazma membranından endozoma hareket eder. Sinyal adaptör moleküllerinin etkileşimi, IRAK'lar ve adaptör moleküller TRAF'ların etkileşimini içeren sinyal yolaklarını uyarır ve bu uyarım MAPK (mitogen activated protein kinases), JNK (JUN N-terminal kinase) ve p38 aktivasyonu ile transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesine yol açar (67). TLR sinyali ile aktive olan transkripsiyon faktörleri;

- NF-κB (nuclear factor-κB)
- IRF (interferon-regulatory factors)
- CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein)
- AP1 (activator protein 1)'dir.

Doğal immün yanıtta IL-1 reseptör bağlantılı kinaz yolağı, enflamasyon, hücre sağkalımı ve proliferasyonda öncül rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB'yi aktive eder (71). NF-κB'nin proenflamatuvar özellik gösteren pek çok genin transkripsiyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (72). NF-κB, uyarılmamış hücrelerde sitoplazmada inhibitör κB (IκB) tarafından baskılanmış haldedir. Sitokinler, virüsler veya lipopolisakkaritler gibi NF-κB uyarımı; IκB'lerin yıkılarak ayrılmasına ve NF-κB'nin nükleusa transfer olarak NF-κB motifi taşıyan genlerin transkripsiyonuna neden olur. NF-κB sinyalindeki bozuklukların, inflamasyona neden olan immünsupresyona yol açtığı

gösterilmiştir. Bu nedenle NF-kB aktivasyonunun inhibe edilmesinin sepsiste azalmış inflamatuvar yanıtı neden olabilir.

TLR sinyalinin diğer önemli sonuçlarından biri de proenflamatuvar sitokinlerin ve interferonun (IFN) uyarılmasıdır. TLR'ler, IL-1 beta üretimini artırıp, bakteriyel ve hasarlı hücre ürünlerine cevap oluşturan ve "İnflamazom" olarak denilen NLR (NOD like receptor) içeren multiprotein komplekslerini oluşturarak enflamatuvar yanıtı artırmaktadır (73,74).

Fosfoinositol-3 kinaz (PI-3K), sinyal iletilici bir enzimdir. PI-3K enflamatuvar cevap, kemotaksis ve apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (75). TLR sinyalinin hem negatif regülatör olarak proenflamatuvar ve apoptotik olayları baskılayan bir endojen negatif feed-back mekanizması olarak iş görebilmekte hem de pozitif regülatör olarak proenflamatuvar sitokinlerden IL-1 beta, IL-6 ve IL-8 üretimini sağlamaktadır. (76,77). Ağır sepsis olgularında endojen negatif feed-back mekanizmasının sağkalım avantajı sağlayabileceği düşünülmektedir (78).

2.7.3. Toll-Like Reseptör Ailesi ve Fonksiyonları:

Toll geni ilk defa 1985'te Nobel ödüllü Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Weischaus ve arkadaşları tarafından bir meyve sineği olan *Drosophila melanogaster* embriyosunda, sineklerin dorsal-ventral akslarının gelişimsel embriyogenezinde tanımlanmıştır (79). 1996' da sineğin mantar enfeksiyonlarına karşı verdiği immün cevapta önemli rol oynadığı, antimikrobiyal peptid sentezlenmesini sağladığı ve mutant gene sahip sineklerde fungal enfeksiyonlara karşı yatkınlık olduğu gösterilmiştir (80). Bu genin ürettiği transmembran proteinlerinin homologları daha sonradan memelilerde de tespit edilmiş ve bu proteinler gene benzerlikleri nedeniyle, toll-like reseptörler olarak adlandırılmıştır. 1996 yılında Taguchi ve arkadaşları tarafından TLR'nin insanlardaki kromozomal haritası çıkarılmış ve insan TLR genlerinin, kromozom 4p14 (TLR-1), 4q32 (TLR-2), 4q35 (TLR-3), 9q32-33 (TLR-4), 1q33.3 (TLR-5), 4p16.1 (TLR-6), Xp22.3 (TLR-7), Xp22 (TLR-8) ve 3p21.3 (TLR-9) üzerinde olduğu gösterilmiştir (81). TLR'ler doğal bağışıklık savunma sisteminin ilk basamağında rol oynayan ve patojene ait PAMP'lar konak organizmada deri veya bağırsak mukozası gibi fiziki bariyerleri aştığı zaman bu molekülleri tanıyan bir grup PRR'dir. Patojenin tanınmasında, enflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahiptir.

TLR'ler nonenfeksiyöz doku hasarında salınan endojen ligandları tanıyarak ve enflamasyon yanıtının oluşumunu sağlayarak otoimmün hastalıkların başlamasına veya ilerlemesine de neden olabilirler (82). Farklı hastalıklarda TLR'lerin ekspresyonu ile etkilerini değerlendiren birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda TLR-2 ve TLR-4'ün diabetes mellitus, ateroskleroz, iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı böbrek hastalıklarında, astım hastalığında, TLR-7 ve TLR-9'un otoimmün hastalıklarda, özellikle SLE ve onun immün kompleksle ilişkili glomerulonefritlerinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (56).

Bugüne kadar TLR ailesinde insanlarda 12 adet fonksiyonel üye ve bu reseptörler için pekçok ligand tanımlanmış, reseptörler TLR-1'den TLR-12'ye kadar sıralanarak isimlendirilmişlerdir. İlk tanımlanan TLR-1 olmasına rağmen, bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen ve insanda en çok çalışılan TLR-4 olmuştur. (83-85).

TLR ailesinin ilk üyesi olan TLR-1, *Drosophila* Toll'u ve insan interlökin-1 reseptörlerinde ortak olarak bulunan homolog alanın varlığıyla tespit edilmiştir (86). TLR-2'nin ağırlıklı olarak lipoproteinleri tanıyan reseptör olduğu kabul edilmektedir. TLR-1, TLR-2 ve TLR-6'nın lipoteikoik asit ve peptidoglikan gibi gram (+) bakterilerin hücre duvar elemanlarını tanıdığı ve immün sistemin aktive edildiği gösterilmiştir. (55). TLR-2'nin ligandları tanınması ve sinyal iletimi oluşturabilmesi için diğer TLR'ler ile monomer iki molekülün birleşmesiyle oluşan dimerize yapı haline gelmesi gerekir. Peptidoglikan mikoplazma lipoproteininin tanınması için TLR-2 ve TLR-6'nın birlikte dimer oluşturduğu reseptör aracılığıyla sinyal iletimi gerekli iken, lipoproteinler TLR-6'ya ihtiyaç duymadan TLR-2'yi aktive edebilmektedir. TLR-3 dendritik hücrelerde eksprese olmaktadır. İnfekte hücrelerde viral replikasyon, immün hücreleri stimüle edebilen çift sarmallı RNA (double-stranded RNA, dsRNA)'nın oluşması ve Tip 1 interferon'un indüklenmesiyle sonuçlanır. TLR-3 mutant farelerde viral RNA kopyasına karşı oluşan cevapların azalması TLR-3'ün viral dsRNA'nın tanınmasında rol oynadığını göstermektedir (87).

TLR-4 doğal bağışıklık sisteminin merkezi reseptörüdür. Hem gram (-) bakterilerdeki lipopolisakkaritlerin sinyal reseptörüdür hem de gram (+) bakterilerin lipoteik asitlerini bağlayabilme özelliğine sahiptir (88-90).

TLR-5 bakteriyel flagellanın temel yapısal bir komponenti olan flagellini tanımaktadır (91). TLR-2, TLR-4 ve TLR-6 birçok farklı mikrobiyal ajana cevap verebilirken, TLR-5 ve TLR-9 tek bir yapıyı spesifik olarak tanıyan reseptörlerdir (39). TLR-6, TLR-2 ile heterodimerdir. TLR-6'dan yoksun makrofajlar mikoplazmal lipopeptite

(MALP-2) karşı cevap oluşturmazken, sentetik bakteri lipopeptidine (BLP) karşı normal sitokinin üretimini gösterirler. TLR-2'den yoksun fareler ise MALP-2'ye de BLP'ye de cevap veremezler. TLR-2 ve TLR-6, MALP-2'nin tanınmasında beraber rol oynarken; TLR-6, MALP-2 ve BLP arasındaki küçük yapısal farklılığın tanınmasından da sorumludur (39).

TLR-7 imiquimod ve R-848 (resiquimod, s-28463) gibi kuvvetli antiviral ve antitümör özelliklerine sahip imidazoquinolin ailesinin birkaç tipini tanır. Imiquimod, IFN ve IL-12 gibi sitokinleri uyarma yeteneğine sahiptir. Tropikal imiquimod halen papilloma virüslerine bağlı eksternal genital ve perianal siğillerin tedavisinde uygulanmaktadır. R-848, imiquimod'un kuvvetli analogudur ve hepatit C virüs enfeksiyonunda olduğu gibi herpes virüsler için de tedavide denenmektedir (39). TLR-7 ssRNA'nın tanınmasında görev alırken loksoribin ve broprimin gibi diğer sentetik kimyasalları da tanır (92).

TLR-8 endozomal kompartmanda tek zincirli RNA'yı tanır ve sitokin salınımına sebep olur. TLR-8'in TLR-7 ve TLR-9 ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (87). TLR-8 ve TLR-9 bakteri veya virüs DNA'larının sitozin fosfat guanozin (CpG) tanınmasında görev alırlar (92,93). TLR-9 bakteriyel ve viral, metillenmemiş CpG dinükleotitlerini içeren sentetik oligodeoksinnükleotitlerin tanınması için gereklidir. Bu oligodeoksinnükleotitler B hücre proliferasyonu stimülasyonu ile dendritik hücreler aktivasyonu yapmaktadırlar. (39,61,94).

Akciğer ve B lenfositlerden eksprese edilen TLR-10'un fonksiyonu ve ligandı halen bilinmemektedir. Yapısındaki aminoasit benzerliği nedeniyle TLR-10, TLR-1 ve TLR-6 ile yakından ilişkilidir (87). TLR-11 ve TLR-12 üropatojenik bakteri enfeksiyonlarında rol alırlar (87). TLR-11'den yoksun fareler üropatojenik bakteri enfeksiyonlarına son derece hassastırlar. (95).

2.7.4. Toll-like Reseptörlerin İmmun Yanıt Etkileri:

Enfeksiyon sırasında makrofajlar PAMPs'ı TLR'ler aracılığı ile tanırırlar. TLR sinyal mekanizması ile bağışıklık hücrelerinden enflamasyonu tetikleyen sinyal faktörleri olan proenflamatuvar sitokin ve nitrik oksit gibi sitokinlerin üretimi indüklenir ve makrofaj aktivasyonu ortaya çıkar. Böylece enfeksiyonun erken aşamasında makrofajlar mikroorganizmaların eliminasyonu için aktive olurlar (96).

TLR aktivasyonu, konak hücrelerinin patojenleri fagositozu için de gereklidir. TLR'ler aktive olarak intraselüler kısmı aracılığı ile nükleer faktör-kappa beta (NF- κ B) ve

mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF-kB; TNF, IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proenflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder (97). TLR ilişkili NF-kB'nin aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediyatörler konağın antimikrobiyal savunmasını uyararak enflamatuvar olayları tetikler ve patojenin ortadan kaldırılmasını sağlar. Bakteriyal faktörlerde, patojen fagosite edilir ve sindirilir, antijeni de CD4+T hücrelerine gönderilir. Viral patojen varlığında, interferonlar gibi antiviral faktör salar, enfekte hücrenin protein sentezini durdurur ve hücreyi programlanmış hücre ölümüne yani apoptozise sevkederler (98). Bu süreç konağın doğal immun cevabıdır (99). Eğer bu süreç sonunda enflamatuvar reaksiyon sınırlandırılmazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir (54).

Patojenlerin yok edilmesinde doğal immün sistemin rolü sınırlıdır. Kazanılmış immün sistem aktivasyonu ile daha etkin bir konak yanıtı oluşur. TLR'ler immün ve enflamatuvar genlerin sentezini başlatan mekanizmaları devreye sokarak T ve B lenfositlerden oluşan kazanılmış immün yanıtı da başlatırlar (100). TLR'lerin uyarılması sonucunda, perifer dokular ile lenfoid dokular arasındaki iletişimi sağlayan dendritik hücre aktivasyonu başlar. Dendritik hücreler, olgunlaşır ve periferden lenf nodlarına taşınarak T hücrelere antijen sunarlar. TLR'ler, dendritik hücrelerin T hücrelerini daha etkin bir şekilde uyarmasını sağlayan ko-stimulan moleküllerin de seviyelerini artırır, TNF ve interleukinler gibi hücre ürünlerinin üretimini ve salınmasını düzenlerler (98). TLR ile uyarılan dendritik hücreler, IL-12 ile IL-18 salgılar ve yardımcı T hücrelerinin (TH-1) gelişmesini sağlar. IL-10 ve IL-4 fazla salındığında ise TH-2 immün yanıtı gelişir. B hücreleri uyarılır ve antikor sentezi başlar (101).

2.7.5. TLR-9 ve Sepsis İlişkisi:

Memeli DNA'sında az sayıda CpG dinükleotidi vardır ve bunlar çoğunlukla metillenmiştir. Bu nedenle memeli DNA'sı immün sistem aktivatör etkisine sahip değildir. Bakteri DNA'sı ise metillenmemiş CpG dinükleotidi ile memeli immün hücrelerini aktive edici bir etkiye sahiptir ve TLR-9 ile doğal immün sistem yanıtını başlatır. TLR-9 endoplazmik retikulumda lokalizedir ve CpG uyarısını takiben endozomal veziküllerde toplanarak TLR-9 ve CpG beraber hücreyi aktive eder (5). Ligand bağlayıcı sistem çalışmaları bakteriyel DNA'nın direkt olarak TLR-9'a bağlandığını göstermiştir (102). CpG

bağlanmasını takiben TLR-9 adaptör molekül MyD88 ile ilişkiye girerek IL-1 reseptör ilişkili kinaz ailesini ve mitojen aktive protein kinazları aktive eder. Daha sonraki olaylar diğer transkripsiyon faktörleri arasında NF κ B'yi de aktive eder (103). CpG DNA enflamatuvar yanıtındaki gibi T helper-1'in da güçlü bir uyarıcısıdır (104). Bu etkiler hastada septik şok gelişimini potansiyelize edebilir (105,106).

Farklı TLR genleri ve gen polimorfizmleri ile sepsis arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda değişik sonuçlar saptanmıştır. TLR-2 Arg753Gln polimorfizminin *Staphylococcus aureus*, TLR-1 polimorfizminin gram (+) nedenli sepsise, TLR-4 polimorfizminin gram (-) mikroorganizmanın neden olduğu septik şoka yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir (107-110). TLR-2, TLR-4 ve TLR-5 tek nükleotid polimorfizmlerinin (Single nucleotid polymorphism, SNP) incelendiği bir çalışmada genetik polimorfizm ile sepsisin ne gelişmesi ne de mortalitesi arasında bir ilişki saptanmamış sadece TLR-2-R753Q SNP'nin geniş seri çalışmalarla desteklenmesi gerekmele birlikte yoğun bakımda enfeksiyon gelişimi için yüksek risk taşıyan hastanın tanınmasında faydalı bir gösterge olabileceği belirtilmiştir (111).

TLR-9 mikrobiyal DNA için tanıma kalıbı taşıyan bir TLR'dür. Reseptörün bakteriyel endotoksin ve ekzotoksin tanıma kalıbındaki genetik değişiklikler yoğun bakım hastasında sepsis ve organ disfonksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Literatürde TLR-9 ve sepsis arasında direkt bir ilişkiyi gösteren çalışma yoktur. Fakat TLR-9 gen polimorfizm genotiplerinin incelendiği bir çalışmada rs187084 ve rs352162 polimorfizmleri, TNF-alfa üretimi ve yüksek sepsis morbiditeleri ile ilişkili saptanmıştır. Çalışmacılar TLR-9 rs187084 ve rs352162 polimorfizmlerinin major travma hastalarında sepsis ve çoklu organ yetmezliği risk tahmini ile ilgili olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (6). Liu ve arkadaşları sepsiste renal dokularda TLR-9 ekspresyonunun geliştiğini ve oluşan renal hücre apoptozisi ve akut renal hasarın (ARH) TLR-9 bağımlı olduğunu, TLR-9'un polimikrobiyal septik ARH patofizyolojisinde kritik bir öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir (7).

Yoğun bakımda sepsis başta olmak üzere birçok olayda TLR'lerin öneminin anlaşılması ile bu reseptörler hem sepsis morbidite ve mortalitelerine yatkınlığın yada riskin saptanması amacıyla ilgi gören bir araştırma konusu hem de bir TLR-4 antagonisti olan eritoranın sepsis tedavisinde kullanıldığı randomize, çok merkezli ACCESS çalışmasında olduğu gibi bir tedavi hedefi haline gelmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda TLR-9 (-1486 T>C) ve TLR-9 (C>T) polimorfizmlerinin serum TLR-9 düzeyleri ve sepsis ile olan ilişkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grup, sepsise ilişkin herhangi bir patolojik bulgusu bulunmayan 100 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 80 hastadan oluşmaktadır. Çalışmaya katılan 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 80 sepsis hastası ve 100 sağlıklı kontrolde TLR-9 genine ait polimorfizmlerin analizleri yapılmıştır.

Ayrıca sağlıklı ve hasta bireylerin kuru tüpe alınan kan örneklerinden izole edilen serum örneklerinde TLR-9 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 (invitrogen), primer dizileri (invitrogen).

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), Elisa 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 aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.5. Kullanılan Kitler

INVITROGEN DNA İzolasyon Kiti

CLOUD- CLONE CORP TLR-9 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 lizatu (~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. Inkübe 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 purifiye 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.

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

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

3.6.3. Gen Polimorfizmlerinin Tespiti

TLR-9 rs352140 (C>T) ve TLR-9 rs187084 (-1486 T>C) 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/µl); PZR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 unite olacak şekilde 26 µl lik PZR reaksiyonuna 0,3 µl eklendi. dNTP'ler (100 µmol/ml) (Fermentas R0171) 100 mM'lık dNTP'lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10' ar µl alınıp (toplam 40 µl) 1 µl'lik tüpe kondu ve üzerine 960 µl distile su eklenerek (d2H2O) 1000 µl 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 µl'lik PZR karışımına 1,75 µl 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 µl'lik PZR karışımına 2,5 µl eklendi. HCl'den 100mM (pH 8,8, 25°C'de), 500mM KCl ve %0,8 Nonidet P40 içeren 10X Taq PZR tamponundan 26 µl'lik PZR karışımına 2,5 µl eklendi.

3.6.3.2. PZR Karışımının Hazırlanışı

TLR-9 rs352140 (C>T) bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir.

Primer dizileri:

F-5-GCAGCACCTCAACTTCACC-3

R-5-GGCTGTGGATGTTGTTGTGG -3

TLR-9 (C>T) bölgesindeki amplifikasyonun gerçekleştirilmesi için, toplam reaksiyon hacmi 26 µl olacak şekilde Tablo 3.1'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. Her örnek için iki PZR tüpü hazırlandı.

Tablo 3-1: TLR-9 (C>T) için PZR karışımının hazırlanması

PZR Karışımı	dH ₂ O	MgCl ₂	MgFree (Tampon)	dNTP	Primer	Taq Polimeraz	DNA
Miktar (µl)	17,25	1,75	2,5	1,5	1	0,3	

TLR-9 rs187084 (-1486 T>C) Polimorfizminin gözlemlendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir.

Primer dizileri:

F-5-TCATTCAGCCTTCACTCAGAAA -3

R-5-ACCTCCCACCCCAGATCT-3

TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizimlerinin tespitinin yapılmasında, her bir örnek için yine toplam reaksiyon hacmi 26 µl 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: TLR-9 (-1486 T>C) için PZR karışımının hazırlanması

PZR Karışımı	dH ₂ O	MgCl ₂	MgFree (Tampon)	DNTP	Primer	Taq Polimeraz	DNA
Miktar (μl)	17,25	1,75	2,5	1,5	1	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 μl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 2 μl DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı.

3.6.3.3. TLR-9 (C>T) ve TLR-9 (-1486 T>C) Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

PZR karışımı her bir örnek için hazırlanarak Tablo 3-1’de ki TLR-9 (C>T), Tablo 3-2’de ki TLR-9 (-1486 T>C) 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: TLR-9 (C>T) polimorfizmine ait amplifikasyon şartları

95 °C	5 dakika
94 °C	45 saniye
56,2 °C	45saniye
72°C	45 saniye
72°C	5 dakika

35 döngü

Tablo 3-4: TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmine ait amplifikasyon şartları

95 °C	5 dakika	
94 °C	45 saniye	35 döngü
61,1°C	45 saniye	
72°C	45 saniye	
72°C	5 dakika	

3.6.3.4. TLR-9 ve TLR-9 (-1486 T>C) 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.

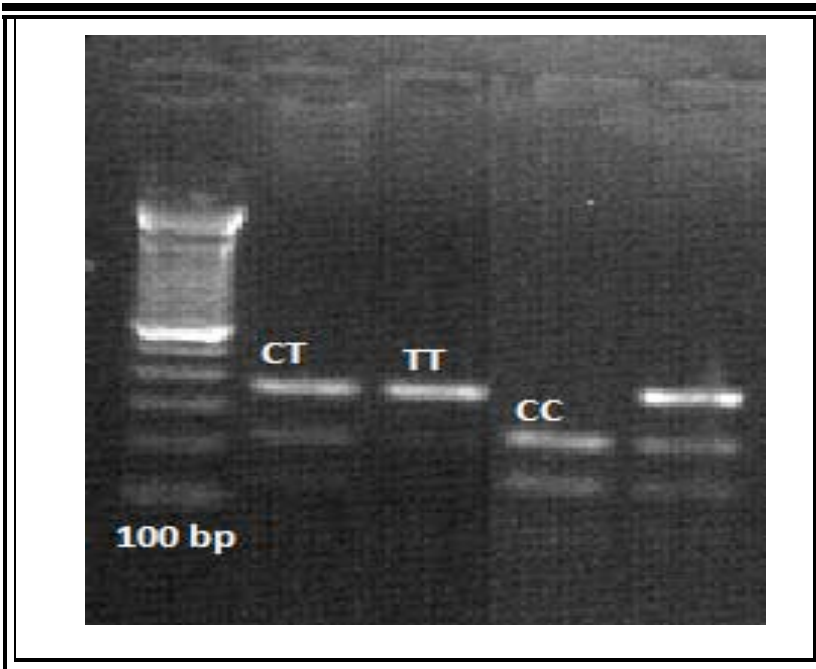
Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi.

3.6.3.5. TLR-9 (C>T) Polimorfizmi Tespiti için Restriksiyon Enzimi Kesimi

Amplifikasyon sonrası 5 mikrolitre PCR ürünü BstU1 Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile 37C'de gece boyu inkübe edilerek polimorfik varyantlar tespit edilecektir. Kesim işlemi gerçekleştirilen ürünler %2'lük agaroz jelde gözlemlenecektir. TT genotipi 390 bp olarak, CC genotipi ise 227, 133 bp olarak saptanacaktır

Tablo 3-5: BstU1 enzimi için kesim protokolü

Malzeme Adı	Miktarı
Apirojenik Su	4,5 µl
Buffer Tango	0,5 µl
BstU1	0,25 µl
PZR ürünü	5 µl

**Şekil 3-1:** TLR-9(C>T) gen polimorfizmine ait % 2'lik agaroz jeldeki görüntü.

Sırasıyla 100bç marker, CT (390, 227, 133bç), TT (390bç), CC (227 ve 133bç), CT (390, 227, 133bç) genotipleri

3.6.3.6. TLR-9 (-1486 T>C) Polimorfizmi Tespiti İçin Restriksiyon Enzimi Kesimi

Amplifiye olan PZR ürünleri AfIII Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile 37 C°'de gece boyu 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.

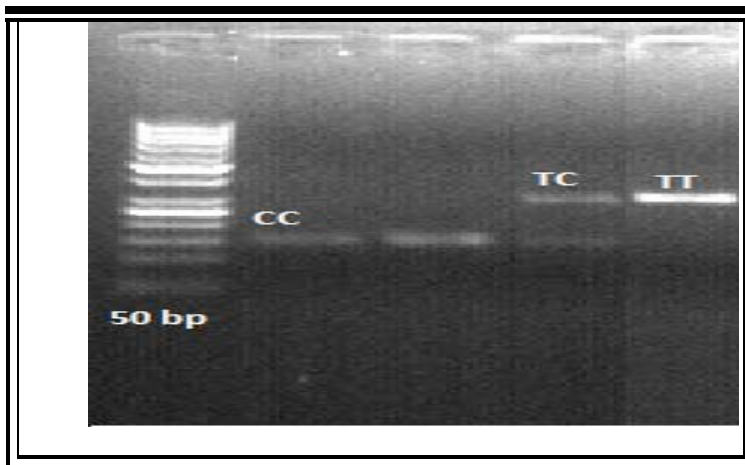
Tablo 3-6: AflIII enzimi için kesim protokolü

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

Kesim işlemi gerçekleştirilen ürünler %3'lük agaroz jelde gözlemlenecektir. Doğal tip varyant TT 299 bp olarak, mutant tip varyant CC ise 155, 144 bp olarak saptanacaktır. Elde edilen kesim ürünlerinin analizi için:

- %2'lik agaroz jel hazırlandı.
- İlgili kesim enzimleri ile kesilen PZR ürünlerinden 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl 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: TLR-9 (-1486 T>C) Polimorfizmi değişiminie ait % 3'lik agaroz jeldeki görüntü. Sırasıyla 50 bç marker, CC (155 ve 144bç), CC (155 ve 144bç), TC(299, 155 ve 144bp) ve TT (299bç) genotipleri

3.6.4. Serum TLR-9 Düzeylerinin Tayini

Serum TLR-9 düzeylerinin tayini için TLR-9 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 1:30 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 eklenerek 37°C'de 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından yıkama yapmadan plate üzerindeki kuyular boşaltılarak her kuyuya 100 µl biotin antikoru eklenmiş ve 37°C'de 1 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 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirilmiştir. 5. yıkamadan sonra kuyular boşaltılarak 90 µl TMB substratı eklenerek karanlık ortamda 15-30 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi beklenmiştir. Reaksiyonun sonlandırılması için 50 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 22 kadın ve 58 erkek olmak üzere 80 birey, kontrol grubu olarak ise herhangi bir enfeksiyon bulgusu taşımayan 19 kadın ve 81 erkek olmak üzere 100 sağlıklı birey dahil edilmiştir.

Çalışma gruplarımıza ait demografik veriler tablo 4-1’de, biyokimyasal veriler ise tablo 4-2’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel incelemede çalışma grupları arasında hastaların yaşı, kilosu ve boyu açısından istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak sepsis grubunda Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı (KOAH) ($p<0,001$, $\chi^2=13,534$, OR=4,95, %95 güven aralığı=2,00-12,29), Kronik böbrek yetmezliği (KBY) ($p=0,002$; %95 güven aralığı=1,03-1,19), Akut Renal Hasar (ARH) ($p<0,001$, %95 güven aralığı=4,67-55,58) ve Devamlı veno-venöz Hemodiyafiltrasyon (CVVHDF) uygulanan hasta ($p<0,001$, %95 güven aralığı= 3,60-32,98) sıklığı da sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır.

Hasta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; lökosit sayısı (WBC) ($p<0,001$; %95 güven aralığı=9,77-15,53), C reaktif protein (CRP) ($p<0,001$; %95 güven aralığı=15,85-18,02), vücut ısısı ($p<0,001$; %95 güven aralığı=0,34-0,73), laktat düzeyi ($p<0,001$; %95 güven aralığı=2,04-3,18), kan glukoz ($p<0,001$; %95 güven aralığı=34,75-63,75), kreatinin ($p<0,001$; %95 güven aralığı=0,77-1,35), Kan üre azotu (BUN) ($p<0,001$; %95 güven aralığı=35,95-46,86), plazma Potasyum düzeyi ($p=0,004$; %95 güven aralığı=0,06-0,43), SGPT ($p<0,001$; %95 güven aralığı=88,96-279,02), SGOT ($p<0,001$; %95 güven aralığı=229,03-592,42), laktat dehidrogenaz (LDH) ($p<0,001$; %95 güven aralığı=184,94-300,71), total bilirubin ($p<0,001$; %95 güven aralığı=1,19-3,79) ve PaO₂ ($p=0,003$; %95 güven aralığı=0,41-21,45) düzeyleri sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır.

Bununla beraber hasta grubunda; arteriyel kan gazı örneklerindeki kan gazı pH düzeyi ($p<0,001$; %95 güven aralığı =0,04-0,08) ve HCO₃ düzeyi ($p<0,001$; %95 güven aralığı=2,05-3,89) ile kan hemoglobin seviyesi ($p<0,001$; %95 güven aralığı=3,17-4,07), trombosit sayısı (PLT) ($p<0,001$; %95 güven aralığı=154,95-887,43), plazma Na⁺ seviyesi ($p<0,001$; %95 güven aralığı=0,34-3,02) ve PaO₂/ FIO₂ oranı ($p<0,001$; %95 güven aralığı=160,23-199,09) ise kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı azalmış olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda sepsis vakalarımızın ortalama arter basınçları (OAB) kontrol grubuna göre istatistik anlamlı olarak düşük ($p<0,001$; % güven aralığı= 16,89-24,83), KH değerleri ise anlamlı yüksek ($p<0,001$; %95 güven aralığı=19,50-30,14) olarak saptanmıştır. Sepsis vakalarımızın mortalite oranı %93,8'dir. Çalışma gruplarına ait demografik parametreler tablo 4-1'de, biyokimyasal parametreler ise tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-1. Çalışma gruplarına ait demografik parametreler

Parametreler	Sepsis Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=100)
Yaş (yıl)	64,70±11,51	63,28±11,32
Kilo (kg)	77,98±11,59	77,39±11,97
Boy (cm)	167,21±10,01	167,59±8,25
Hipertansiyon (%)	72,5	69
NIDDM (%)	15	21
IDDM (%)	13,8	8
KOAH (%)	30*	8
PAH (%)	15	8
KBY (%)	10**	-
ARH (%)	36,2*	3,4
CVVHDF (%)	31,2*	4
Malignite (%)	20	-
Kortikosteroid kullanımı (%)	6,2	-
İnsülin infüzyon (%)	20	2
İnotrop ajan kullanımı (%)	70	-
Vazokonstrüktör ajan kullanımı (%)	75	-
OAB (mmHg)	65,48±14,97*	86,34±12,04
KH (atım/dk)	103,12± 20,39*	78,30± 15,77
CVP (mmHg)	8,62±3,17	8,50±3,17
VIP (%)	88,8	-
İYE (%)	16,2	-
Bakteriyemi (%)	27,5	-
Ateş (°C)	37,03±0,98*	36,49±0,14

Gruplararası farklılık ki-kare ve Student t testi ile incelenmiştir. * $p<0,001$, ** $p=0,002$, n:Birey sayısı, NIDDM: İnsülin Bağımlı Olmayan Diyabetes Mellitus, IDDM: İnsülin Bağımlı Diyabetes Mellitus, KOAH:Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı, PAH: Periferik Arter Hastalığı, KBY:Kronik Böbrek Yetmezliği, ARH: Akut Renal Hasar, CVVHDF: Devamlı veno-venöz hemodiyafiltrasyon, OAB: Ortalama arter basıncı, KH:Kalp hızı, CVP: Santral Venöz Basınç, VIP: Ventilator ilişkili Pnömoni, İYE: İdrar Yolu Enfeksiyonu

Tablo 4-2. Çalışma gruplarına ait biyokimyasal parametreler

Parametreler	Sepsis Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=100)
Kreatinin (mg/dL)	2,04±1,42*	0,97±0,34
BUN (mg/dL)	62,29±26,99*	20,88±5,41
Hemoglobin (g/dL)	9,63±1,10	13,26±1,77*
Lökosit (kg/mm ³)	20478,61±14374,37*	7826,60±2272,53
Trombosit	184721,25±132050,84	306571,97±92610,71 *
CRP (mg/L)	17,43±5,36*	0,50±1,03
pH	7,35±0,10*	7,42±0,31
PaO ₂	107,70±45,33***	96,76±25,12
PaO ₂ / FIO ₂	205,28±66,16*	384,94±64,94
PaCO ₂	36,22±12,67	35,00±3,89
HCO ₃	21,76±4,42	24,73±1,24*
Laktat (mEq/L)	3,78±3,63*	1,02±0,43
Glukoz (mg/dl)	162,87±63,13*	113,62±33,71
Na ⁺ (mEq/L)	137,60±7,45	138,94±3,69
K ⁺ (mEq/L)	4,06±0,82**	3,81±0,42
Albumin	2,67±0,58	4,11±0,61
SGOT	440,16±91,60*	29,43±2,23
SGPT	212,08±47,86*	28,08±2,47
Total Bilirubin	3,19±6,50*	0,69±0,72
LDH	480,03±257,14*	237,20±124,26

Gruplararası farklılık Student t testi ile incelenmiştir. * $p<0,001$, ** $p=0,04$, *** $p=0,003$

n:Birey sayısı, BUN:Kan üre azotu, CRP:C-Reaktif Protein, PaO₂:Arteriyel parsiyel oksijen basıncı, PCO₂: Arteriyel parsiyel karbondioksit basıncı, HCO₃:Bikarbonat, Na:Sodyum, K:Potasyum, SGOT:Serum Glutamik oksaloasetikasit transaminaz, SGPT: Serum glutamik pürüvik transaminaz, LDH: Laktat dehidrogenaz, PaO₂/FIO₂: Arteriyel parsiyel oksijen basıncı/İnspire edilen Fraksiyone Oksijen yüzdesi

Sepsis grubunda saptanan etken patojen mikroorganizmaların oranı tablo 4-3'de verilmiştir. Hastalarımızda en sık *Pseudomonas aeruginosa*, *Acitenobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* etken patojenlerine bağlı ventilatör ilişkili pnömoni (VIP) enfeksiyonları saptanmıştır.

Tablo 4-3. Sepsis grubunda saptanan etken patojen mikroorganizmalar

Etken Patojen Mikroorganizmalar	%
Acinetobacter baumannii	35
Pseudomonas aeruginosa	35
Klebsiella pneumoniae	26,2
MRSA	25
Enterobacter	12,5
Escherichia coli	11,2
MHSA	7,5
Streptococcus pneumoniae	6,2
Corynebacterium striatum	6,2
Vankomisin dirençli Enterokok	5
Aspergillus	1,2
Serratia marcescens	1,2
Candida	3,8
MRSA:Metisiline Rezistans Staphylococcus Aureus, MHSA: Metisilin Hassas Staphylococcus Aureus	

Tablo 4-4'de her iki grubun TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları gösterilmiştir. Çalışma gruplarımız arasında TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya rastlanmamıştır.

Tablo 4-4. Çalışma gruplarında TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları

	Sepsis Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=100)
Genotip		
TT	38 (%47,5)	47 (%47)
CC	12 (%15)	18 (%18)
TC	30 (%37,5)	35 (%35)
Allel		
T	106 (%66,25)	129 (%64,5)
C	54 (%33,75)	71 (%35,5)
n: birey sayısı		

Tablo 4-5’de çalışma gruplarında TLR-9 (C>T) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları gösterilmiştir. Çalışma grupları arasında TLR-9 (C>T) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları açısından anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Tablo 4-5. Çalışma gruplarında TLR-9 (C>T) polimorfizmi genotip ve allel dağılımları

	Sepsis Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=100)
Genotip		
CC	27(%33,8)	31 (%31)
TT	24 (%30)	20 (%20)
CT	29 (%36,2)	49 (%49)
Allel		
C	83 (%51,87)	111 (%55,5)
T	77 (%48,13)	89 (%45,5)
n: birey sayısı		

Serum TLR-9 düzeyleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında sepsis grubunda TLR-9 serum düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunduğu gözlenmiştir ($p=0,002$) (Tablo 4-6). Ayrıca sepsis grubunda ölen olgularda ($0,65\pm0,17\text{pg/ml}$) sağkalımı olan hastalara göre ($0,70\pm0,68\text{ pg/ml}$) serum TLR-9 düzeyleri daha düşük saptanmış fakat istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$).

Fakat bu bulgumuza ek olarak sepsis grubundaki hastaları laktat düzeyleri ≤ 5 mEq/L ve >5 mEq/L olacak şekilde gruplandırdığımızda laktat düzeyi >5 mEq/L olan hastalarda TLR-9 düzeylerinin ($0,79 \pm 0,36$ pg/ml) laktat düzeyi ≤ 5 mEq/L olan hasta grubuna göre ($0,62 \pm 0,14$ pg/ml) istatistiksel anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p=0,009$).

Tablo 4-6. Çalışma gruplarında serum TLR-9 düzeyleri

Gruplar	Sepsis Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=100)
TLR-9 düzeyi (pg/ml)	$0,66 \pm 1,05$ *	$0,74 \pm 0,41$
Gruplararası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. * $p=0,002$, n: birey sayısı		

Tablo 4-7’de çalışma gruplarında TLR-9 (C>T) ve TLR-9 (-1486 T>C) genotip ve allel dağılımlarına göre serum TLR-9 düzeyleri gösterilmiştir.

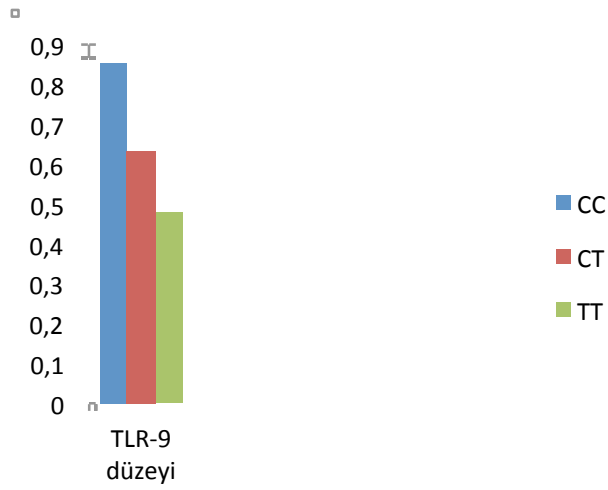
Sepsis grubunda TLR-9 (-1486 T>C) CC genotipi taşıyan bireylerde serum TLR-9 düzeyi, TT genotipi taşıyan hastalara göre istatistiksel olarak yüksek gözlemlenmiştir ($p=0,033$, %95 güven aralığı: 0,60-1,42). Sepsis grubunda TLR-9 (C>T) polimorfizmi ve serum TLR-9 düzeyleri açısından ise anlamlı bir bulgu elde edilememiştir. Kontrol grubunda her iki polimorfizm ile serum TLR-9 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Çalışma gruplarında her iki polimorfizme ait alleller ile serum TLR-9 düzeyleri arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Çalışma grupları arasında TLR-9 (C>T) ve TLR-9 (-1486 T>C) genotip ve allel dağılımlarına göre serum TLR-9 düzeylerini değerlendirdiğimizde; sepsis grubunda hem TLR-9 (1486 T>C) TT genotipi taşıyan bireylerde ($p=0,011$; %95 güven aralığı: 0,055-0,44) hem de TLR-9 (C>T) TT genotipi taşıyan bireylerde ($p=0,036$; %95 güven aralığı: 0,01-0,55) serum TLR-9 düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık seviyesinde azaldığı tespit edilmiştir.

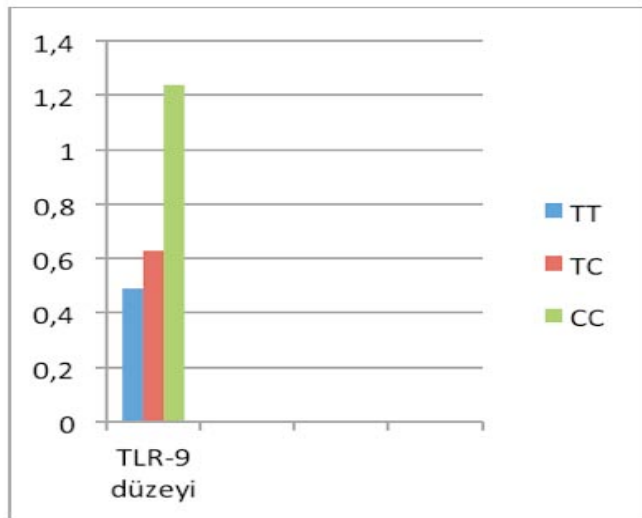
Tablo 4-7. Çalışma gruplarında TLR-9 (C>T) ve TLR-9 (-1486 T>C) genotip ve allel dağılımlarına göre serum TLR-9 düzeyleri

TLR-9 (C>T)	Sepsis Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=100)
Genotip		
CC	0,85±1,72 (n=27)	0,66±0,35 (n=31)
TT	0,48±0,38 (n=24) ***	0,76±0,47 (n=20)
CT	0,63±0,44(n=29)	0,78±0,42 (n=49)
Allel		
C	0,73±1,23 (n=56)	0,73±0,40 (n=80)
T	0,56±0,42 (n=53)	0,77±0,43 (n=69)
TLR-9 (- 1486 T>C)	Sepsis Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=100)
Genotip		
TT	0,49±0,38 (n=38) **	0,73±0,44 (n=47)
CC	1,24±2,54 (n=12)*	0,73±0,36 (n=18)
TC	0,63±0,46 (n=30)	0,76±0,40 (n=35)
Allel		
T	0,55±0,42 (n=12)	0,74±0,42 (n=82)
C	0,81±1,40 (n=42)	0,75±0,38 (n=53)
n: birey sayısı, *p=0,033 **p=0,011***p=0,036		

Şekil 4-1 ve Şekil 4-2’de sepsis grubunda TLR-9 (C>T) ve TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmleri genotip dağılımlarına göre serum TLR-9 düzeyleri şematik olarak gösterilmiştir. TLR-9 (C>T) polimorfizmi açısından TLR-9 düzeyleri CC>CT>TT şeklinde sıralanırken TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi açısından TT>TC>CC şeklinde gözlemlenmiştir.



Şekil 4-1. Sepsis grubunda TLR-9 (C>T) polimorfizmi genotip dağılımlarına göre serum TLR-9 düzeylerinin şematik gösterimi



Şekil 4-2. Sepsis grubunda TLR-9 (-1486 T>C) polimorfizmi genotip dağılımlarına göre serum TLR-9 düzeylerinin şematik gösterimi

Tablo 4-9’da sepsis grubunda enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizma tipine göre serum TLR-9 düzeyleri düzeyleri gösterilmiştir. Enfekte olan birey sayısı istatistiksel olarak değerlendirme açısından yetersiz olmakla birlikte en yüksek TLR-9 düzeylerinin *Corynebacterium striatum* enfeksiyonu varlığında, en düşük düzeyin ise *E.coli* enfeksiyonu varlığında görüldüğü saptanmıştır.

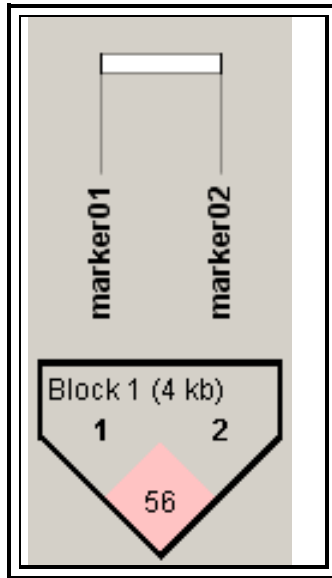
Tablo 4-9. Sepsis grubunda enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizma tipine göre serum TLR-9 düzeyleri

Enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizmalar	(n=80)	TLR-9 düzeyi (pg/ml)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	28	0,80±1,69
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	0,66±0,48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21	0,53±0,42
<i>Enterobacter</i>	10	1,19±2,83
MRSA	20	1,01±1,97
MHSA	6	0,64±0,41
<i>Candida</i>	3	0,51±0,38
<i>Corynebacterium striatum</i>	5	2,61±3,69
<i>Escherichia coli</i>	9	0,40±0,28
Vankomisin dirençli enterokok	4	0,66±0,46
<i>Aspergillus</i>	1	1,16
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,47
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	0,45±0,41
MRSA: Metisiline rezistans <i>Staphylococcus aureus</i> , MHSS: Metisilin hassas <i>Staphylococcus aureus</i> . * $p=0,043$, ** $p=0,039$		

Bulgularımıza ait haplotip analizleri yapıldığında çalışma grupları arasında haplotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir (D:0.562, LOD:6,65, r^2 : 0,144) (Tablo 4-10) (Şekil 4-3).

Tablo 4-10. Çalışma gruplarında TLR-9 polimorfizmlerine ait haplotip frekansları

Haplotip İlişkileri	Frekans	Hasta, kontrol oranları	X^2	p
TT	0.391	0.432, 0.358	2.06	0.151
CC	0.277	0.278, 0.277	0.0	0.988
CT	0.262	0.235, 0.284	1.105	0.293
TC	0.070	0.056, 0.082	0.92	0.337

**Şekil 4-1** LD grafiği

Klinik parametreler ile genotip dağılımları arasındaki ilişkiyi araştırdığımızda TLR-9 (C>T) polimorfizmi heterozigot CT genotipi taşıyan hastalarda KOAH hastalığı görülme sıklığı istatistiksel olarak yüksek gözlemlenmiştir ($p=0,029$, $\chi^2=4,763$, OR:2,95, %95 güven aralığı=1,097-7,954). Ayrıca hastalarda periferik arter hastalığına sahip olma riski ile C alleli taşıma sıklığı arasında ters orantılı bir anlamlılık olduğu saptanmıştır ($p=0,020$, $\chi^2=5,397$, OR:3,26, %95 güven aralığı=0,067-0,850) (Tablo 4-11).

Tablo 4-11. Sepsiste klinik parametreler ve genotip dağılımları arasındaki ilişkinin gösterilmesi

Klinik Parametreler	TLR-9 (C>T) polimorfizmi			TLR-9 -1486 T>C polimorfizmi		
	CC n (%)	TT n (%)	CT n (%)	TT n (%)	CC n (%)	TC n (%)
KOAH	6 (%22,2)	5 (%20,8)	13 (%44,8)*	13 (%34,2)	1 (%8,3)	10(%33,3)
PAH	3 (%11,1)	7 (%29,2)	2 (%6,9)	6 (%15,8)	1 (%8,3)	5 (%16,7)
Klinik Parametreler	TLR-9 (C>T) polimorfizmi		TLR-9 -1486 T>C polimorfizmi			
	C alleli n (%)	T alleli n (%)	T alleli n (%)	C alleli n (%)		
KOAH	19 (%33,9)	18 (%34)	23 (%33,8)	11(%26,2)		
PAH	5(%8,9)**	9 (%17)	11 (%16,2)	6 (%14,3)		

* $p=0,029$, ** $p=0,020$

5. TARTIŞMA

Hastane ve yoğun bakım hastalarında ki en önemli ölüm nedenlerinden biri olan sepsisin görülme sıklığı, tüm farkındalık çalışmalarına, modern antibiyotiklere ve ileri resüsitasyon yöntemlerine rağmen halen yüksektir. Değişik serilerde %20-80 arasında değişen oranlar bildirilmektedir (22,112,113). Uygun antibiyotik tedavisine başlanılmasında gecikilen her saat için mortalitenin ortalama % 5-10 arttığını gösteren çalışmalar sepsiste erken tanı ve tedavinin mortalitenin azaltılmasındaki önemini ortaya koymaktadır (114). Oysa klinikte sepsis tanısını koymak özellikle yoğun bakım hastalarının mevcut komorbiditeleri ve karmaşık klinik semptomları nedeniyle çoğu kez kolay değildir.

Sepsis; enfeksiyona karşı verilen sistemik enflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Fiziopatolojide yer alan etken patojen mikroorganizmaların ve konak enflamatuvar yanıtın erken tespiti tanı ve tedavi için önemlidir. Yoğun bakım hastasının sepsis tanısında biyolojik göstergelerin kullanılması hem erken tanıyı ve böylece uygun tedavinin erken başlatılmasını sağlaması açısından hem de prognoz tahmininde veya antibiyotik yönetiminde de faydalı olabilir (115). İdeal bir sepsis biyogöstergesi sepsis tanısına özel ve hassas olmalı, hızlı kullanımı sağlanabilen, kolayca ölçülebilen ve ucuz bir yöntem olmalı, klinik semptomlar yokken bile hastalık şiddetini ölçebilmeli, hastalığı ve tedavi cevabını monitörize edebilmelidir. Bu amaçla pekçok farklı biyokimyasal, hücresel veya genetik biyogöstergeler ile sitokin/kemokin, CRP veya prokalsitonin gibi akut faz proteinleri ya da antitrombin, aPTT, D-dimerler, fibrin, protein C ve S gibi koagülasyon biyogöstergeleri kullanılmıştır (113-115).

Majör antimikrobiyal direncin ve patojenlerin hızlı saptanmasında, kültür bağımlı olmayan polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ve kütle spektroskopisi gibi diagnostik yöntemler özellikle kültürü zor patojenlerde veya kültür örnekleri alınmadan ampirik antimikrobiyal ajanların uygulandığı klinik durumlarda yararlı olabilir (33). Fakat bu moleküler yöntemlerin klinikte deneyimi sınırlıdır ve standart kan kültür yöntemlerinin yerini alması için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (116,117).

Sepsise yanıt olarak en iyi bilinen hematolojik biyogöstergeler arasında lökositoz, sola kayma ile birlikte nötrofili ve daha az sıklıkla da nötropeni varlığı sayılabilir. Fakat bu göstergelerin hiçbiri spesifik değildir ve enfeksiyon dışındaki sebepler de dahil

olmak üzere pek çok durumda görülebilmektedir. Bizim çalışmamızda da sepsis grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; lökosit sayısı istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır.

Bir diğer hematolojik biyogösterge olarak CRP ve prokalsitonin sepsis tanısında ve tedavinin izlenmesinde önemli parametreler olarak ortaya konulmuşlardır (18). CRP akut faz reaktan proteinlerinden birisidir. Esas olarak karaciğer hepatositlerinden enflamasyon olan dokudan salınan IL-6 gibi bir sitokin uyarısına cevap ile sentezlenir. 48 saatte maksimum seviyesine yükselir ve ortalama 19 saat yarı ömre sahiptir. Plazma düzeyinin en önemli belirleyenin sentez hızı olması nedeniyle CRP seviyesi akut faz cevabının kullanışlı objektif bir göstergesidir. Normal düzeyi yaklaşık olarak 0.8mg/L'dir fakat yaşlılarda daha yüksek saptanabilir. Sepsis gibi çoğu akut veya kronik enflamatuvar durumda düzeyi yüksek olan CRP yoğun bakım hastalarındaki enfeksiyonlarda hem tanısal hem de prognostik olarak en yaygın kullanılan biyogöstergedir (115).

Prokalsitonin, CRP'ye kıyasla daha çabuk yükselen ve inflamasyon gerilerken nisbeten daha erken düşen bir göstergedir. Prokalsitonin seviyesi ile sepsisin ağırlığı ve mortalite arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde yapılan çalışmalarda CRP >50 mg/L ve prokalsitonin $\geq$ 1.5 nanogram/ml sınır kabul edildiğinde sepsis tanısını %100'e yakın duyarlılıkla fakat %70 özgüllükte koyabildiği bulunmuştur (118). Prokalsitonini klasik enflamasyon yanıtını belirleyen CRP, TNF-alfa, IL-6, lökosit sayısı ve vücut ısısına karşın daha üstün bulan çalışmalar da vardır.

Literatürde Prokalsitonin veya CRP gibi enfeksiyon belirteçlerin sepsis tanısındaki ve sepsisin akut enflamatuvar modelini diğer yaygın enflamasyon nedenlerinden ayırt etmedeki potansiyel rolleri tartışmalıdır (17). Literatürde sepsisin şiddeti ile serum CRP ve prokalsitonin düzeylerinin anlamlı bir korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmaların aksine ağır sepsisli ve septik şoklu hastalarda CRP düzeylerinin hastalığın şiddetini belirleyen bir belirteç olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (118-120).

Yoğun bakım taburculuğundaki yüksek CRP düzeyleri, yüksek oranda yeniden yoğun bakıma geliş ve yüksek hastane mortalitesi ile ilişkilendirilmiştir (121). Yoğun bakıma kabul CRP değerlerinin >100mg/L olduğu hastalarda, <10mg/L olan hastalara göre organ yetmezliklerinin görülmesi ve mortalite anlamlı olarak yüksek olmuş, CRP değerlerinin yüksek olduğu hastalarda tedavinin 48 saat sonrasındaki değerlerde düşme olan olgularda mortalite %15'lere düşerken CRP düzeylerinin değişmediği hastalarda mortalite %61 gibi yüksek değerlerde saptanmıştır (122).

CRP ölçümünün sepsise spesifik olmaması, diğer enflamatuvar, enfeksiyon hastalıklarında ve steroid tedavisi alan hastalarda plazma konsantrasyonunda artış olabilmesi nedenleriyle ağır enfeksiyon ve diğer akut enflamatuvar durumları ayırmak için bu belirteçlerin kullanımına dair tavsiye verilememektedir (28). Enfeksiyon tanısında, sepsis şiddetinin ve prognozunun tayininde değişik sensitivite ve spesifiteleri bildirilmekteyse de tekrarlanan CRP değerlerindeki eğilimin tek bir CRP değerine göre daha faydalı olduğu görülmektedir. 38.2° C üzerindeki ısı ile birlikte yüksek CRP değerinin tanısal spesifitesi ise %100'e kadar yükselmektedir (115). Aynı şekilde diğer klinik tablolarda da yükselbilmesi ve eşik değeri konusunda fikir birliği olmaması nedeniyle, prokalsitonin ölçümlerinin tek başına değil, ancak klinik ve diğer laboratuvar bulguları ile anlamlandırılması gerektiği, tek bir ölçümden ziyade belirli aralıklarla ölçüm yapılmasının sepsis tanısı ve izlemi için daha faydalı olacağı belirtilmektedir (18).

Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak sepsis grubunda CRP ($p<0,001$; %95 güven aralığı=15,85-18,02), lökosit sayısı ($p<0,001$; %95 güven aralığı=9,77-15,53) ve vücut sıcaklığı ($p<0,001$; %95 güven aralığı=0,34-0,73) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında beklenildiği üzere istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır.

Literatürde enflamasyon ve sepsis ilişkisini genetik düzeyde gösteren çok sayıda belirteç çalışması mevcuttur (123). IL-6 düzeyinin sistemik enflamasyon için spesifik olmaması nedeniyle tek başına iyi bir tanısal gösterge olmadığı, ancak çoklu panel göstergeleri ile birlikte kullanılabileceği, yüksek IL-6 düzeylerinin mortalite ve organ yetmezlikleri ile korelasyon gösterdiği için IL-6 takibinin prognostik bir araç olarak faydalı olabileceği belirtilmiştir. Çalışmalar <1000pg/ml IL-6 düzeylerinin sepsiste sağkalıma, daha yüksek seviyelerin ise mortaliteye işaret ettiğini göstermektedir (124).

Toll geninin ürünü olan ve toll-like reseptörler (TLR) olarak adlandırılan proteinler, birçok patojene karşı hem doğal immün yanıtın oluşmasını hem de kazanılmış immün yanıtın aktive olmasını sağlayarak konak bağışıklık sisteminde çok önemli bir görev alırlar. Literatürde pek çok çalışmada enfeksiyöz, kronik enflamatuvar ve otoimmün olaylar ile TLR aracılı yolların ilişkisi bildirilmiştir (125-128). TLR aktivasyonu ile sitokinlerin, kemokinlerin ve araşidonik asit moleküllerinin sentezi ve salınımı artar, reaktif oksijen metabolitlerinin ortaya çıkması ile de dokuda hasar meydana gelir (129-131).

Sepsis, konağın yaygın sistemik enflamatuvar yanıtının neden olduğu yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ciddi bir klinik problemdir. TLR'ler de sepsiste hiperenflamasyonun başlamasında ve doku hasarının oluşmasında önemli bir role sahiptir.

TLR genleri ve sepsis arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmalardan birisi Lorenz ve arkadaşlarının yaptığı ve TLR-2 Arg753Gln polimorfizminin *Staphylococcus aureus* nedenli sepsise yatkınlık oluşturduğunu gösterdiği çalışmadır (110). TLR-2'nin gram (+) bakterilerden kaynaklanan lipoproteinler, lipopeptidler, lipoteikoik asit ve peptidoglikanları içeren PAMP'ları tanıması nedeniyle akut enfeksiyonlarda önemli bir rolü vardır (100). TLR-2 kronik enflamatuvar hastalıklarda da rol alır. TLR-2 SNP bulunan olgularda mikroorganizmalar konakla anormal etkileşime girebilmekte ve Crohn hastalığında olduğu gibi kronik enflamasyona neden olabilmektedir (132). SIRS olgularında yapılan çalışmada TLR-4 mutasyonu olan vakalarda gram (-) enfeksiyon insidansı anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (133). Agnese ve arkadaşları TLR-4 polimorfizminin insanlarda gram (-) mikroorganizmanın neden olduğu septik şoka yatkınlık oluşturduğunu göstermişlerdir (107,108). Wurfel ve ark. çalışmalarında TLR-1 polimorfizminin gram (+) sepsisi arttırdığını bildirmişlerdir (115). Asya ırkında IL-10 1082A/G mutasyonu ve sepsis patogenezi arasında pozitif bir korelasyon gösterilmiştir (134). Dong ve ark ise IRAK-M polimorfizmini sepsis görülme riski ile anlamlı olarak ilişkilendirmişlerdir (135).

Multidisipliner bir yoğun bakımda yapılan ve TLR-2, TLR-4 ve TLR-5 SNP'lerin incelendiği çalışmada da genetik polimorfizm ile sepsisin ne gelişmesi ne de mortalitesi arasında bir ilişki saptanmamış sadece TLR-2-R753Q SNP'nin geniş seri çalışmalarla desteklenmesi gerekmele birlikte yoğun bakımda enfeksiyon gelişimi için yüksek risk taşıyan hastanın tanınmasında faydalı bir gösterge olabileceği belirtilmiştir (111).

TLR-9 mikrobiyal DNA için tanıma kalıbı taşıyan bir TLR'dür. Reseptörün bakteriyel endotoksin ve ekzotoksin tanıma kalıbındaki genetik değişiklikler yoğun bakım hastasında sepsis ve organ disfonksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Major travmalı 557 hastanın TLR-9 gen polimorfizm genotiplerinin incelendiği çalışmada rs187084 ve rs352162 polimorfizmleri bakteriyel DNA stimülasyonuna yanıt olarak lökositlerden artmış TNF-alfa üretimi ve yüksek sepsis morbiditeleri ile ilişkili saptanmıştır. Çalışmacılar her iki polimorfizmin major travma hastalarında sepsis ve çoklu organ yetmezliği risk tahmini ile ilgili olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (6).

Davis ve arkadaşlarının puerperal A grubu streptokoksik sepsiste maternal kazanılmış immun cevapta SNP'leri inceledikleri çalışmalarında sepsisli olgular ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TLR-9(-1486), ısı şok proteini (heat shock protein, HSP) 70-2 1267 ve IL-1beta-511 genotiplerinde anlamlı farklılık saptanmış ve puerperal grupta A grubu

streptokokal sepsisin TLR-9, HSP 70-2 ve IL-1beta gen polimorfizmlerinin kazanılmış immun cevap ile ilişkili olabilecekleri belirtilmiştir (136).

Literatürde TLR'nin SNP'leri ve hastalıklara karşı yarattığı duyarlılıklar ülke popülasyonlarına göre de pek çok çalışmada incelenmiştir. Tunus popülasyonunda TLR-2, TLR-4 ve TLR-9 polimorfizmleri ile Behçet Hastalığı duyarlılığının incelendiği çalışmada TLR-9 (-1486 T>C) genotip ve allel için istatistiksel anlam olmayan bir farklılık saptanmıştır (137). Çek popülasyonunda TLR-2 (2408 G/A ve -16934A/T) ve TLR-9 (-1486C/T, -1237C/T ve +2848A/G) polimorfizmlerinin kronik periodontit ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmada TLR-9 haplotip T(-1486)/T(-1237)/A(2848) hasta grubunda kontrol grubuna göre daha sık, haplotip T(-1486)/T(-1237)/G(2848) ise daha seyrek olarak saptanmıştır. Bu sonuçlarla çalışmacılar TLR-9 haplotiplerinin kronik periodontit hassasiyeti ile ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır (138). Güney Çin'de 123 Multipl sklerozlu Moğol hastada, TLR-3 (c.1377), TLR-9 (-1486) ve TLR-9 (2848) gen polimorfizmlerinin araştırıldığı çalışmada, TLR-9(-1486) ile anlamlı bir ilişki saptanamazken TLR-3(c.1377) ve TLR-9(2848) gen polimorfizmleri ile bir ilişki olabileceği vurgulanmıştır (139).

Song ve arkadaşlarının 378 sepsisli hasta ve 390 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada; TLR-2, TLR-4, TLR-9, MyD88 ve TOLLIP (toll interacting protein) varyasyonları incelenmiş, TLR-2, TLR-4, TLR-9, MyD 88 ve TOLLIP'ın allel ve genotip dağılımları açısından sepsisli hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamış, Çin popülasyonunda TLR-2, TLR-4, TLR-9 ve MyD 88 için SNP major risk faktörü olmadığı belirtilmiştir (140).

Bizde çalışmamızda TLR-9 serum düzeyini ve TLR-9 (-1486 T>C) ve TLR-9 (C>T) polimorfizmlerini genotip ve allel dağılımları açısından 80 sepsis tanısı konulmuş olguda ve 100 sağlıklı bireyde inceledik. TLR-9 (-1486 T>C) ve TLR-9 (C>T) polimorfizmleri genotip ve allel dağılımları açısından sepsis ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlemedik. Sepsiste enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizma ve gen polimorfizmleri arasındaki ilişki incelendiğimizde TLR-9 (-1486 T>C) gen polimorfizmi CC genotipi taşıyan hastalarda Klebsiella pneumoniae enfeksiyonu varlığına CC taşımayan hastalara göre daha sık rastladık. TLR-9 (C>T) TT genotipi taşıyan hastalarda Acitenobacter ve Pseudomonas enfeksiyonu sıklığını istatistiksel anlamlı düzeyde azalmış olarak gözlemledik.

Çalışma gruplarımız arasında enfeksiyon etkeni patojen mikroorganizma tipine göre serum TLR-9 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Enfeksiyon

etkeni ajan patojenlerine göre hasta grubunda serum TLR-9 düzeyleri incelendiğinde sepsis olgu sayısı istatistiksel olarak değerlendirme açısından yetersiz olmakla birlikte en yüksek TLR-9 düzeylerinin *Corynebacterium striatum* enfeksiyonu varlığında, en düşük düzeyin ise *E.coli* enfeksiyonu varlığında görüldüğünü saptadık.

Septik şok hastasındaki TLR kinetiklerini inceleyen 17 hastalık bir çalışmada TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-9, TNF-alfa, IL-8 ve IL-1beta mRNA ekspresyonu , IL-18, IL-2, IL-10 ve TNF-alfa plazma konsantrasyonları sepsis tanısı konduğunda ve 72 saat sonra incelenmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Tüm hastalarda sepsis tanısı konduğunda TLR gen ekspresyonlarında up-regülasyon olmasına karşın 72 saat sonra serum sitokin seviyelerinde azalma, klinik bulgulara iyileşme, daha iyi bir sonuç veya mortalitede azalma gibi bulgular ile ilişkisiz olarak hastaların %35'inin gen ekspresyonunda ilk değerlere göre down-regulation saptanmıştır. Araştırmacılar TLR'ün artmış ekspresyonu ile septik şok derecesi veya sonuç skorları arasında bir bağlantı kuramadıklarını ifade etmişlerdir (141). Deneysel çalışmamız sonucunda biz sepsis grubunda serum TLR-9 düzeylerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptadık. Çalışmamızda TLR-9 düzeyleri bir kez ölçüldü ve hastalarımızın çoğu ağır sepsis ve septik şokta idi. Çalışmamızda saptadığımız serum TLR-9 düzeylerindeki düşüklüğün ağır sepsis veya septik şokta olan olgularımızdaki down-regülasyon nedeniyle olabileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda, çalışma gruplarında her iki polimorfizme ait alleller ile serum TLR-9 düzeyleri arasında da anlamlı bir farklılık saptamadık. Sepsis grubunda hem TLR-9 (-1486 T>C) TT hem de TLR-9 (C>T) TT genotipi taşıyan bireylerde serum TLR-9 düzeylerini düşük saptadık. Sepsis grubunda serum TLR-9 düzeyini, TLR-9 (-1486 T>C) CC genotipi taşıyan bireylerde TT genotipine göre artmış olarak gözlemlerken TLR-9 (C>T) polimorfizminde anlamlı bir fark elde etmedik. Kontrol grubunda her iki polimorfizm ile serum TLR-9 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki gözlemlemedik.

Yakın tarihli çalışmalarda TLR-9'un polimikrobiyal ARH patogenezinde de rol oynadığı belirtilmektedir. Çekal ligasyon ve perforasyon (ÇLP) ile polimikrobiyal sepsis oluşturulmuş farelerdeki çalışmada sıvı resüsitasyonuna ve antibiyotik tedavisine rağmen insan sepsisine benzer şekilde farelerde de ARH geliştiğini saptamışlardır. Araştırmacılar ÇLP sonrasında renal dokularda TLR-9 ekspresyonunun geliştiğini ve oluşan renal hücre apoptozisi ve ARH'nın TLR-9 bağımlı olduğunu, TLR-9'un polimikrobiyal septik ARH patofizyolojisinde kritik bir öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir (7). Biz çalışmamızda sepsis grubunda ARH ve Devamlı Veno-Venöz Hemofiltrasyon (CVVHF) ihtiyacının

istatistiksel anlamlı olarak artmış görülmesine rağmen ARH ile serum TLR-9 düzeyleri arasında direkt bir ilişki saptamadık.

Sepsiste miyokardiyal fonksiyonlarda çeşitli mekanizmalarla etkilenir. Kazanılmış immün sistemde özellikle TLR-2 ve TLR-4 kardiyak disfonksiyona katkıda bulunur (142,143). Deneysel sepsis modellerinde kalpte yüksek TNF- α ve IL-1 β seviyeleri saptanmıştır (144). TLR-9'un miyokardiyumdaki rolü hakkında çok az bilgi vardır fakat kalpte TLR-9 ekspresyonu gösterilmiştir (145). Ayrıca TLR-9 stimülasyonunun değişik dokularda NF κ B aktivasyona öncülük ettiği bilinmektedir (146). Ağır sepsis ve septik doku hipoperfüzyonu ile ilişkilendirilen kardiyovasküler disfonksiyon sepsis hastalarının yaklaşık %40'ında görülen ciddi bir komplikasyondur ve mortaliteyi %20-70 artırır (147,148). Sepsiste miyokardiyal fonksiyonlarda TLR-9 rolünün araştırıldığı bir çalışmada sentetik doğal ve TLR-9 eksik izole fare kardiyomiyositleri karşılaştırılmış ve bakteriyel DNA'nın TLR-9 yolu ile miyokardiyal sitokin üretimini artırdığı, kardiyomiyosit kontraktilitede kayba neden olduğu saptanmıştır (149).

Sepsiste başlangıç sıvı yüklemesi sonrasında devam eden hipotansiyon veya kan laktat konsantrasyonunun ≥ 4 mmol/L olması doku hipoperfüzyonu olarak tanımlanmaktadır (12). Ağır sepsis teşhisinde en iyi belirteçlerden birisi laktat düzeyidir (150). Laktat düzeyi yüksek olan ağır sepsisli hastalarda mortalitede ciddi artış tespit edilmiştir (151). Çalışmamızda da sepsis olgularında laktat düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Ayrıca sepsis grubunda sepsise bağlı doku hipoperfüzyon göstergeleri olarak laktat >5 mmol/L ve OAP <60 mmHg olan ve olmayan olgularda serum TLR-9 düzeylerini karşılaştırdığımızda OAP <60 mmHg olan olgularda serum TLR-9 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmazken, >5 mmol/L laktat değerlerindeki olguların serum TLR-9 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik saptadık. Çalışmamızdaki sepsis olgularımızda saptadığımız düşük TLR-9 seviyelerinin sepsise bağlı doku hipoperfüzyonu olan laktat >5 mmol/L olgularında yüksek olmasını sepsisin progresyonu ile ilgili olarak değerlendirdik. Ağır sepsiste down-regülasyonla serum TLR-9 düzeylerinde azalma olduğu, yüksek laktat değerleri olan doku perfüzyonun bozulduğu olgularda ise belki de TLR-9 re-ekspresyonuna bağlı olarak serum TLR-9 düzeylerinin arttığı kanaatindeyiz.

TLR'lerin enflamasyon ve immün sistem yanıtındaki rolleri ile olayların patofizyolojisi anlaşıldıkça sepsiste TLR inhibitörlerinin koruyucu rolleri ve tedavi planındaki yerleri de araştırılmaktadır. ÇLP ile sepsis oluşturulan farelerde TLR-9

eksikliğinin mortaliteyi azalttığını belirten çalışmacılar, dalak, akciğer ve karaciğerde p38 aktivasyonunun ve artırılmış Akt fosforilasyonunun kırıldığını ek olarak enflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin ve splenik apoptozisin azaldığını göstermişlerdir (152).

İnsan bağışıklık sisteminde B hücre fonksiyonlarının supresyonu immun cevabı ve IL-10 sekresyonunu etkilemektedir. Ziegler ve arkadaşları immun sistemde IL-10 sekresyonunu kontrol eden B hücrelerindeki kalsiyum ilişkili sinyal iletiminin TLR-9 ile uyarılan IL-10 sekresyonunu etkilediğini göstermişlerdir (153). B hücreleri üzerinden IL-10 sentezinin farmakolojik manuplasyonu kronik Lenfositik Lösemi, transplantasyon, otoimmünite ve sepsis tedavisinde faydalı olabilmektedir.

Çalışmalarda sepsis ve pek çok kronik enflamatuvar hastalığın tedavi planlarında da kullanılmaya başlanmıştır. TLR-4 antagonisti olan Eritoran'ın ağır sepsis tedavisinde kullanıldığı randomize, çift kör, plasebo-kontrollü Faz 3 çalışmada olduğu gibi ilerleyen günlerde TLR'leri veya antagonistlerinin kullanımının artacağı öngörülmektedir. Eritoran bir sentetik lipid A antagonistidir ve hücre yüzeyinde MD2-TLR-4'e gram (-) bakterilerin major komponenti ve akut enflamatuvar cevabın aktivatörü olan LPS'in bağlanmasını engeller. Opal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada plasebo ile karşılaştırıldığında eritoran kullanımı ile 28 günlük mortalitede azalma saptanmamıştır fakat 3, 6 ve 12 aylık sonuçlar beklenmektedir (154).

Yasuda ve arkadaşları, farelerde polimikrobiyal sepsis modelinde endositik TLR'lerin (TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9) inhibitörü olan klorokin sepsis bağımlı mortalite ve AKI üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada klorokin verilmesi ile renal fonksiyon kaybında, splenik apoptozisde, diğer organ hasarlarını gösteren serum biyogöstergeleri ve prototip serum pro ve antienflamatuvar sitokinler olan TNF-alfa ve IL-10 düzeylerinde azalma saptanmıştır. Benzer iyileşme TLR-9'un oligodeoksinükleotid inhibitörü (H154) verilen ve TLR-9 yetersizliği olan farelerde de saptanmıştır. Sonuç olarak çalışmacılar polimikrobiyal sepsiste multipl yolak inhibisyonu ile sağkalımın iyileştiğini, klorokin ve TLR-9 inhibitörlerinin hedeflenmiş terapötik stratejiler için uygulanabilir, geniş bir spektrum sunduğunu ve klinik gelişmelere ilave olarak gelecek vadettiğini ifade etmişlerdir (155).

Sonuç olarak; sepsis, konağın yaygın enflamatuvar yanıtının neden olduğu yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ciddi bir klinik problemdir. TLR'lerde sepsis patofizyolojisinde hiperenflamasyonun başlamasında ve doku hasarının oluşmasında önemli bir role sahiptir. Çalışmamız sonucunda; sepsis ile her iki TLR-9 (C>T) ve TLR-9(-1486

T>C) polimorfizmleri arasında bir ilişki olmadığını, ağır sepsisin azalmış serum TLR-9 düzeyleri ile ilişkili olduğunu fakat laktatın >5 mmol/L olduğu sepsise bağlı doku hipoperfüzyonu olan olgularda serum TLR-9 düzeylerinin artma ile ilişkili olduğunu öngörmektedir.

Daha geniş serilerle ve daha sık zaman aralıklarıyla çalışılarak desteklenmesi gerekmele birlikte olarak çalışmamız verileri sonucunda; ağır sepsiste down-regülasyonla serum TLR-9 düzeylerinde azalma olduğu, yüksek laktat değerleri olan doku perfüzyonun bozulduğu olgularda ise belki de TLR-9 re-ekspresyonuna bağlı olarak serum TLR-9 düzeylerinin arttığı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Linde-Zwirble WT, Angus DC. Severe sepsis epidemiology: Sampling, selection, and society. *Crit Care* 2004; 8:222–226
2. Dellinger RP. Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31:946–955
3. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al; Early Goal- Directed Therapy Collaborative Group: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345:1368–1377
4. Browne EP. Regulation of B Cell Responses by Toll-like Receptors. *Immunology* 2012
5. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004;5:190-198
6. Chen KH, Zeng L, Gu W, Zhou J, Du DY, Jiang JX. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. *Br J Surg.* 2011;98(9):1252-9
7. Liu L, Li Y, hu Z, Su J, Huo Y, Tan B, Wang X, Liu Y. Small interfering RNA targeting Toll-like receptor 9 protects mice against polymicrobial septic acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol.* 2012;122 (1-2):51-61
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 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):1644-55
9. Levy MM, Fink MP, Marshall JC. 2001 SCC/ ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-6
10. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, et al; The Surviving Sepsis Campaign: Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38:367–374
11. 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

12. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* ,2013, 41, 580-637
13. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. The effect of early goal directed therapy on treatment of critical patients with severe sepsis/septic shock: A multi-center, prospective, randomized, controlled study. *Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group of Zhejiang Province* 2010; 6:331–334
14. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008; 36:296–327
15. <http://www.ihl.org/IHI/Topics/CriticalCare/Sepsis>
16. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med*. 2000;28 (9 Suppl):S77-80
17. Giamarellos-Bourboulis EJ, Giannopoulou P, Grecka P, et al. Should procalcitonin be introduced in the diagnostic criteria for the systemic inflammatory response syndrome and sepsis? *J Crit Care* 2004; 19:152–157
18. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, et al: Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: Systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:210–217
19. Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, et al: The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev Infect Dis* 1983; 5:35–53
20. Dombrowskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35:1414–1415
21. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29: 1303-10)
22. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546–1554
23. Davies A. Incidence of severe sepsis in Europe. *OECD health data* 2001. *Intensive Care Medicine* 2001;27:581

24. Chen YX, Li CS. Risk stratification and prognostic performance of the predisposition, infection, response, and organ dysfunction (PIRO) scoring system in septic patients in the emergency department: a cohort study. *Crit Care*. 2014 Apr 16;18(2):74
25. Macdonald SPI, Arendts G, Fatovich DM, Brown SG. Comparison of PIRO, SOFA, and MEDS scores for predicting mortality in emergency department patients with severe sepsis and septic shock. *Acad Emerg Med*. 2014 Nov;21(11):1257-63
26. Blot F, Schmidt E, Nitenberg G, et al: Earlier positivity of central- venous- versus peripheral-blood cultures is highly predictive of catheter-related sepsis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:105-109
27. Kumar A, Safdar N, Kethireddy S, et al. A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: A meta analytic/metaregression study. *Crit Care Med* 2010; 38:1651–1664
28. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, et al. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: A systematic review and meta analysis. *Crit Care Med* 2006; 34:1996–2003
29. Boldt J. Clinical review: Hemodynamic monitoring in the intensive care unit. *Crit Care* 2002; 6:52–59
30. Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, et al. Betalactam and fluoro- quinolone combination antibiotic therapy for bacteremia caused by gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1386-1394
31. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clinical Infectious Diseases* 2007;44(Suppl 2): 27-72
32. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:388-416
33. Tenover FC. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: Infection control and beyond. *Clin Infect Dis* 2007; 44:418–423

34. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues, Pediatrics 2011;127(5):817-26
35. Mansfield S, Gie M, Gutknecht M, Cook CH. Sepsis and cytomegalovirus: foes or conspirators? Med Microbiol Immunol. 2015;204(3):431-7
36. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003;348/2:138-150
37. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002;420:885-91
38. Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. Crit Care Med. 2001;29(7):2-6
39. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002; 20:197-216
40. Schürholz T. Sepsis and multiple organfailure--potential therapeutic interventions Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2015;50(2):132-40
41. Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. J Intern Med. 2015;277(3):277-93
42. Ait-oufella H, Bige N, Boelle PY, Pichereau C, alves M, Bertinchamp R, Baudel JL, et al. Capillary refill time exploration during septic shock. Intensive Care Med. 2014;40(7):958-64
43. Bone RC. The patogenesis of sepsis. Ann Intern Med 1991;115:457
44. Opal SM, Glück T. Endotoxin as a drug target. Crit Care Med. 2003;31(1):57-64
45. Member of the ACCP/SCCM Consensus Conferance Committee: ACCP/SCCM consensus conferance: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992; 20:864-74
46. Delaney AP, Dan A, McCaffrey J, et al. The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: A systematic review and meta-analysis. Crit Care Med 2011; 39:386–391
47. Knueferman P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rüdiger M, Boehm O, et al. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. Cardiovasc Res 2008;78(1):26-35
48. Bendjelid K, Romand JA. Fluid responsiveness in mechanically ventilated patients: A review of indices used in intensive care. Intensive Care Med 2003;

29:352–360

49. Rivers EP, Ahrens T. Improving outcomes for severe sepsis and septic shock: Tools for early identification of at-risk patients and treatment protocol implementation. *Crit Care Clin* 2008; 24:1–47
50. Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, et al. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion Requirements in Critical Care Investigators, Canadian Critical Care Trials Group. *N Engl J Med* 1999; 340:409–417
51. Ferrer R, Artigas A, Suarez D, et al. Edusepsis Study Group: Effectiveness of treatments for severe sepsis: A prospective, multicenter, observational study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:861–866
52. Muscedere J, Dodek P, Keenan S, et al. VAP Guidelines Committee and the Canadian Critical Care Trials Group: Comprehensive evidence-based clinical practice guidelines for ventilator-associated pneumonia: Diagnosis and treatment. *J Crit Care* 2008; 23:138–147
53. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity *Nature*. 1997 Jul 24; 388(6640):394-7
54. Tizard IR, 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*. 7th Edition, Saunders, pp. 293- 299
55. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:103-110
56. Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Tarach J, Ksiazek A. Toll-Like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type2 diabetes. *Hum Immunol* 2009;70(2):121-4
57. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 2011;3(6):920- 40
58. Modlin RL. Mammalian toll-like receptors. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002;88(6):543-7
59. Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol*. 1995; 5(3):409-16
60. Akira S. Toll-like Receptor Signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*

- 2003;278, 40(3):38105-38108
61. Takeuchi O, Akira S, 2002. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes and Infection*, 4: 887-895
 62. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76
 63. Utahaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good R, Haraguchi S. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88:253-65
 64. Anderson, K.V. Toll signalling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12:13-19
 65. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3-9
 66. www.cellsignal.com
 67. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2003;4:1144-50
 68. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews* 2004; 4: 499-511
 69. O'Neill LAJ. and Bowie A.G. The family of five: TIR domain containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2007;7(5):353-364
 70. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640-3
 71. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7:837-847
 72. Pahl HL. Activators and target genes of rel/ NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18:6853-6866
 73. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-18, and the interleukin-1 converting enzyme. *Ann NY Acad Sci* 1998; 856:1-11
 74. Scott AM, Saleh M. The inflammatory caspases: Guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ* 2007; 14:23–31
 75. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296:1655–1657
 76. Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, et al. Phosphatidylinositol kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur J Immunol* 2003; 33:597–605

77. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 2005; 280:5571-5580
78. Guha M, Mackman N. The PI3K-Akt pathway limits LPS activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 2002; 277:32124-32132
79. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52:269-279
80. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-983
81. Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal Localization of TIL, a Gene Encoding a Protein Related to the *Drosophila* Transmembrane Receptor Toll, to Human Chromosome 4p14. *Genomics*. 1996;15;32(3):486-488
82. Hur JW, Shin HD, et al. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2005;65(3):266-70
83. Utahaisangsook S, Day NK, Bahna SL et al. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2002; 88:253-65
84. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96
85. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996; 184:1413-24
86. Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91:1-12
87. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 2005;1:1-14
88. Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br Dermatol* 2005;0:1-9
89. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (tlr) activation

- and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2010;33(4):861-8
90. Poltorak A, He X, Smirnova I et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene. *Science* 1998; 282(5396):2085-8
 91. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410(6832):1099-103
 92. McCluskie MJ, Krieg AM. Enhancement of infectious disease vaccines through TLR9-dependent recognition of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:155–78
 93. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(6):471-484
 94. Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 2009;37(1):291-304
 95. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA and Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(10): 3516-3521
 96. Ogura Y, Sutterwala FS, and Flavell RA. The inflammasome: First line of the immune response to cell stress. *Cell* 2006; 126: 659–662
 97. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 116 (2): 241-249
 98. Akça A, Gökçe HI, 2007. Immuniteye Genel Bakış ve Paraziter Hastalıklarda Immunité. Özcel MA, Inci A, Turgay N, Köroğlu E. Eds. Tıbbi ve Veteriner Immunoparazitoloji. Yayın No:21. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, pp. 430-431
 99. Chen XM, O'Hara SP, Nelson JB, Splinter PL, Small AJ, Tietz PS, Limper AH, Larusso NF, 2005. Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense response to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF- κ B. *J Immunol*, 175: 7447-7456
 100. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, et al. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biol Res.* 2007;40: 97-112
 101. McInturff JE, Madlin RL, Kim J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 2005;

1(25): 1-8

102. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 2004;173:1179-1183
103. Vollmer J. TLR9 in health and disease. *Int Rev Immunol* 2006;25:155-181
104. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745
105. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, et al. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 1997;386:336-337
106. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, et al. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol* 1997;27:1671-1679
107. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis*, 2002; 186(10):1522-5
108. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 2002; 162(9):1028-32
109. Mark M. Wurfel, Anthony C. Gordon, Tarah D. Holden et al. Toll-like Receptor 1 Polymorphisms Affect Innate Immune Responses and Outcomes in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008; 178(7): 710–720
110. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000; 68:6398 – 401
111. Ahmad-Nejad P, Denz C, Zimmer W, Wacker J, Bugert P, Weis C, Quintel M, Neumailer M. The presence of functionally relevant toll-like receptor polymorphisms does not significantly correlate with development or outcome of sepsis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(9):645-51
112. Wheeler AP, Bernard GR. Treating Patients with Severe Sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207-215
113. Gonsalves MD, Sakr Y. Early identification of sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2010;12:329-35

114. Bauer m, reinhart K. Molecular diagnostics of sepsis - Where are we today? *Int J Med Microbiol.* 2010;300:411-3
115. Vincent JL, Donadello K, Schmit X. Biomarkers in the critically ill patients: C-reactive protein. *Crit Care Clin.* 2011;27:241-51
116. Klouche M, Schr.der U: Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:888-908
117. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: An observational study. *Lancet* 2010; 375:224–230
118. Müller B, Becker LK, Schanhinger H, Rickenbacker RP, Huber RP, Zimmerli W, Ritz R. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2000;28(4):977-983
119. Suprin E, Camus C, Gacovin A, Le Tulzo Y, Lavoue S, Feuillu A, et al. Procalcitonin: a valuable indicator of infection in a medical ICU? *Intensive Care Med* 2000; 26: 1232-8
120. Brunkhorst FM, Al-Nawas B, Krummenaver F, Forycki ZF, Shah PM. Procalcitonin, C- reactive protein and APACHE-II score for risk evaluation in patients with severe pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(2): 93-100
121. Ho KM, Dobb GJ, Lee KY,et al. C-reactive protein concentration as a predictor of intensive care unit readmission: a nested case-control study. *J Crit Care.* 2006;21:259-65
122. Lobo SM, Lobo FR, Bota DP, et al. C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest.* 2003;123:2043-9
123. Susantitaphong P, Perianayagam MC, Tighiouart H, Liangos O, Bonventre JV, Jaber BL. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism and severity of acute kidney injury. *Nephron Clin Pract.* 2013;123(1-2):67-73
124. Ivady B, Beres BJ, Szabo D. Recent advances in sepsis research: novel biomarkers and therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2011;27:407-19
125. Kang SS et al. Toll-like receptors: Applications to dermatologic Disease. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 54: 951-83
126. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev.* 2007; 220:251-69
127. Castiblanco J, Varela DC, Castaño-Rodríguez N, et al. TIRAP (MAL) S180L

- polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus. *Infect Genet Evol.* 2008; 8: 541-4
128. Atkinson TJ. Toll-like receptors, transduction-effector pathways, and disease diversity: evidence of an immunobiological paradigm explaining all human illness? *Int Rev Immunol.* 2008; 27: 255-81
 129. Emingil G, Berdeli A, Baylas H, Saygan BH, Gürkan A, Köse T, Atilla G. Toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007;78:1968-77
 130. Clausen LN, Ladelund S, Weis N, Bukh J, Benfield T. Genetic variation in toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene I and outcome of hepatitis C virus infection: a candidate gene association study. *J Viral Hepat.* 2014;21(8):578-84
 131. Laska MJ, Troldborg A, Hansen B, Stengaard-Pedersen K, Junker P, Nexø BA, Voss A. Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(1):48-55
 132. Schroder, N.W.J., and R.R. Schumann. 2005. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet Infectious Diseases* 5: 156–164
 133. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, et al. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 2002; 48: 1661-7
 134. Ouyang L, Lv YD, Hou C, Wu GB, He ZH. Quantitative analysis of the association between interleukin-10 1082A/G polymorphism and susceptibility to sepsis. *Mol Biol Rep.* 2013;40(7):4327-32
 135. Dong GH, Gong JP, Li JZ, Luo YH, Li ZD, Li PZ, He K. Association between gene polymorphisms of IRAK-M and the susceptibility of sepsis. *Inflammation.* 2013; 36(5):1087-93
 136. Davis SM, Clark EA, Nelson LT, Silver RM. The association of innate immune response gene polymorphisms and puerperal group A streptococcal sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* Mar;202(3):308-8
 137. Ben Dhifallah D, Lachheb J, Houman H, Hamzaoui K. Toll-like receptor gene polymorphisms in tunisian population with Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:58-62

138. Holla LI, Vokurka J, Hrdlickova B, Augustin P, Fassmann A. Association of Toll-like receptor 9 haplotypes with chronic periodontitis in Czech population. *J Clin Periodontol*. 2010;37(2):152-9
139. Ji X, Wang Y, Huang G, Zhou W. TLR 3c.1377, TLR 9 (-1486) ve TLR 9 2848 gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010;35(2):116-22
140. Zhenju Song, Jun Yin, Chenling Yao et al. Variants in the Toll-interacting protein gene are associated with susceptibility to sepsis in the Chinese Han population. *Crit Care*, 2011; 15(1):12
141. Piazza O, Pulcrano G, Fiori PL, Tufano R, Lonardo M, Rossano F, Catania MR. Toll-like receptor kinetics in septic shock patients: a preliminary study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25(2):425-33
142. Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, et al. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002;106:2608-2615
143. Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, et al. Toll-like receptor 2 mediates Staphylococcus aureus-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 2004;110:3693-3698
144. Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995;96:1042-1052
145. Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2006;72:384-393
146. Yeo SJ, Yoon JG, Hong SC, Yi AK. CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression. *J Immunol* 2003;170:1052-1061
147. Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1984;100:483-490
148. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis,

- cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990;113:227-24
149. Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rüdiger M, Boehm O, Fink K, et al. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res*. 2008;78(1):26-35
 150. Freund Y, delerme S, Goulet H, Bernard M, Riou B, Hausfater P. Serum lactate and procalcitonin measurements in emergency room for the diagnosis and risk-stratification of patients with suspected infection. *Biomarkers* 2012;17(7):590-6
 151. Mikkelsen ME, Miltiades AN, Gaieski DF, Goyal M, Fuchs BD, Shah CV, Bellamy SL, Christie, Jason D. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Critical Care Medicine* 2009; (37):5, 1670-1677
 152. Hu D, Yang X, Xiang Y, Li H, Yan H, Zhou J, Caudle Y, Zhang X, Yin D. Inhibition of Toll-like receptor 9 attenuates sepsis-induced mortality through suppressing excessive inflammatory response. *Cell Immunol* 2015. 31;295(2):92-98
 153. Ziegler S, Gartner K, Scheuermann U, Zoeller T, Hantzschmann J, Over B, et al. Ca (2+) related signaling events influence TLR-9 induced IL-10 secretion in human B cells. *Eur J Immunol* 2014; 44(5):1285-98
 154. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2 TLR-4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013;309(11):1154-62
 155. Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, de Zeeuw JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, et al. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(5):1050-8

ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 1341

Tarih : 25.09.2013

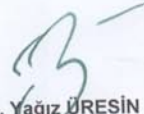
Konu : Doç Dr. H.Arzu ERGEN

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

İlgi :DETAE nın 21/08/2013 gün ve468 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Nazan Atalan'ın yürüteceği 2013/1219 dosya numaralı "Sepsis Hastalığında TLR9 Gen Polimorfizmlerinin Ve Serum Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 20/09/2013 gün ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız 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

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	21/08/2013		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	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
	KARAR BİLGİLERİ	Karar No:16	Tarih: 20/09/2013	
İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalında görevli Doç Dr. H.Arzu ERGEN'in sorumluluğunda ve Yüksek Lisans Öğrencisi Nazan Atalan'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 toplanmaya 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 Resmi 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 ☐	
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.

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	"Sepsis Hastalığında TLR9 Gen Polimorfizmlerinin Ve Serum Düzeyinin İncelenmesi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç Dr. H.Arzu ERGEN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Nöroloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri			
	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 ☒	ULUSLAR ARASI ☐

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nazan	Soyadı	Atalan
Doğ.Yeri	Ankara	Doğ.Tar.	06.05.1967
Uyruğu	TC	TC Kim No	23206288652
Email	drnazan@hotmail.com	Tel	0(532)6869419

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Ün. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD	2015
Doçentlik	Anesteziyoloji Doçenti	2013
Uzmanlık	Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi EA Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği	1998
Lisans	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	1990
Lise	İzmir İnönü Lisesi	1984

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Başasistanı	Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi	2012-
2.	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Uzm Doktor	Acıbadem Aile Hastanesi	2011-2012
3.	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Uzm Doktor	Bahçelievler Medicana Hastanesi	2007-2011
4.	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Uzm Doktor	Marmara Ün Tıp Fak Vakfı Academic Hospital Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği	2003-2007
5.	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Yard Doç Dr	Maltepe Ün Tıp Fak. Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD	2001-2003
6.	Anesteziyoloji ve Reanimasyon Uzm Dr	Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi	1998-2001

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	Diğer Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ	77,5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS OFFICE	İYİ