



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİMDALI**

**ACİL SERVİSE BAŞVURAN SEPSİS VE SEPTİK
ŞOKTAKİ HASTALARDA e NOS (ENDOTELYAL NİTRİK
OKSİTSENTAZ) VE TNF- α (TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR
ALFA) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Mustafa ÖZKAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2017



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİMDALI**

**ACİL SERVİSE BAŞVURAN SEPSİS VE SEPTİK
ŞOKTAKİ HASTALARDA e NOS (ENDOTELYAL NİTRİK
OKSİTSENTAZ) VE TNF- α (TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR
ALFA) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Mustafa ÖZKAN

**Danışman
Prof. Dr. Nurullah GÜNAY**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAYSERİ-2017

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalıştığım sürece, desteğini esirgemeyen, bizleri teşvik edip yönlendiren, bilgi ve deneyimleriyle ufukumuzu açan, acil tıpta bizlere yeni bir bakış açısı kazandıran, eğitimime, uzmanlık tezimin konusunun seçimine ve hazırlanmasına yaptıkları katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurullah GÜNAY' a,

Desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen, eğitimimizde büyük katkısı olan her zaman, ilgi ve anlayışını gördüğüm, değerli hocalarımız Sayın Prof. Dr. Levent AVŞAROĞULLARI ve Sayın Prof. Dr. Polat DURUKAN' a,

Üniversitemiz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görevli tezin her aşamasında yardımını esirgemeyen ve büyük katkıları olan saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Elif Funda ŞENER'e,

Tez verilerinin analiz edilmesinde yaptığı katkılardan, yakın ilgisinden ve engin bilgileri ile bizlere yol gösteren, üniversitemiz Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı başkanı saygıdeğer hocamız Doç. Dr. Ahmet ÖZTURK'e

Varlıkları ile bana güç ve destek veren bu çalışmam ve uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını eksik etmeyen birlikte çalıştığım değerli Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, rotasyonier asistan olarak bulunduğum sürece mesleki eğitimime katkıda bulunan hastanemiz kliniklerine ve birlikte çalışma imkanı bulduğum doktor arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum Acil Kliniği'nin tüm çalışanlarına,

Bana dostluğunu esirgemeyen ve her konuda yardımcı olmaya çalışan canım dostum Uz. Dr. Bahadır TAŞLIDERE'ye

Bana hayatımın her anında yanımda olup destek olan hayatın tüm zorluklarını Atlatmama yardımcı olam akıldanem, sırdaşım sevgilim olan eşim Fatma ya ve de oğlum Mustafa Eymen'e

Sonsuz teşekkürler... Ne mutlu bana sizler varsınız.

Dr. Mustafa ÖZKAN

Nisan 2017, KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. FİZYOpatolojİsİ	2
2.2. NİTRİK OKSİT (NO)	20
2.2. 1. NO'ın Tanımı, Yapısı ve Özellikleri	20
2.2.2. NOS Enzimi ve İzofomları.....	21
2.2.3. Hastalıklar ve NOS.....	21
2.2.4. eNOS Geni.....	22
2.2.5. eNOS Genindeki Polimorfizmler	22
2.2.6. eNOS Gen Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi.....	22
2.2.7. Tümör nekroz faktörü-α promoter polimorfizmleri	23
3. MATERYAL VE METOD	25
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇLAR.....	41
KAYNAKLAR.....	42

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
AA	: Akut apandisit
Ala	: Alanin
ALT	: Alaninaminotransferaz
AS	: Alvarado skoru
Asp	: Aspartat
AST	: Aspartat aminotransferaz
BACTEC	: Becton Dickinson, florometrik sistem
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BUN	: Blood Urea Nitrogen
C	: Sitozin
C5	: Kompleman5
c-GMP	: Guanozin monofosfat
Cl	: Klor
cNOS	: Yapısal NOS
CRP	: C-reaktif protein
CRP	: C-reaktif protein
CRP	: C-reaktif Protein
Cys	: Sistein
dk	: Dakika
dk	: Dakika
dL	: Desi litre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSA	: Dijital Substraksiyon Anjiyografi
EDRF	: Endotel bağımlı gevşetici faktör
EDTA	: Etilenediaminetetraasetik asit
EDTA	: Etilenediaminetetraasetik asit
eNOS	: Endotelyal NOS

G	: Guanin
G	: Guanin
GENKÖK	: Genom ve Kök Hücre Merkezi
GİS	: Gastrointestinal sistem
Glu	: Glutamat
gr	: Gram
HT	: Hipertansiyon
IL	: İntrlökin
INF-g	: İnterferon Gama
iNOS	: İndüklenebilir NOS
K	: Potasyum
KS	: Koroner spazm
LDH	: Laktat dehidrojenaz
LPS	: Lipopolisakkarid
LY	: Lenfosit
MCP-1	: Makrofaj Kemoatraktan Protein-1
Mg	: Magnezyum
Mİ	: Miyokard enfarktüsü
ml	: Mililitre
mmHg	: Milimetre civa
MMP	: Matrix metalloproteinaz
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: Mesenger Ribonükleik asit
N02	: Nitrit
Na	: Sodyum
NADPH	: Nikotinamid dinükleotid fosfat
NADPH	: Nikotinamid dinükleotid fosfat
NE	: Nötrofil
NLR	: Nötrofil lenfosit oranı

NLR	: Nötrofil lenfosit oranı
NO	: Nitrik oksid
NO3	: Nitrat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PKT	: Prokalsitonin
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SIRS	: Sistemik inflamasyon yanıtı sendromu
İİYS	: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
SO4	: Fosfat
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SVH	: Serebrovasküler hastalıklar
T	: Timin
TLR	: Toll Like Receptor
TNF-a	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
USG	: Ultrasonografi
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
µL	: Mikrolitre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	<i>eNOS</i> İtron 4 Polimorfizmi için PCR Protokolü	28
Tablo 2.	PCR programı	28
Tablo 3.	Genotipler	29
Tablo 4.	G894T Polimorfizmi için PCR Protokolü	29
Tablo 5.	Polimorfizmi için PCR Protokolü.....	29
Tablo 6.	<i>NOS3</i> -786 T>C Polimorfizmi için PCR Protokolü	30
Tablo 7.	<i>eNOS</i> G894T Polimorfizmi için RFLP Analizi	30
Tablo 8.	<i>eNOS</i> -786 T>C Polimorfizmi için RFLP Analizi	32
Tablo 9.	Sepsis tanısı konan çalışma grubu vakaların bazı laboratuvar ve klinik parametreleri.....	35
Tablo 10.	Sepsisli çalışma grubundaki hastaların tanıları.....	35
Tablo 11.	Cinsiyete göre dağılım.....	36
Tablo 12.	<i>eNOS</i> G894T polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı	36
Tablo 13.	<i>eNOS</i> 786TC polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı	37
Tablo 14.	<i>eNOS</i> INT4 polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı	37
Tablo 15.	<i>TNF-α</i> 308G>A polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı.....	37
Tablo 16.	Kontrol ve çalışma grubu ile cinsiyet ve gen analizleri arasındaki ilişkilerin analizi	38

**ACİL SERVİSE BAŞVURAN SEPSİS VE SEPTİK ŞOKTAKİ HASTALARDA
eNOS (ENDOTELYAL NİTRİK OKSİTSENTEZ) VE TNF- α (TÜMÖR
NEKROZ FAKTÖR ALFA) GEN POLİMORFİZMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada amaç, acil serviste sepsis ve septik şok tanısı konan hastalarda *eNOS* ve *TNF α* polimorfizmlerinin ilişkisi olup olmadığını araştırmaktır.

Hastalar ve Yöntem: İleriye dönük özellikteki bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalında 1 Haziran 2015 ve 1 Haziran 2016 tarihleri arasında yapılmıştır. Ve acil serviste sepsis tanısı konmuş 189 hasta ve 188 hasta olmayan toplam 377 birey incelemeye alınmıştır. Çalışmanın laboratuvar kısmı Erciyes Üniversitesi GENKÖK araştırma merkezinde yapılmıştır. İlgili laboratuvarında *eNOS* geninin G894T, -786 T>C ve intron 4 ve *TNF- α* geni 308G>A polimorfizmi incelenmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı ve çıkarımsal istatistikler kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki kare testinden yararlanılmıştır. Veriler SPSS IBM statistics 22 istatistik paket programında değerlendirilmiştir.

Bulgular: Genotiplerden *eNOS* G894T (p=0.002) geni sepsiste anlamlı *eNOS* 786TC (p=0.001) geni sepsiste anlamlı ve *TNF- α* 308G>A (p<0.001) geni sepsiste anlamlı bir ilişki bulunmuş, fakat *eNOS* intron 4 (p=0.913) geni ile sepsis arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Sonuç: *eNOS* G894T, *eNOS* 786TC ve *TNF- α* 308G>A polimorfizmleri ile sepsis arasında anlamlı bir ilişki olduğu ancak *eNOS* intron 4 polimorfizmi ile anlamlı bir ilişki olmadığı ortaya çıkmıştır. Ancak, böyle bir ilişkinin kesinlikle olduğunu iddia etmek bilimsel bir yaklaşım olmayabilecektir. Ancak bu konuda anlamlı bir ilişkinin varlığını ortaya koyabilmek için daha fazla sayıda çalışma ve kontrol grubu bireylerinin yer alacağı yeni çalışmalara ihtiyaçlar vardır. Diğer bir ifadeyle elde edilen bu veriler potansiyel anlamda önem taşımaktadır ve yapılacak daha geniş çalışmalar ile bu konu hakkında daha detaylı bilgiler elde edilebilecektir.

Sonuç olarak ana bulgu sepsis ile *eNOS* ve *TNF- α* genleri arasında ilişki bulunmuştur. Ancak, tanı/proflaksi/tedavi noktasında bir açılım olabileceği düşüncesi ile bu konunun daha geniş seriler ile araştırılmaya muhtaç olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, Gen Poliformizimi, e-NOS, TNFa



EVALUATION OF eNOS AND TNF-ALFA GENE POLYMORFISM IN SEPSIS AND SEPTIC SHOCK PATIENTS IN EMERGENCY SERVICE

ABSTRACT

Objective: In this trial, we aimed to search if there is a relationship between eNOS and TNF-alfa gene polymorphisms and sepsis/septic shock diagnosed in emergency service.

Patients and Method: This prospective study was accomplished in Erciyes University Medicine Faculty Emergency Service between 1 July 2015 and 1 July 2016. 189 patients diagnosed sepsis in emergency service and 188 healthy subjects were enrolled. Laboratory part of the trial was carried out in Erciyes University GENKÖK Research Center. G894T, -786 T>C and intron 4 polymorphisms of eNOS gene and 308G>A polymorphism of TNF-alfa gene were examined. Inferential and descriptive statistics were used in data evaluation. The comparison of categorical variants was done with chi square test. Data was evaluated with SPSS IBM statistics program.

Findings: eNOS G894T ($p=0.002$), eNOS 786T>C ($p=0.001$) and TNF-alfa 308G>A ($p<0.001$) genotypes were found significantly related to sepsis, but we could not establish a significant relationship between eNOS intron 4 gene and sepsis ($p=0.913$).

Conclusion: We revealed that there is a significant relationship between sepsis and eNOS G894T, eNOS 786T>C and TNF-alfa 308G>A gene polymorphisms but there is no relationship with eNOS intron 4 gene. Although, to claim this relationship as certain may not be a scientific approach. To set a significant relationship in this subject more trial with much more patients and kontrol group volunteers needed. In other words the findings of this study has potential importance and new trials will expand our knowledge about this clinical entity.

After all, we found a relationship between sepsis and eNOS and TNF-alfa. Although, in the aspect of diagnose/proflaxi/treatment more trials with large number of subjects are needed.

Keywords: Sepsis, gene polymorphism, e-NOS, TNFa

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sepsis terimi, Yunanca çürüme anlamında olan sözcükten türetilmiştir. Günümüzde sepsis, mikroorganizmaların ve toksinlerinin kan akımının içine girmesi ve genel inflamasyonun konak yanıtı ile birarada olması, şeklinde nitelenir. Tablo ilerlediğinde çoklu organ yetmezliği gelişmekte ve ölüm ile sonuçlanabilmektedir (1).

Laktat yüksekliği, azalmış uç organ perfüzyonu ve anaerobik glikoliz sonucu oluşur. İnflamasyon ile katekolamin seviyelerinin artması da laktat seviyesini artırır. Laktat yüksekliğinin sepsisten şüphe edilen ve acil servise başvuran hastalarda sepsis ve septik şokun bir göstergesi olarak düşünülebileceği kabul edilmektedir. Hastalığın ciddiyetini ölçmekte kullanılır.

Çalışmamızın amacı; sepsisli hastalarda NOS3G894T, NOS3786TC, NOS3INT4, TNF308GA genlerinin polimorfizmini tespit ederek literatüre katkıda bulunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

ACCP/SCCM konsensus konferansında sepsis, infeksiyonun yarattığı sistemik inflamasyon yanıtı sendromu (*SIRS*) olarak tanımlanmıştır. Sepsis, homeostatik denge ile endotel disfonksiyonu kaybına neden olurken peşinden de kardiyosirkülatuar sistemin fonksiyonlarını ve aynı zamanda da hücreiçi homeostazisi bozar. Organ disfonksiyonunun ve ölümün nedeni hücre hipoksisi ve apoptozis olmaktadır(1)(13).

2.1. FİZYOPATOLOJİSİ

İnfeksiyon odağından, dolaşıma karışan mikroorganizma ya da ürünleri bakteriyemi oluşturur. Fakat bu maddelerin dolaşımda bulunması sepsisi oluşturmak için yeterli bir sebep değildir. Esas önemli olan enfekte konağın immün cevabıdır. Bu cevap organizmadaki hedef hücrelerden endojen mediatör salınmasıyla oluşur. Normal koşullarda bu maddeler organizmanın koruyucusu iken, sepsiste organizmaya zarar verir(26).

Endotoksin gram-negatif bakterinin dış hücre duvarında lipopolisakkarid molekülünün lipid A fraksiyonu olup, gram-negatif sepsisin üzerinde en çalışılan ekzojen mediatörüdür. Konağın infeksiyona karşı inflamatuvar yanıtı olan sepsis, endojen mediatörlerin neden olduğu bir dizi klinik, hematolojik, inflamatuvar ve metabolik kaskattan meydana gelir(35,38). Bakteriyel yapılara karşı gelişen hücresel yanıt, normal şartlar altında infeksiyona karşı savunma sağlar. Bu sırada salınan mediatörlerin biyolojik aktivitesi, özgül inhibitörlerin sıkı kontrolü altındadır. Sepsiste farklı mediatörlerin yapımında çok büyük değişiklikler olur. Hücresel reaksiyonların ileri

derecede aktifleşmesine bağlı olarak denge bozulur. Bu nedenle sepsis patogenezi pro ve antiinflamatuvar dengesizlik sendromu olarak tanımlanmaktadır(39).

Gram-negatif hücre duvar komponentlerinden endotoksinler, sepsisi tetikleyen moleküllerin başında gelir. Lipopolisakkarid (LPS) yapıdaki endotoksinin patogenezdaki rolü uzun yıllardır bilinmektedir. Gram-negatif bakteri hücre duvarının en dışında bulunan LPS tabakası lipid-A, kor polisakkaridi ve O-antijeninden oluşmuştur. Doymuş yağ asitlerinden meydana gelen lipid-A, gram-negatif bakterilerde ateş, ishal, şok gibi bulgulara neden olan endotoksin aktivitesine sahip olan tabakadır (27,31,40). Endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktiftir, ancak hızlı hücre büyümesi veya hücre yıkımı sırasında ortaya çıkınca bir dizi olayı başlatır(28). Polisakkarid yapı lipid-A'ya kovalent bağlanır(27). Lipid-A, Enterobacteriaceae ailesinde yüksek miktarlarda bulunurken, Pseudomonaceae ailesinde daha az miktarlarda bulunur. Lipid-A, LPS'nin anahtar toksik parçasıdır. Pürifiye lipid-A, deneysel çalışmalarda hayvanlara enjekte edildiğinde letal şoka yol açmaktadır(41).

Makrofaj ve nötrofillerden sitokin salınımı, kompleman kaskadının aktivasyonu, nötrofil ve endotelial hücrelerde adeziv kapasitenin artması lipid-A ve LPS tarafından tetiklenen proinflamatuvar olaylardır. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere bağlı sepsiste proinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonu, salınımı ve bunun sonucu olarak da ortaya çıkan klinik farklıdır. Bu gözlemler her patojene karşı verilen bağışık yanıtın, farklı molekül ve reseptörlerle gerçekleştiğini düşündürmektedir(42,43). Gönüllülerde küçük miktarlarda endotoksin verilmesi; ateşe ve tümör nekroz faktörü (TNF)-a, IL-1, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmuştur. LPS'nin biyolojik aktivitesi, bir glikoprotein olan LPS bağlayıcı protein (LBP) aracılığıyla gerçekleşir. LBP, başlıca karaciğerde sentezlenen bir akut faz proteinidir. Bu proteini üretmeyen deney hayvanlarının, LPS'ye duyarlı olmadığı gösterilmiştir(39).

CD14 hücre dışı alanda bulunur ve bu nedenle transmembran sinyal iletilici koreseptörü olmadan hücrel aktivasyonu tetikleyemez. Son yıllardaki araştırmalar, "Toll Like Receptor (TLR)" 2-4'ün, CD14'ün koreseptörü olduğunu ortaya koymuştur(43).

Reseptör bağlanmasını takiben ikinci-mesajcı yolların [nükleer faktör kappa beta (NFkB), protein kinaz C ve tirozin kinazlar] hızlı bir şekilde aktivasyonu ile çok sayıda genin aktivasyonu olmaktadır. LBP ile yakından ilişkili olan bir protein

bakterisidal/permeabilite artıran protein, nötrofil sekonder granüllerinde depolanır. LPS salınımıyla nötrofil aktivasyonu olduğunda, bakterisidal/permeabilite artıran protein hem dışarı salınır hem de nötrofil hücre yüzeyinde eksprese olur. Bakterisidal/permeabilite artıran protein, LPS'ye LBP'den daha yüksek afinite ile bağlanır ve LPS'yi nötralize eder(27,38).

Ateş ve inflamasyon, LPS'nin bir parçası olan lipid-A'ya karşı sitokinler tarafından oluşturulmaktadır. Bazı sitokinler[TNF-a, IL-1, interferon-gama (IFN-g), çeşitli koloni stimüle eden faktörler gibi] konak makrofaj ve monosit hücrelerinin LPS ile temasından dakikalar, saatler içinde üretilir. IL-1, klasik olarak endojen pirojen olarak adlandırılır ve bazı hayvanlarda şoka neden olabilir(26). IL-1a ve IL-1b, çeşitli hücre tiplerini aktive ederek proinflamatuvar olaylara neden olur. IL-1 ve TNF-a, inflamatuvar sepsis kaskadında beraber hareket eder ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin (IL-12, IL-18) ekspresyonunda artışa yol açar(27). Bakteremi ve endotoksinemi modellerinde TNF konsantrasyonu 60-90. dakikalarda en yüksek değerine ulaşır, bunu 180. dakikada IL-1'in en yüksek değeri izler(16). IL-1 ve TNF-a gibi sitokinler düşük dozlarda konak savunmasına yardımcı olurken, yüksek konsantrasyonlarda (örneğin; konağın masif invazyonuna yanıt olarak) öldürücü olabilir^[1,6]. Bilinen tüm sitokinler içerisinde gram-negatif sepsis patogenezinde en etkili mediatör TNF-a gibi görünmektedir. TNF-a salınımına LPS dışında stafilokokal ekzotoksinler, mikobakteriyel glikolipidler, maya hücre duvarındaki mannan da sebep olur(26).

Proinflamatuvar rol üstlenen diğer sitokinler arasında, IL-8 ve makrofaj kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi kemokinler vardır. Bu kemokinler, endotel ve diğer hücrelerden salgılanır. IL-8; nötrofil için kemoatraktandır, bu hücreleri aktive eder, degranülasyona ve doku hasarına neden olur. IL-1 ve IL-6, endotel hücresi ve lökosit adezyonunu TNF-a indükler. Proteaz ve araşidonik asit metabolitlerinin salınımına neden olur ve pıhtılaşma kaskadını aktive eder. Araşidonik asit metabolitleri (tromboksan A₂, prostasiklin, prostaglandin E₂ gibi); ateş, taşikardi, takipne, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu, laktik asidoz gibi SIRS'ın pek çok klinik belirti ve bulgularından sorumludur(37).

IL-4, IL-10, IL-13 ve IFN-g çok yönlü fonksiyon görür. IFN-g, sitotoksik T lenfositleri aktive eder, TNF aktivitesini artırarak proinflamatuvar görev de yapar. Her ne kadar IL-

4, IL-10 ve IL-13, B lenfositlerin aktivatörü olsa da aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerin süpresörü ve bu nedenle de etkin antiinflamatuvar ajanlardır(39).

Kompleman protein C5'ten oluşan ve bir anafilatoksin olan C5a'nın da proinflamatuvar özellikleri vardır. C5a, nötrofillerin kemotaktik yanıtında artış, fagositik hücrelerden granüler enzim salınımı, nötrofillerde süperoksit anyon yapımı, vazodilatasyon, artmış vasküler geçirgenlik ve timosit apoptozunun indüksiyonunu sağlar. Sepsisli hastalarda yüksek C5a düzeyinin organ yetmezliğine neden olduğu ve yaşam süresini ileri derecede kısalttığı bildirilmiştir(42).

Sepsis, pıhtılaşma faktörlerinin kullanımı koagülasyon ve antikoagülasyon arasındaki dengenin bozulmasına da neden olur. Bu süreç fibrinolizisin önce aktivasyonu, sonra inhibisyonuyla birliktedir. Tromboz, prokoagülan ve antikoagülan güçler arasındaki dengesizliğin sonucudur. Pıhtılaşma mekanizması, ekstrinsek ve intrinsek yolla başlatılır. Sepsiste ekstrinsek yol, intrinsek yoldan daha fazla önem taşır. Fibrin yıkım ürünü olan D-dimer, sepsis sırasında pıhtılaşma sisteminin aktive olduğunu gösteren en önemli moleküldür. Ekstrinsek koagülasyon yolu, hasarlı dokudan salınan doku faktörü tromboplastin ile aktive olur. Dolaşımdaki kanın doku faktörüne maruz kalması, pıhtılaşma aktivasyonunu tetikleyerek trombin oluşumuna ve fibrin birikimine neden olur. İntrinsek koagülasyon yolu, kan içeriğinin trombosit kümesine veya subendotelyal yüzeye temas etmesiyle aktive olur. Daha sonra her iki yolla da aktive olan faktör 10, protrombini trombine çevirir. Mikrovasküler geçirgenlikte değişiklik, önemli prognostik faktörler olan dissemine intravasküler koagülasyon ve multiorgan yetmezliği ile birliktedir(26,42).

Sepsis sırasında antitrombin 3, aktive protein C (APC) ve doku faktörü yolu inhibitörlerinin azaldığı gösterilmiştir(42). APC, sepsiste mikrotrombüslerin oluşumunu etkin olarak inhibe ederek, vasküler hasar bölgesinde oluşan fibrin depolanmasının sınırlanmasını sağlar. APC eksikliğinde ise mikrotrombüsler küçük damarlar içinde birikerek hipoperfüzyon ve organ hasarına neden olur. Mortalite ile protein C aktivasyonu arasında ters ilişki olduğu gösterilmiştir(37).

Sepsisin seyri ve sonucu çok büyük bireysel değişiklik gösterir. Bazı genlerin polimorfizminin sepsis duyarlılığı ve gelişimini etkilediği düşünülmektedir. Sepsis sırasında üretilen TNF-a miktarı genetik olarak belirlenir ve bu fenomenden “Ncol”

polimorfizminin sorumlu olduğu bulunmuştur. Kadınlarda sepsisin erkeklere göre daha iyi seyir gösterdiği ve bu yanıt farklılığından seks steroidlerinin sorumlu olabileceğine dair veriler elde edilmiştir(42).

Sepsis fizyopatolojisinde aydınlatılan her basamak ile tedavideki başarının artacağı ve mortalitenin azalacağı düşünülmektedir.

Sepsis, enfeksiyona karşı gelişen sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SİYS) olarak tanımlanabilir. Çok sayıda enfeksiyon sepsis nedeni olabilirse de solunum sistemi enfeksiyonları, karın içi odak ve dolaşım sistemi enfeksiyonları en sık rastlanan enfeksiyon odaklarıdır. Özellikle hastane kaynaklı sepsis olgularında kateter kaynaklı enfeksiyonlar en sık rastlanan enfeksiyonlar olarak öne çıkmaktadır. Sepsis genelde yüksek mortaliteye sahip, genelde tanı konulamayan bir klinik süreçtir. Genel hatlarıyla bakıldığında sepsisin son derece silik bulgularla seyredebileceği vurgulanmakta, hastanelerde her türlü klinik bozuklukta sepsisin hatırlanması ve aktif bir tedavi uygulaması başlanması önerildiği görülmektedir. Sepsis tanımlarının çeşitli sorunları nedeniyle ileride kullanıma girebilecek başka tanımlama sistemleri de ortaya atılmıştır. PIRO (P:predisposition, I:infection, R:response, O:organ dysfunction) bir evrelendirme sistemi olarak sepsisi tanımlayan ve klinik kullanımı için zaman gereken bir öneri sistemidir(26,27). Bu süreçte tanı ve tedavi başarılarını daha uygun seviyelere çekmek için çok sayıda girişimde bulunulmuş ve “Surviving Sepsis Campaign” rehberi oluşturulmuştur⁵. Bu rehberin temel bakış açısı hastayı hızla değerlendirme sonrasında aktif bir sıvı dengesi sağlanması ve sonrasında mutlaka mikrobiyolojik tanı girişimlerinde bulunmak ve antibiyoterapi başlamaktır.

Daha önceleri sepsis tanısında enfeksiyonun mikrobiyolojik olarak kanıtlanması hatta bakteriyemi şart koşulurken günümüzde sepsis tanısı için mikrobiyolojik kanıt gerekli değildir⁶. Anlaşılmıştır ki mikrobiyolojik bulgular, klinik bulgularla eş zamanlı olarak ortaya çıkmamakta, mikrobiyolojik bulgular ile tedaviye başlamak önemli zaman kaybına neden olmakta ve çeşitli nedenlerle çok sayıda enfeksiyonda mikrobiyolojik kanıt ulaşılamamaktadır. Fakat gene de sepsis hastalarında mikrobiyolojik tanı birçok yönden önem taşımaktadır ve vazgeçilmezdir. Öncelikle erken başlanan uygun antibiyotik tedavisi hastalığın seyrini olumlu etkileyen en temel kriterlerden birisidir. Daha sonra etkenlerin saptanması lokal epidemiyolojik bilgilerin ortaya konulmasında,

infeksiyon kontrol önlemlerinin oluşturulmasında, ampirik tedavilerin uygun seçiminde çok önemli katkı sağlamaktadır. Ayrıca son yıllarda çok daha iyi anlaşıldığı üzere sepsis süreci dinamik bir süreçtir ve hastalık sürecinde etkenler değişebilmekte, tabloya yol açan yeni etkenler ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca etkenleri bilmek daha farklı tedavi olanaklarını kullanabilmeye (antiendotoksin tedavi gibi) imkan da sağlayabilecektir.

Sepsis ayırıcı tanısında kullanılan testler:

Sepsis tanımı oldukça karmaşıktır. Pankreatit, politravmalar, yanık, pulmoner emboli, miyokard infarktı, venöz tromboz, tiroid krizi, akut adrenal yetmezlik, organ reddi, kan ürünleri ile tedavi, sitokin uygulamaları, malign hipertermi, tümör lizis sendrom, subaraknoid kanama sepsis ile karışabilecek tabloların başlıcalarıdır. İşte bu durumda bazı klinik ve laboratuvar bulguları ile sepsis tanısı konulabilmesi ya da sepsis tanısının desteklenebilmesi çok üzerinde durulan bir konudur. Nötrofil yanıtının ayırıcı işe yaramadığı fakat prognoz yönünden faydalı olabileceği bulunmuştur. Nötrofil yanıtını belirlerken sadece sayım işe yaramamakta dağılım ve periferik yayma ile sola kayma bulgusu aramak önerilmelidir. Sitokinlerin (özellikle IL-1, IL-6, TNF-alfa, IL-8) ve bunlarla ilişkili reseptörlerin artışı ile sepsis arasında ilişki tam olarak kurulamamış ve bu sitokinlerin sepsis dışı birçok hastalıkta ciddi olarak artış gösterdiği belirlenmiştir(32,33). Meningokoksemi gibi bazı sepsis formlarında TNF-alfa düzeyleri yüksek ve mortalite ile ilişkili bulunmasına⁹ karşın sitokin yanıtının dalgalanan bir süreci olduğu ve bazı sepsis formlarında ölçülemeyecek seviyelerde sitokin yanıtı olduğu gözlenmiştir(10). C-reaktif protein (CRP) ve prokalsitonin seviyeleri bu amaçla en çok denenen maddeler olmuştur.

CRP, başlıca karaciğerde sentezlenen, özellikle IL-6, IL-1B ve TNF-alfa uyarısıyla yapılan, özellikle bakteri eradikasyonunda çok önemli işlev gören bir akut faz proteinidir. Uyarı sonrası ortalama 4-6 saat sonra salgılanması başlar ve pik değerine 36-50 saatte ulaşır. Travma, cerrahi girişim gibi tek bir uyarı sonrası yükselen CRP günler sonra normal seviyelerine iner. Sepsis tanısında CRP kullanımını sorgulayan çalışmalarda sınır değer olarak 50-100 mg/L üzeri değerler kullanılmış fakat kesin bir sınır-değer tanımlanmamıştır. Sepsis tanısında duyarlılık %68-98.5 arasında, özgüllük %40-78 arasında bulunmuş, tek bir ölçümle sepsis tanısı konmasında güvenilir bir parametre olmadığı ve sepsis prognozu konusunda da yeterli bilgi vermediği sonucuna

varılmıştır. Geç dönemde gerçekleşen artışı nedeniyle sepsis gibi çok dinamik bir süreçte faydalı olmayacağı, sepsis dışı bir çok nedende yükselebilmesi (travma, yanık, cerrahi, enfarktüs,...) nedeniyle özellikle YBÜ hastalarında çok faydalı bir sepsis tanı testi olarak kullanılamayacağı sonucuna ulaşılmıştır(36,37).

Prokalsitonin (PKT), normalde tiroid C hücrelerinden salgılanan kalsitoninin propeptididir. Normalde plazmada 5-50 pg/ml gibi çok düşük miktarlarda bulunur. Bakteriyel lipopolisakkarid uyarısı ile mononükleer hücrelerden ve TNF-alfa, IL-6 uyarısı ile karaciğer hücrelerinden sentezlendiği sanılmaktadır. Uyarıdan 3-4 saat sonra artış başlar ve pik değere yaklaşık 6 saatte ulaşır. Yarılanma ömrü, 25-30 saattir. Böbrek yetmezliğinde bu süre %30 kadar uzamaktadır. Viral infeksiyonlar, inflamatuvar olaylar ve lokalize bakteriyel infeksiyonlar hafif artışa yol açarken sistemik bakteriyel infeksiyonda miktarında ciddi artış olduğu saptanmıştır. Sepsis için tanı koydurucu sınır değer tam olarak oluşturulamamıştır. Hasta grupları ve sınır değer farklılıklarından dolayı yapılan çalışmalarda sepsis tanısında PKT duyarlılığı %65-97 özgüllüğü %48-94 arasında bulunmuştur(36,37). PKT>2 ng/ml üzeri değerlerinin ağır sepsis, >11.6 ng/ml değerlerin septik şok tanımında faydalı olabileceği belirtilmiştir(38). Yoğun bakımda, yenidoğan sepsisinde özellikle başarılı olduğu düşünülmektedir(39). Diğer bir avantajı hasta başında semikantitatif olarak PKT ölçümünü sağlayan testlerin kullanımda bulunmasıdır.

Birçok çalışmada CRP ve PKT kıyaslandığında genelde PKT sepsis tanısı ve infeksiyon kaynaklı olmayan SIRS ile sepsis ayırımında daha başarılı bulunsada bu konu tartışmalıdır. Sepsisin ağırlığı ve prognozu göstermek açısından PKT daha başarılı bir parametre olarak tanımlanmıştır. Simon ve arkadaşları(40) yaptıkları metaanaliz sonucunda hastaneye yatırılan hastalarda bakteriyel infeksiyonların tanısında PKT seviyesi ölçümünü CRP ölçümüne kıyasla daha başarılı olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Endotoksin, gram negatif bakteri hücre duvarındaki lipopolisakkarid (LPS) yapısındaki hücre duvar komponentidir ve mononükleer hücrelerin uyarısı ile sepsis oluşumunda temel uyaran olarak belirlenmiştir. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin de endotoksin salınımını uyardıkları saptanmıştır(41). Limulus lizat testi ile endotoksin ölçümü gram negatif bakteriyemi ve sepsislerde denenmiş tanısal değerinin düşük olduğu gösterilmiştir(42).

Neopterin, monosit-makrofaj sistemi uyarısını gösteren bir göstergedir. Viral infeksiyonların gösterilmesinde, HIV infeksiyonunun ilerleyişinde ayrıca malignitelerde (özellikle multiple miyelom), aktivasyon göstergesi olarak, kalp yetmezliği, organ-reddi, koroner arter hastalığında faydalı bir test olarak saptanmış ve sepsis olgularında prognoz yönünden fikir verici olabileceği belirtilmiştir(43).

Sepsis tanısı ya da sepsisin öngörülmesi konusunda yeni bir kavram olan PIRO evrelendirmesinde P: Predisposition (yatkınlık) kavramı burada ele alınabilir. Yatkınlık, altta yatan faktörler (alkol kullanımı, ateroskleroz,...) yanında genetik faktörlerle de ilişkili bulunmuş ve bazı genetik özelliklerin (Toll-like reseptör genleri gibi) sepsise yatkınlık yönünden araştırılması gündeme gelmiştir(44,45).

Sonuç olarak sepsis tanısı için uygun, standartize edilmiş bir tanı metodu bulunmamaktadır. Sepsisin tek bir hastalık olmaması, kompleks birçok tablonun sepsis olarak ortaya çıkabilmesi tek ve mükemmel bir tanı testini de imkansız kılmaktadır. Bugün bu testlerden birkaçını kullanarak sepsis tanısına gidebilmek önerilmekte, fakat bu yaklaşımın getirdiği maddi yük önemli bir sorun haline gelmektedir. Bizim de önerdiğimiz ve kullandığımız yaklaşım; klinik bulgular ve hastalara ait bazal CRP ölçümleri tanımlandıktan sonra (örneğin sadece yanık ya da sadece cerrahi girişimin CRP üzerine etkisi ortaya konulup) günlük kantitatif CRP ölçümleri ile hastaları izlemektir. CRP artış eğiliminin infeksiyonlar hafif artışa yol açarken sistemik bakteriyel infeksiyonda miktarında ciddi artış olduğu saptanmıştır. Sepsis için tanı koydurucu sınır değer tam olarak oluşturulamamıştır. Hasta grupları ve sınır değer farklılıklarından dolayı yapılan çalışmalarda sepsis tanısında PKT duyarlılığı %65-97 özgüllüğü %48-94 arasında bulunmuştur(36,37). PKT>2 ng/ml üzeri değerlerinin ağır sepsis, >11.6 ng/ml değerlerin septik şok tanımında faydalı olabileceği belirtilmiştir. Yoğun bakımda, yenidoğan sepsisinde özellikle başarılı olduğu düşünülmektedir(39). Diğer bir avantajı hasta başında semikantitatif olarak PKT ölçümünü sağlayan testlerin kullanımda bulunmasıdır.

Birçok çalışmada CRP ve PKT kıyaslandığında genelde PKT sepsis tanısı ve infeksiyon kaynaklı olmayan SIRS ile sepsis ayırımında daha başarılı bulunsa da bu konu tartışmalıdır. Sepsisin ağırlığı ve prognozu göstermek açısından PKT daha başarılı bir parametre olarak tanımlanmıştır. Simon ve arkadaşları(40)yaptıkları metaanaliz

sonucunda hastaneye yatırılan hastalarda bakteriyel infeksiyonların tanısında PKT seviyesi ölçümünü CRP ölçümüne kıyasla daha başarılı olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Endotoksin, gram negatif bakteri hücre duvarındaki lipopolisakkarid (LPS) yapısındaki hücre duvar komponentidir ve mononükleer hücrelerin uyarısı ile sepsis oluşumunda temel uyaran olarak belirlenmiştir. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin de endotoksin salınımını uyardıkları saptanmıştır(41). Limulus lizat testi ile endotoksin ölçümü gram negatif bakteriyemi ve sepsislerde denenmiş tanısal değerinin düşük olduğu gösterilmiştir(42).

Neopterin, monosit-makrofaj sistemi uyarısını gösteren bir göstergedir. Viral infeksiyonların gösterilmesinde, HIV infeksiyonunun ilerleyişinde ayrıca malignitelerde (özellikle multiple miyelom), aktivasyon göstergesi olarak, kalp yetmezliği, organ-reddi, koroner arter hastalığında faydalı bir test olarak saptanmış ve sepsis olgularında prognoz yönünden fikir verici olabileceği belirtilmiştir(43).

Sepsis tanısı ya da sepsisin öngörülmesi konusunda yeni bir kavram olan PIRO evrelendirmesinde P: Predisposition (yatkınlık) kavramı burada ele alınabilir. Yatkınlık, altta yatan faktörler (alkol kullanımı, ateroskleroz,...) yanında genetik faktörlerle de ilişkili bulunmuş ve bazı genetik özelliklerin (Toll-like reseptör genleri gibi) sepsise yatkınlık yönünden araştırılması gündeme gelmiştir(44,45).

Sonuç olarak sepsis tanısı için uygun, standartize edilmiş bir tanı metodu bulunmamaktadır. Sepsisin tek bir hastalık olmaması, kompleks birçok tablonun sepsis olarak ortaya çıkabilmesi tek ve mükemmel bir tanı testini de imkansız kılmaktadır. Bugün bu testlerden birkaçını kullanarak sepsis tanısına gidebilmek önerilmekte, fakat bu yaklaşımın getirdiği maddi yük önemli bir sorun haline gelmektedir. Bizim de önerdiğimiz ve kullandığımız yaklaşım; klinik bulgular ve hastalara ait bazal CRP ölçümleri tanımlandıktan sonra (örneğin sadece yanık ya da sadece cerrahi girişimin CRP üzerine etkisi ortaya konulup) günlük kantitatif CRP ölçümleri ile hastaları izlemektir. CRP artış eğiliminin sepsislerde ise asıl belirleyici etmen o hastanenin hatta o birimin florasıdır. Son yıllarda koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS), Candida cinsi mayalar ve enterokoklara bağlı sepsis olgularında belirgin artışlar saptanmaktadır. Ayrıca hastanede gelişen sepsisler oransal olarak da artmaktadır. Bunun en önemli

nedeni hasta sayısında ve invaziv girişimlerdeki, teknolojik olanaklardaki ve tedavi uygulamalarındaki artıştır(43,51).

Splenektomize bir hastada ilk akla gelecek sepsis etkenleri *Haemophilus influenzae*, pnömokok, meningokok, *Capnocytophaga* ve *Babesia* olmalıdır. Batın içi odak varlığında mikst infeksiyon (aeroplara ve anaeroplara) hatırlanmalı *Bacteroides fragilis* olasılığı mutlaka hatırlanmalıdır. İmmüsuprese konakta özellikle nötropeni varlığında *Pseudomonas aeruginosa* akla gelmeli fakat çok geniş bir yelpazenin etken olabileceği de hatırlanmalıdır. Tamamen sağlıklı birinde ani başlayan sepsis tablosunda öncelikle pnömokok ve meningokok olasılığı akla gelmelidir. Virüsler arasında CMV sepsisten sorumlu tutulmuş, sepsis olgularında belirgin artışı saptanmış fakat ilişki tam olarak ortaya konamamıştır. *Candida* cinsi mantarlar giderek daha çok sepsis etkeni olarak saptanırken intravenöz lipid solüsyonları ile beslenen hastalarda *Malessezia furfur* sepsis etkeni olarak ortaya çıkabilir. Yanık hastalarında *Fusarium* cinsi mantarlar da sepsis oluşturabilirler. Parazitler içinde *Plasmodium falciparum*'un etken olduğu sıtma olgularında sepsis kliniği belirlenmiştir(51).

Özellikle deride saptanabilecek bazı bulgular etkenin belirlenmesinde önemli olabilir. Meningokokseminde makül, peteşi, purpuralar, gonokokseminde ellerde peteşi, püstül ve papüller ile poliartrit, *S. aureus* infeksiyonlarında septik emboliler, *P. aeruginosa* sepsislerinde ektima gangrenosum izlenebilir. Özellikle immüsupresif konakta *Candida*, *Trichosporon* sepsislerinde deride kırmızı-pembe nodüller, fırsatçı küf sepsislerinde (*Fusarium*, *Aspergillus*,...) nekrotik odaklar izlenebilir(52). Sepsis şüphesi olan her hastada kan kültürü alınmalıdır. Kan kültürü ateş ve titreme döneminde mümkün olduğunca çabuk ve mutlaka antibiyoterapi öncesinde alınmalıdır. En az iki şişe alınması önemlidir. Kateter varlığında kateter ve periferden eş zamanlı olarak alınarak laboratuvara gönderilmeli ve alınış yerleri şişelerde belirtilmelidir. Kateter yok ise 15-30 dakika arayla alınan iki kan kültürü ya da aynı anda farklı venlerden alınan kan kültürü kullanılabilir ve simültane kan kültürü tercih edilmelidir. En az 2 - 4 şişe alınması gerekli iken özellikle endokardit olasılığı ya da nadir patojenler düşünülüyorsa 6-8 şişe alınması önerilir. Rutin olarak daha fazla kan kültürü alınması sağlık çalışanları için artan yaralanma riski, maliyet ve hatta nozokomiyal anemi nedeni olabilirken ciddi bir fayda sağlamadığı için önerilmez. Anaerobik infeksiyon düşünülen durumlar varlığında anaerobik kan kültürü şişesi kullanılabilirse de rutin uygulamada anaerob

kültür alınması önerilmez. Bazı kaynaklar aynı anda alınan 20 ml kanın bir aerop bir anaerop şişeye 10 ml olarak bölünmesini en uygun yaklaşım olarak sunmaktadır(53).

Mantar infeksiyonlarında, hücreiçi patojenlerde “lysis centrifugation” yönteminin daha başarılı olduğu belirtilmekte fakat bu yöntem teknik ve ekonomik zorluklar nedeniyle yaygın kullanım alanı bulamamaktadır. Şişelere konulacak kan miktarı önemlidir. Erişkinlerde şişe başına 10 ml, çocuklarda 2-5 ml kan alınması önerilir. Erişkinde bakteriyemide 1-10 koloni oluşturan ünit/ml bakteri varken çocuklarda bu sayı 100-1000 koloni oluşturan ünit/ml olabilmektedir. Her mililitre kan etkeni saptama olasılığını %3 kadar arttırmaktadır. Daha az miktarlar kan kültürü duyarlılığının azalmasına neden olmaktadır. Besiyeri/kan oranı $>5/1$ olduğunda etkeni üretmek olasılığı artmaktadır. Uygun dilüsyonlar ve yeni hemokültür şişelerindeki antibiyotik bağlayan reçineler tedavi sürecinde, antibiyotik kullanımı ile ilgili negatif sonuçları azaltmaktadır(49,51,54). Kan kültürü alımında en önemli sorun kontaminasyondur. Bu sorunu en aza indirmek için en uygun yol uygun bir hemokültür protokolü uygulamaktır. Kan alma işinde görevli özel personel “flebotomist” varlığı kontaminasyon oranlarını azaltmaktadır. Femoral bölgeden ve dermatolojik sorun olan bölgeden kan kültürü alınmaması önerilir. Sadece kateterden alınan kan kültürleri yanıltıcı sonuçlar vereceğinden önerilmez. Kateter alınması sürecinde uygun cilt antisepsisi en büyük sorun kaynağıdır. Farklı öneriler olmakla beraber, alkol, iyot bileşikler en çok kullanılan antiseptiklerdir. Bu antiseptiklerin doğru uygulanmasında sorunlar olabilmektedir. İyotlu antiseptik kullanıldığında kurumasının (yaklaşık 30-60 saniye) ve bu arada etki etmesinin beklenmemesi, antisepsi uygulanan bölgeye steril eldiven giymeden tekrar damarı palpe etmek amacıyla dokunulması en sık yapılan hatalardır. Alınan kanın hemokültür şişesine aktarılmasında şişenin kapağı tercihen alkol ile silinmelidir ve bu aşamada iyot önerilmemektedir. İğnenin değiştirilmesinin gerekliliği tartışmalı bir konudur. İşlem sonunda derideki iyot alkol ile temizlenmelidir(49,51,54).

Yeni geliştirilen kan kültürü sistemleri hızlı, etkin ve kullanışlı sistemlerdir ve hemokültür için geniş kullanım alanları bulmuşlardır. BACTEC (Becton Dickinson, florometrik sistem) ve BacT/Alert (BioMeireux, kolorimetrik sistem) en çok kullanılan sistemlerdir. Tek bir şişeden cilt florası (koagülaz negatif stafilokok, difteroid çomak, viridans grubu streptokok, Bacillus spp) olmayan bir üreme varlığı anlamlı kabul

edilirken cilt florasının tek hemokültürde üremesi kontaminasyon olarak yorumlanmaktadır. Unutulmamalıdır ki her kan kültürü üreme sonucu hasta başında ve hastaya özel olarak yorumlanarak kesin karar verilmelidir(33,49).

Yapılan değerlendirmeler tüm bu olumsuzluklar katıldığında 1000-3000 USD /kontamine hemokültür gibi bir maliyet ortaya koymuştur(33). Hastanemizde yapılan bir çalışmada hemokültür yanlış pozitiflik oranı ortalama %6.4 bulunmuş, YBÜ’nde %10 üzerinde bu oranın çıkabildiği, en sık yanlış pozitiflik nedeni bakterinin koagülaz negatif stafilokok olduğu ve çok ciddi laboratuvar maliyetine neden olduğu gösterilmiştir(55).

Özellikle hastanelerde en sık bakteriyemi kaynağı santral venöz kateterler olmaktadır. Kateter kaynaklı infeksiyonu tanımlamak için çeşitli metodlar kullanılmıştır. Kateter ve periferden kantitatif kan kültürü yapmak, giriş yerinden sürüntü/apse örneği kültürü, çıkarılan kateterin boyanarak incelenmesi, kateter içinden fırçalama yöntemi ile örnek alarak çalışılması kullanılabilecek bazı yöntemlerdir. Fakat günümüzde en sık çıkarılan kateter segmentinin Petri plağındaki besiyerinde 4-5 kez yuvarlanması sonrasında saptanan koloni sayısı (15 ve daha fazla koloni anlamlı) ile tanı konulmasını öneren Maki yöntemi ve lümen içinden sıvı geçirerek sonikasyon ya da vorteksleme sonrası ekimi öneren kantitatif kateter kültürü (≥ 10 koloni anlamlı) en sık kullanılan metodlar olmuştur. Fakat son yıllarda kateter çıkarılmadan kateter kaynaklı bakteriyemi tanısında faydalı olabilecek sistemler ön plana geçmiştir. Üremeyi sinyal ile izleyen kan kültürü sistemlerinde eş zamanlı alınan perifer ve kateter kan kültürlerinde eğer kateterden alınan kan kültürü 2 saat ya da daha erken bir saatte sinyal veriyorsa kateter kaynaklı infeksiyonu saptamak yönünden son derece faydalı bulunmuşlardır. Santral venöz kateter dışında diğer damar içi kateterler hatta periferik venöz kateterler de zaman zaman infeksiyon odağı olabilirler ve özellikle YBÜ hastalarında dikkatle izlenmeleri gerekir(60).

Hemokültürler, klinik tablo stabil olmayan, uygun olarak başlanan antibiyotik tedavisine 48-72 saatte yanıt alınamayan ya da odak kontrolü sorunu olan her olguda tekrarlanmalıdır. Kandidemi olgularında ve dirençli bakteri infeksiyonlarında ve özellikle kromozomal beta laktamaz üreten gram negatif çomaklarla (*P.aeruginosa*,

Serratia, Enterobacter, Citrobacter, ...gibi) oluşan ciddi infeksiyonlarda kan kültürleri tekrarlanmalıdır.

Bir diğer kavram bakteriyemi olmadan kateter kaynaklı sepsis kavramıdır. Sepsis bulguları olan hastada bakteriyemi yok iken sadece kateter kültüründe en çok kullanılan sistemlerdir. Tek bir şişeden cilt florası (koagülaz negatif stafilokok, difteroid çomak, viridans grubu streptokok, Bacillus spp) olmayan bir üreme varlığı anlamlı kabul edilirken cilt florasının tek hemokültürde üremesi kontaminasyon olarak yorumlanmaktadır. Unutulmamalıdır ki her kan kültürü üreme sonucu hasta başında ve hastaya özel olarak yorumlanarak kesin karar verilmelidir (8,24).

Kan kültürlerinde kontaminasyon çok ciddi bir sorundur. Ortalama %3-5 arasında kontaminasyon oranları bildirilmektedir. Kontaminasyon, etkeni yanlış tanımlamaya yol açabileceği gibi, yanlış bakteriyemi tanısına ve buna bağlı gereksiz antibiyotik kullanımına, yatış süresinde uzamaya ve ciddi maliyet artışına neden olmaktadır. Yapılan değerlendirmeler tüm bu olumsuzluklar katıldığında 1000-3000 USD /kontamine hemokültür gibi bir maliyet ortaya koymuştur(33). Hastanemizde yapılan bir çalışmada hemokültür yanlış pozitiflik oranı ortalama %6.4 bulunmuş, YBÜ'nde %10 üzerinde bu oranın çıkabildiği, en sık yanlış pozitiflik nedeni bakterinin koagülaz negatif stafilokok olduğu ve çok ciddi laboratuvar maliyetine neden olduğu gösterilmiştir(55).

Özellikle hastanelerde en sık bakteriyemi kaynağı santral venöz kateterler olmaktadır. Kateter kaynaklı infeksiyonu tanımlamak için çeşitli metodlar kullanılmıştır. Kateter ve periferden kantitatif kan kültürü yapmak, giriş yerinden sürüntü/apse örneği kültürü, çıkarılan kateterin boyanarak incelenmesi, kateter içinden fırçalama yöntemi ile örnek alarak çalışılması kullanılabilecek bazı yöntemlerdir. Fakat günümüzde en sık çıkarılan kateter segmentinin Petri plağındaki besiyerinde 4-5 kez yuvarlanması sonrasında saptanan koloni sayısı (15 ve daha fazla koloni anlamlı) ile tanı konulmasını öneren Maki yöntemi ve lümen içinden sıvı geçirerek sonikasyon ya da vorteksleme sonrası ekimi öneren kantitatif kateter kültürü (≥ 10 (27,28)koloni anlamlı) en sık kullanılan metodlar olmuştur. Fakat son yıllarda kateter çıkarılmadan kateter kaynaklı bakteriyemi tanısında faydalı olabilecek sistemler ön plana geçmiştir(56,58). Üremeyi sinyal ile izleyen kan kültürü sistemlerinde eş zamanlı alınan perifer ve kateter kan kültürlerinde

eğer kateterden alınan kan kültürü 2 saat ya da daha erken bir saatte sinyal veriyorsa kateter kaynaklı infeksiyonu saptamak yönünden son derece faydalı bulunmuşlardır(56,59). Santral venöz kateter dışında diğer damar içi kateterler hatta periferik venöz kateterler de zaman zaman infeksiyon odağı olabilirler ve özellikle YBÜ hastalarında dikkatle izlenmeleri gerekir(60).

Hemokültürler, klinik tablo stabil olmayan, uygun olarak başlanan antibiyotik tedavisine 48-72 saatte yanıt alınamayan ya da odak kontrolü sorunu olan her olguda tekrarlanmalıdır. Kandidemi olgularında ve dirençli bakteri infeksiyonlarında ve özellikle kromozomal beta laktamaz üreten gram negatif çomaklarla (*P.aeruginosa*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, ...gibi) oluşan ciddi infeksiyonlarda kan kültürleri tekrarlanmalıdır.

Bir diğer kavram bakteriyemi olmadan kateter kaynaklı sepsis kavramıdır. Sepsis bulguları olan hastada bakteriyemi yok iken sadece kateter kültüründe

Sepsis ve septik şok: Sepsis; infeksiyona karşı gelişen sistemik inflamatuvar yanıtı tanımlamaktadır. Hayatı tehdit eden bir infeksiyondur ve yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) ölümlerin en önemli nedenidir. Hızlı, uygun ve yoğun bir tedavi yaklaşımı mortaliteyi azaltabilecek en önemli unsurdur. Sepsis ile ilişkili klinik tabloların tanımları: İnfeksiyon: Normal konakta mikroorganizma invazyonu sonucunda ortaya çıkan inflamatuvar yanıttır. Bakteriyemi: Kanda canlı bakteri bulunmasıdır.

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS):

Farklı klinik uyarılara karşı konakta gelişen yanıtı tanımlar. Aşağıdaki bulgulardan en az ikisinin varlığı ile tanımlanır:

- Vücut sıcaklığı $> 38^{\circ}\text{C}$ ya da $< 36^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı > 90 vuru/dakika
- Solunum hızı > 20 /dakika ya da $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- Lökosit sayısı $> 12.000/\text{mm}^3$ ya da $< 4000/\text{mm}^3$ ya da $> \% 10$ genç nötrofillerin saptanmasıdır.

Ağır sepsis: Organ disfonksiyonları, hipoperfüzyon ve hipotansiyon ile birlikte görülen sepsis. Perfüzyon bozuklukları; laktik asidoz, oligüri ya da mental durumdaki bozulmayı içermektedir. Hipotansiyon sistolik kan basıncının < 90mmHg ya da hipotansiyona neden olabilecek bir neden olmadan > 40 mmHg fazla düşmesidir.

Septik şok: Sepsis ilişkili hipotansiyon olarak da tanımlanır. Yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen hipotansiyonun mevcut olduğu durumdur. İnotropik ya da vazoaaktif ilaç verilen hastalar perfüzyon anormallikleri saptandığında hipotansif olmayabilirler fakat yine de septik şok olarak kabul edilmelidirler.

Multipl organ disfonksiyon sendromu: Herhangi bir destek tedavisi olmadan, organ fonksiyonlarının homeostazisi koruyamadıkları durumdur. İnfeksiyon ilişkili hipotansiyon, laktat yükselmesi veya oligüri olması örnek olarak verilebilir. İnfeksiyonlar dışında, pankreatit, multitravma, doku yaralanmaları, hemorajik şok, yanık ve iskemi gibi klinik durumlar ve tümör nekroz faktör (TNF), sitokinler gibi inflamatuvar mediyatorlerin dışarıdan verilmesi SIRS tablosunu ortaya çıkarabilir. Klinik tablo sepsisten septik şoka ve multiorgan yetmezliği tablosuna doğru ilerledikçe mortalite de belirgin olarak artmaktadır. Klinikte; ateş/hipotermi, açıklanamayan taşikardi ya da taşipne, periferik vazodilatasyon bulguları, açıklanamayan şok, mental durumda bozulma sepsisi akla getirmelidir. (16)Çok sayıda infeksiyon sepsis nedeni olabilirse de solunum sistemi infeksiyonları, karın içi odak ve dolaşım sistemi infeksiyonları en sık rastlanan infeksiyon odaklarıdır. Özellikle hastane kaynaklı sepsis olgularında kateter kaynaklı infeksiyonlar en sık rastlanan infeksiyonlar olarak öne çıkmaktadır. Sepsis genelde yüksek mortaliteye sahip, genelde tanı konulamayan bir klinik süreçtir. Genel hatlarıyla bakıldığında sepsisin son derece silik bulgularla seyredebileceği vurgulanmakta, hastanelerde her türlü klinik bozuklukta sepsisin hatırlanması ve aktif bir tedavi uygulaması başlanması önerildiği görölmektedir(2). septik şok ve sistemik vazodilatasyon, düşük damar direnci, artmış kardiyak debi ve yüksek ölüm oranı ile karakterizedir. Septik şoktaki bu global vazodilatasyon, eksojen vazokonstüriktör ajanlara cevapsızdır ve çoklu organ yetersizliği ile mortaliteyi belirleyen en önemli faktördür. Bir distal inflamatuvar mediyatör olan nitrik oksitin (NO), septik şok sırasında arttığı çalışmalarda gösterilmiştir.(3)

Nitrik oksit birçok organda özel düzenleyici fonksiyonlara sahiptir, 1985'den beri birçok araştırmanın konusu olmuştur ve sonuçta kardiovasküler, pulmoner, gastrointestinal, immün ve merkezi sinir sistemlerinde çok önemli işlevlerinin olduğu gösterilmiştir. Buna karşın NO sentezinin engellenmesi, aterosklerozis, pulmoner hipertansiyon, pilorik stenoz ve renal yetmezlik ile birlikte olan hipertansiyon gibi birçok patofizyolojik durumlar için temel oluşturmaktadır(4).

Nitrik oksit ilk kez endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak tanımlanmış ve şimdi birçok sistem ve dokuların fonksiyonlarını düzenlediği anlaşılmıştır, NO arjinin nitrik oksit sentetaz enzim ailesi tarafından sentezlenir, endojen olarak üretilen NO immün sistem, kan damarları tonusu, nöronal ileti ve düz kaslarda gevşemeye yol açan etkileri açıkça gösterilmiştir (5)(6).

NOS enziminin nöronal (*nNOS*), indüklenebilir (*iNOS*) ve endotelyal (*eNOS*) olmak üzere üç izoformu vardır. *eNOS* geni Glu 298-Asp polimorfizmi koroner arter spazmı, koroner arter hastalığı, miyokard infarktüsü, ateroskleroz, koroner ateroskleroz yaygınlığı ve hipertansiyon ile olan ilişkisi çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (7,8,9,10).

NO fizyolojik konsantrasyonlarda, hemen hemen Tüm organı Sistemlerde değişik biyolojik etkilere sahiptir. Gastrointestinal sistem, Havayolları, kavernöz dokulardaki Vasküler Düz kasların gevşemesinde Önemli Bir mediyatördür. NO Geliştirilmiş formasyonu dolaşım yetmezliği, miyokardiyal fonksiyon bozukluğu, organ hasarı ve sonuçta çoklu organ işlev bozukluğu sendromu katkıda bulunabilir. NO oluşumu Geliştirilmiş, diğer taraftan, aynı zamanda vazodilatasyon, trombosit ve lökosit yapışmasının önlenmesi, mikro dolaşım kan akımı ve doku oksijenasyonu iyileştirilmesi de dahil olmak üzere yararlı etkiler olabilir. (11). Bu bilgiler ışığında sepsis ve ENos çoklu organ hasarı ve dolaşım yetmezliği açısından birbirleriyle içiçedir.

TNF- α polipeptid yapıda geniş biyolojik etki spektrumlu bir hormondur. Başlıca monosit ve makrofaj tarafından üretilmektedir. TNF- α reseptör kompleksi, hedef hücrede birçok biyolojik aktivitenin başlamasına neden olur. TNF α 'nın doğal yada kazanılmış immünite, kaşeksi, endotoksik şok, inflamasyon, dokunun yeniden şekillenmesi, enfeksiyon ve immünite, sitotoksikite, apoptozis olaylarında önemli biyolojik ve fizyopatolojik etkileri vardır. immün yanıtta TNF- α çok merkezi bir rol almaktadır. Makrofajlar tarafından ortama salınan TNF- α 'lar hem kendilerini hem de

çevresindeki diğer immün sistem hücrelerini aktive etmektedirler. Bu çok yönlü aktivasyon başlıca şu ana başlıklarda incelenebilir: TNF- α makrofajlardaki indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) aktivasyonuna neden olur ve nitrik oksit (NO) yapımını uyararak makrofajların antibakteriyel etkinliğini artırır. Ayrıca TNF- α çok sayıda sitokin ve kemokinin salınımını arttırarak inflamasyon bölgesine lenfositlerin migrasyonuna ve proliferasyonuna neden olur. (12)(14)(15).

İnflamatuvar süreçte etkisi kanıtlanmış olan TNF-alfa sepsiste sık kullanılan bir mediyatördür.

Dolaşımı ve doku oksijenizasyonu yeterli olmayan bu hastalarda; sıvı tedavisi ile kardiyak debiyi en uygun düzeye getirmek doku oksijenizasyon gereksinimini karşılayabilir. Bu hastalarda eğer doku hipoperfüzyonu hızla geri çevrilmezse çoklu organ yetmezliğinin ortaya çıkması kaçınılmazdır. Bu nedenle, ağır sepsis hastalarına yönelik hazırlanan tedavi protokolleri doku hipoperfüzyonunu önlenmeyi amaçlar. Erken hedefe yönelik tedavi (EHYT) adı altında hipoperfüzyon gözetilerek uygulanan sıvı resüsitasyon tedavisinin erken antibiyotik tedavisi ile beraber verilmesi durumunda mortalitenin ciddi anlamda azaldığı ortaya konmuştur (17). Bu protokollere dayalı yaklaşım özellikle sepsisin erken döneminde önemlidir. Protokoller, hasta acil servise başvurduğu andan itibaren başlanarak zaman kaybetmeden uygulanmalıdır (18).

Bu paketler üzerinde yapılan bir araştırmada, ilk altı saatlik pakete uyum sağlanan hastalarda ölüm oranı %23 iken, kontrol grubunda %49, yirmi dört saatlik uygulamada ise; ölüm oranları protokol grubunda %29 iken, kontrol grubunda %50 olarak bulunmuştur (19). Rivers ve ark. (20) acil servise başvuran ağır sepsis ve septik şok hastalarına; başvuru sonrası ilk altı saatlik sürede sıvı replasmanı, eritrosit transfüzyonu ve inotropik ajan kullanımını içeren erken hedefe yönelik tedavi protokolü uygulamışlardır. Çalışmanın sonunda EHYT uygulanan hastalarda 28 günlük mortalitenin %16 oranında düştüğü bildirilmiştir. Hemodinamik tedavinin belirlenmesinde bir başka hedef, arter kandan ölçülen laktat düzeyidir. Erken dönemde laktat düzeylerinin düşürülmesi ile mortalite riskinin azalması arasında önemli bir ilişkinin olduğu ortaya konulmuştur (21).

Santral venöz oksijen saturasyonu (ScvO₂), ağır sepsis hastalarında doku oksijenizasyonunu göstermede sık kullanılır. 2007-2009 yılları arasında 300 ağır sepsis

hastasını içeren çok merkezli bir çalışmada ScvO₂ değeri ile laktat klirens değeri karşılaştırılmış; doku oksijenizasyon göstergesi olarak ScvO₂ kullanılan hasta grubunda hedef ScvO₂ değeri %70 olarak belirlenirken doku oksijenizasyon göstergesi olarak laktat klirensi kullanılan hasta grubunda hedef laktat klirens değeri %10 olarak belirlenmiştir. Çalışmada hastane mortalitesi açısından iki grup arasında fark saptanmamıştır (22).

Yine 2006 ile 2008 yılları arasında yürütülen ve laktat düzeyi >3 mEq/L olan 348 yoğun bakım hastanın dahil edildiği bir çalışmada; laktat düzeyini normale getirmenin doku oksijenizasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Hastalar laktat grubu (171 hasta) ve kontrol grup (177 hasta) olarak ikiye ayrılmış, her iki hasta grubuna o grup için belirlenen tedavi protokolü 8 saat süresince uygulanmıştır. Laktat grubunda 2 saat içerisinde laktat düzeyini %20 azaltmak hedeflenirken, kontrol grubunda ScvO₂ %70 hedef değeri kullanılmıştır. Her iki hasta grubunun 28 günün mortalite oranları karşılaştırıldığında mortalite oranının laktat hedefli grupta daha düşük olduğu saptanmıştır (23). Tüm bu çalışmaların ışığında 2012 sepsis kılavuzunda laktat düzeyini normale getirmek yerini almıştır. Sepsiste tedavi; altta yatan enfeksiyonun eradikasyonunu, doku hipoperfüzyonun düzeltilmesini, organ fonksiyon bozukluklarının önlenmesini içeren çok yönlü tedavi şeklindedir. Enfeksiyon varlığından şüphe edildiğinde ilk yapılması gereken kültürlerin alınması ve erken profilaktik antibiyotik tedavisinin başlanmasıdır. Sepsiste, uygun ve erken başlanan antibiyotik tedavisinin mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (24).

Sepsiste mayi replasmanı önemlidir. Bu yüzden hastaların CVP ölçümü gereklidir. mayi replasmanının etkili olup olmadığını anlamak için santral venöz basınç takibi de gerekli olmaktadır. Dolayısı ile çoğu kez santral venöz kateterizasyon kaçınılmaz bir ihtiyaç olmaktadır. Bu çalışmada 1998 yılı içindeki 12 aylık zaman periyodunda acil serviste santral venöz kateter takılan 186 hastanın dosyaları retrospektif olarak incelendi. Santral venöz kateterizasyon için en sık subklavian ven kullanıldı (%50). Hastaların büyük çoğunluğunda kateterizasyon endikasyonu mayi replasmanı ve santral venöz basınç ölçümü idi (%92) (25).

2.2. NİTRİK OKSİT (NO)

2.2. 1. NO'in Tanımı, Yapısı ve Özellikleri

Nitrik oksit(NO) bir çok biyolojik olayda mediyatör olarak önemli roller oynadığının keşfedilmesi; geçen yüzyılın biyomedikal araştırmalarındaki en önemli ilerlemelerden birisi olarak değerlendirilmiştir. Nitrik oksit sadece fizyolojik süreçlerde değil patofizyolojik süreçlerde de yer almaktadır (63).

Memeli canlıların organizmasında NO'in mevcut olduğu ilk kez 1916 yılında gösterilmiş, 1985 yılında ise aktive makrofajların NO saldığı tespit edilmiştir (64). Esas itibariyle damar genişlemesi şeklinde etkisi olan bu madde, ilk olarak *endotel kaynaklı gevşetici faktör* (EDRF: *endothelium-derived relaxing factor*) olarak adlandırılmıştır. Ancak daha sonra, damar gevşetici etkisinin direkt nitrovazodilatörlerin etkisiyle benzerlik gösterdiği gözlenmiş; gerek EDRF'nin gerekse direkt nitrovazodilatörlerin guanilil siklaz aktivasyonu ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) yapımı üzerinden etki gösterdiği ortaya konulmuş ve EDRF ile NO'in aynı molekül olduğu anlaşılmıştır (65,66).

NO; iki atom içeren, 30 molekül ağırlığına sahip, renksiz, yarı ömrü çok kısa, lipofilik özellikte, suda eriyebilen, biyolojik zarlardan kolaylıkla geçebilen, esas itibariyle çözünabilir gaz yapısına sahip bir serbest radikaldır. Düşük konsantrasyonlarda önemli fizyolojik görevler yapar, yüksek konsantrasyonlara toksik etkilidir. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür (67,68).

Endotelyal nitrik oksit başlıca fizyolojik işlevleri şunlardır: i) Damar tonusunun düzenlenmesi: düz kas gevşemesi -vazodilatasyon- yaparak fizyolojik olarak kan basıncını düşürür ve lokal perfüzyonu artırır; ii) Lökosit-endotel ilişkisini ayarlayarak endotel ile hücre aktivasyonu etkileşmesini düzenler ve böylece lökosit adezyonunu azaltır; iii) Hemostazisin sağlanmasında rol alarak trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engeller ve tromboz eğilimini azaltır; iv) Hücre proliferasyonunu kontrol ederek düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve neointimal oluşumu azaltır (69).

NO inflamatuvar yanıtlarda da yer alır. Hücresel hasarda etkili bir moleküldür ve antioksidan olarak etki gösterir. Lökositler, makrofajlar, mast hücreleri, endotelial hücreler ve plateletler gibi inflamatuvar yanıtta yer alan hücrelerdeki mediyatörlerin serbestleşmesinde düzenleyici rol oynar. Bu proseslerde kan akımının düzenlenmesinde, lökositlerin damar endoteline adezyonunda, çeşitli enzimlerin faaliyetlerinde de modülatör olarak görev yapar (H). NO'nın antiinflamatuvar etkileri olduğu gibi proinflamatuvar etkileri de olabilmektedir. Bu etkiler; NO konsantrasyonuna, peroksinitritler gibi toksik ürünlerin oluşabilme potansiyeline, patolojik prosesin meydana geldiği yere, ve hedef hücrenin adaptif cevaplarına göre değişebilmektedir(70).

2.2.2. NOS Enzimi ve İzofomları

NO; L-arjininden L-sitrülin oluşumu sırasında meydana gelir. NO, L-arjinin'in guanidin nitrojen grubunun hidroksillenmesi ile ortaya çıkan bir ara üründür. Bu reaksiyonlarda nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ve THB₄, NADPH, FAD/FMN gibi kofaktörler rol alır (63).

NOS'un 3 izoformu vardır: i) Nöronal NOS (nNOS; NOS-1), ii) İndüklenebilir NOS (iNOS; NOS-2), iii) Endotelial NOS (eNOS; NOS-3). nNOS santral ve periferik nöronlarda, nonadrenerjik ve nonkolinerjik nöronlarda, iskelet kasında ve endometriyumda; iNOS makrofajlarda, karaciğer hücrelerinde, düz kaslarda, endotelde ve kalp hücrelerinde; eNOS ise endotelde, beyinde, ve kalpte bulunur(71). eNOS ve nNOS yapısal NOS (constitutional NOS; cNOS) olarak ta adlandırılırlar. Yapısal NOS enzimleri ortamdaki kalsiyuma ihtiyaç duyarken, iNOS ise sitokinlerin makrofajları uyarmasıyla ya da başka uyarıların etkisiyle salınır, kalsiyuma ihtiyaç duymaz. Yapısal NOS çeşitli organ sistemleri için bazal seviyelerde gereklidir(63,64).

2.2.3. Hastalıklar ve NOS

Fizyolojik şartlarda NO konsantrasyonları 100-500 nM değerleri arasındadır ancak endotoksin, γ -interferon, IL-1, TNF- α gibi maddelerle iNOS'un uyarılmasıyla NO düzeyleri yaklaşık 10 kat yükselir. Hastalık ve sonuçlarına bağlı olarak NO yararlı ve zararlı etkilere yol açabilir (64). Akut akciğer hastalığı, ateroskleroz ve septik şok gibi

bazı patolojik durumlarda aberan NO yapımı veya NO'ten kaynak alan reaktif nitrojen türlerinin (*reactive nitrogen species*; RNS) yapımı devreye girebilmektedir. NO'in kendisi nontoksik bir madde iken, sekonder RNS'ler hem in vivo hem de in vitro şartlarda proteinler, karbohidratlar ve lipidler gibi çeşitli biyomoleküllerin yapı ve işlevlerini etkileyip modifiye edebilen, okside edici ve nitratlayıcı ajanlardır(73).

2.2.4. eNOS Geni

eNOS geni 7. kromozomun uzun kolunun, 35. ve 36. lokuslarında bulunur, 26 ekzon içerir. Kodlanması 4052 nükleotidi olan bir haberci RNA (mRNA) tarafından yapılır. eNOS'un amino terminali diğer NOS izoformlarından farklıdır. Özellikle insan ve sığır endotelial proteinleri prolinden zengindir ve açıltransferazlarca düzenlenen miristoilasyona özel konsensus target dizisi içerirler (74).

2.2.5. eNOS Genindeki Polimorfizmler

eNOS geninde bazı polimorfizmler olduğu tespit edilmiştir. Özellikle promotor bölgesindeki İnsandaki eNOS geninde çalışılmış olan polimorfik varyasyonlar şöyledir: Birisi intron 18'de Ala27Cys, diğeri de intron 23'te Gly10Thr olmak üzere nükleotid substitusyonu şeklinde iki varyasyon vardır. Ayrıca 4, 13 ve 23. intronlarda bazı tekrar değişiklikleri olduğu bildirilmiştir. Nükleotid substitusyonu şeklindeki 3 ayrı gen varyasyonu ise promotor bölgede tespit edilmiştir (Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala). Bu polimorfizmler transkripsiyon aktivitesini ve dolayısıyla enzim seviyelerini değiştirme kapasitesine sahiptirler. Diğer bir polimorfizm ise, ekson 7'dedir (Glu298Asp). Bu polimorfizm proteinin primer yapısını değiştirip enzimde fonksiyonel değişikliklere yol açabilir (75). T-786C, 4. intron bölgesinde 27-bp tekrarı ve 7. eksondaki Glu298Asp'un dikkat çektiği bildirilmiştir (76).

2.2.6. eNOS Gen Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi

Önemli fizyolojik ve homeostatik işlevlere sahip olan eNOS'ın, hastalıklarla veya fizyopatolojik süreçlerle ilişkisini tespit edebilmek için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. eNOS'tan kaynaklanan sorunların sebepleri her zaman net olarak tespit edilememekle birlikte; bu araştırmaların bazılarında eNOS geninin ekspresyonundaki veya aktivitesindeki değişikliklerin ya da bozulmaların bir faktör ya da etken olarak, bazı

hastalıklar ya da fizyopatolojik süreçlerle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Sağlam bir damarda endotel; eNOS aktivitesi vasıtasıyla vasküler tonusun idamesini, trombosit agregasyonunun ve lökosit adezyonunun düzenlenmesini temin eder (77). Endoteldeki morfolojik veya yapısal bir bozulma, NO sentez yolağındaki bir defekt ya da eNOS ile ilgili genetik bir bozukluk bu düzenlemede ciddi sorunlara yol açabilir. eNOS gen polimorfizminin hastalıklarla ilişkisi; hipertansiyon(78,79), Behçet hastalığında ve vaskülitler (80), kronik böbrek hastalığı(81), koroner arter hastalığı (82,83), diyabet(84) ve serebravasküler hastalık (85) gibi birçok hastalıkta araştırılmıştır.

2.2.7. Tümör nekroz faktörü- α promoter polimorfizmleri

Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) geninin promotör bölgesinde pozisyonda -308 bir G'den A'ya bir polimorfizmi bir alel ilk septik şok hastaların olumsuz sonuçla ilişkili olduğu bulunmuştur . Daha sonraki çalışmalarda bir dizi benzer sonuçlar vermiştir ancak çeşitli çalışmalar yeni büyük bir çalışmada dahil, . İlginç bir şekilde, tümör nekroz faktörü- α geni yakınında lenfotoksin- α geni, ısı şoku proteini 70 geni ve diğer enflamatuvar yolak genlerinin yer almaktadır. Bir kısım araştırmacı her hasta sonuçları gözlemlenen farklılıkları bu genlerin SNP de gerçek neden olabileceğini düşündürmektedir.

TNF önemli genetik değişkenliği ile önemli bir pro-inflamatuvar sitokin ve belki de insan hastalıklarının geniş bir dizi genetik yatkınlık ile ilgili tüm genlerin çalışılan en iyisidir. TNF kromozom 6 üzerine majör histokompatibilite kompleksi (MHC) yüksek ölçüde polimorfik bölgede yer alır.

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), kaşektin olarakda adlandırılan ve 17-70kDa ağırlığında bir sitokindir . Homotrimer bir yapıya sahip olan TNF- α , özellikle makrofajlar ve monositler olmaküzere fibroblast, endotel hücreler, adipositler, Bhücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilmektedir(6-8). 6p21.3 kromozomu üzerinde bulunan gentarafından üretilen TNF- α , ileri derecedepleiotropik (tek bir sitokin birden çok hücre tipiüzerine etkili olabilir) bir sitokindir. TNF- α özelliklelipit metabolizması, koagülasyon, insülin rezistansıve endotel üzerine etki etmektedir. IL-1 veIL-6 ile birlikte inflamatuvar olaylarda sitokinkaskadını harekete geçirmede rol oynar. TNF- α , interferon gama (IFN γ) ile birlikte immüncevap üzerine güçlü bir etkiye

sahiptir. $\text{TNF-}\alpha$ 'nın biyolojik etkisi konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda ($\sim 10^{-9}$ M) $\text{TNF-}\alpha$, lokal olarak immüno-inflamasyonun otokrin ve parakrin düzenleyicisidir (9). Yüksek konsantrasyonlarda $\text{TNF-}\alpha$, endokrin hormon gibi etki etmektedir. Ayrıca $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ 'nın birçok biyolojik etkisini hızlandırmaktadır.

$\text{TNF-}\alpha$ inflamatuvar cevabın aktivasyonunda ve regülasyonunda ana rol oynamaktadır. $\text{TNF-}\alpha$; IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10'nun sentezini artırır. Ayrıca endotoksin, IL-1, $\text{TNF-}\alpha$ ve IL-6 da $\text{TNF-}\alpha$ sekresyonunu arttırmaktadır.



3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dallarının işbirliği ile MAYIS-2015 ve Haziran-2016 tarihleri arasında yapılmıştır. Etik Kurul tarafından 08.05.2015 gün ve 224 sayılı karar ile onaylanan araştırmamızın laboratuvar kısmı Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)'nde tamamlanmıştır. Başlıca 2 kısımdan oluşan çalışmanın veri toplama kısmı (Acil servis kısmı) yılda yaklaşık 110.000 hastanın başvurduğu, Kayseri ili ve çevresindeki yaklaşık 3 milyon nüfusun üçüncü basamak acil vakalarına hizmet veren bir merkez olan acil serviste yapılmıştır.

Acil Servis Kısmı:

Sepsis acil servise hipo- hiper termi, halsizlik, şuur değişikliği, nefes darlığı, vb enfeksiyon bulguları ile başvurmaktadır. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (*SIRS*): Farklı klinik uyarılara karşı konakta gelişen yanıt tanımlar. Aşağıdaki bulgulardan en az ikisinin varlığı ile tanımlanır:

- Vücut sıcaklığı $>38^{\circ}\text{C}$ ya da $<36^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı > 90 vuru/dakika
- Solunum hızı $> 20/\text{dakika}$ ya da $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Lökosit sayısı $> 12.000/\text{mm}^3$ ya da $< 4000/\text{mm}^3$ ya da $> \% 10$ genç nötrofillerin saptanmasıdır.

Bu nedenle acil servisimize enfeksiyon öntanısı ile gelen tüm 18 yaş üzeri tüm gelen hastalar incelenmiş ve (*SIRS*) Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu kriterlerinin en az ikisi olan hastalar çalışmaya dahil edilmiş, ve SIRS kriterlerini karşılamayan ve enfeksiyon odağı saptanamayan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Bu istemler hastanın klinik durumuna göre konsültan hekimler ya da kıdemli acil tıp asistanınca yapılmıştır.

Kontrol grubu vakaları acil servise başvuran hastaların yakınlarından çalışma grubuna yaş ve cinsiyet uyumlu kişilerden seçilmiştir. Çalışma grubunda olduğu gibi kontrol grubunda da mesai içi ve dışında numune örnekleme uygun şekilde yapılmıştır.

Seçilen Vakadan Numunelerin Alınması

Çalışma grubu için vakanın tanısı kesinleştikten sonra numune gönderme işlemine geçilmiştir. Bunun için 2 mililitre (ml) tam kan örneği içerisinde antikoagülan olarak ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) bulunan vakumlu steril tüplere konulmuştur. Bu örnek numune mesai saatleri içinde ise hemen, mesai saatleri dışında olması durumunda ise takip eden ilk mesai saatinde üniversitemiz GENKÖK ilgili birimine teslim edilmiştir. Acil serviste mesai dışındaki örnek saklanması işlemi +4 °C'de buzdolabında yapılmış ve en yakın mesai başlangıcında laboratuvara iletilmiştir.

Laboratuvar Kısmı:

Erciyes Üniversitesi Kök Hücre ve Genom merkezine getirilen kanlar için kullanılan malzemeler ve DNA izolasyon işlemi ayrıntılı şekilde aşağıda sıralı olarak açıklanmıştır.

Kullanılan Malzeme ve Cihazlar:

Demirbaş Malzemeler:

- 1) Mikropipet (Gilson)
- 2) Hettich Mikrosantrifüj
- 3) Vortex Cihazı (Heidolph)
- 4) Isıtıcı Blok (Eppendorf ThermoMixer)
- 5) BioSpec Nano (Shimadzu)

- 6) Buzdolabı (+4 °C ve -20°C)
- 7) Termal Cycler PCR Cihazı (SensoQuest, Qiagen)
- 8) Elektroforez Cihazı (Bio-Rad)
- 9) Elektroforez Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad Gel-Doc XR+)
- 10) Mikrodalga fırın (Siemens)
- 11) Etüv (Nüve)

Sarf Malzemeleri:

- 1) 0,2 ml PCR Tüp
- 2) 0,5 ml ependorf Tüp
- 3) 1,5 ml ependorf Tüp
- 4) Pipet Uçları (filtreli 10-100-1000'lik)

DNA İZOLASYONU

(İzolasyona başlamadan önce *ısıtıcı blok* 70 °C ' ye ayarlanır ve örnek sayısı x 100 µl kadar elution Buffer 70 °C 'de bekletilir)

1. Ependorf tüpe 200 µl kan eklenir
2. 200 µl Binding Buffer kan üzerine eklenir
3. 40 µl Proteinase K eklenir
4. Vorteks yapılır
5. 70 °C' de 10 dk bekletilir
6. 100 µl izopropanol eklenir
7. Kolonlu tüpe alınır
8. 8000 g de 1 dk santrifüj edilir
9. 500 µl İnhibitör Removal Buffer eklenir
10. 8000 g de 1 dk santrifüj edilir
11. 500 µl Wash Buffer eklenir
12. 8000 g de 1 dk santrifüj edilir
13. 500 µl Wash Buffer eklenir
14. 8000 g de 1 dk santrifüj edilir
15. Toplama tüpü değiştirilir ve maksimum devirde 30 sn santrifüj edilir

16. Örnekler isim yazılı ependorf tüplere alınır
17. 100 µl elution Buffer eklenir
18. 3dk oda sıcaklığında bekletilir
19. 8000 g de 1 dk santrifüj edilir
20. Kolon atılır.
21. Kolondan elution buffer ile ependorf tüpe indirilen DNA'nın nanodrop ile ölçümü yapılır.
22. DNA -80°C 'ye kaldırılır.

eNOS İtron 4 Polimorfizmi için PCR Protokolü:

Tablo 1. eNOS İtron 4 Polimorfizmi için PCR Protokolü

10xPCR tamponu	5 µl
MgCl ₂ (1,5mM)	3 µl
dNTP (2,5mM)	3 µl
Primer forward (10pm)	1 µl
Primer reverse (10pm)	1 µl
Taq DNA polimeraz (1U/ml)	0,5 µl
DNA	2 µl

Yukarıdaki malzemeler eklenerek distile su ile toplam hacim 50 µl'ye tamamlanır.

PCR PROGRAMI

Tablo 2. PCR programı

94°C	5 dk	
94°C	1 dk	35 devir
56°C	1 dk	
72°C	1 dk	
72°C	7 dk	

PCR ürünleri yukarıdaki program hazırlanarak PCR cihazına konur.

***e*NOS İtron 4 Polimorfizmi için Genotiplerin Belirlenmesi:**

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde değerlendirilerek genotipler belirlendi.

Tablo 3. Genotipler

Çalışılan	Enzimi	PCR	(4b/4b)	(4b/4a)	(4a/4a)
<i>e</i> NOS intron 4	-		420 bç	420 bç 393 bç	393 bç

***e*NOS G894T Polimorfizmi için PCR Protokolü:**

Tablo 4. G894T Polimorfizmi için PCR Protokolü

10xPCR tamponu	5 µl
MgCl ₂ (1,5mM)	3 µl
dNTP (2,5mM)	3 µl
Primer forward (10pm)	2 µl
Primer reverse (10pm)	2 µl
Taq DNA polimeraz (1U/ml)	0,5 µl
DNA	2 µl

Yukarıdaki malzemeler eklenerek distile su ile toplam hacim 50 µl'ye tamamlanır.

PCR PROGRAMI

Tablo 5. Polimorfizmi için PCR Protokolü

95°C	5 dk	
95°C	1 dk	30 devir
60°C	1 dk	
70°C	1 dk	
70°C	7 dk	

PCR ürünleri yukarıdaki program hazırlanarak PCR cihazına konur.

eNOS -786 T>C Polimorfizmi için PCR Protokolü:

Tablo 6. NOS3 -786 T>C Polimorfizmi için PCR Protokolü

10xPCR tamponu	5 µl
MgCl ₂ (1,5mM)	2 µl
dNTP (2,5mM)	2,5µl
Primer forward (10pm)	1 µl
Primer reverse (10pm)	1 µl
Betain	3 µl
Taq DNA polimeraz (1U/ml)	0,5 µl
DNA	2 µl

Yukarıdaki malzemeler eklenerek distile su ile toplam hacim 50 µl'ye tamamlanır.

PCR PROGRAMI

Tablo 7. eNOS G894T Polimorfizmi için RFLP Analizi

94°C	5 dk	
94°C	30 sn	30 devir
67°C	1 dk	
72°C	1 dk	
72°C	7 dk	

PCR ürünleri yukarıdaki program hazırlanarak PCR cihazına konur.

PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR işleminden sonra hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi için PCR ürünleri agaroz jelde koşturulur.

a) Agaroz Jel Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

1. TBE Tamponu (10 X)

- 108 gr. Tris

- 55 gr. Borik Asit
- 7,31 gr. EDTA tartılarak distile su ile 1lt'ye tamamlanır.

2. Etidyum Bromür (%1'lik)

- 0,2 gr. Etidyum bromür tartılarak distile su ile 20 ml'ye tamamlanır.

%2 Agaroze Jel Hazırlanması

2 gr. agaroz tartılır, TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır, kaynatılarak eritilir. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden önce 4,5 µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

%3Agaroz Jel Hazırlanması

3 gr. agaroz tartılır, TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır, kaynatılarak eritilir. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden önce 4,5 µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

%4 Agaroze Jel Hazırlanması

4 gr. agaroz tartılır, TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır, kaynatılarak eritilir. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden önce 4,5 µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

PCR Ürünlerinin Agaroze Jele Yüklenmesi

PCR ürününden 15 µl alınır, üzerine 3 µl yükleme tamponu eklenir. Mikropipetle karıştırılır ve sırasıyla kuyucuklara yüklenir. Jeldeki ilk ve son kuyucuğa ürünün bant boyutunu belirleyebilmek için 100 baz çiftlik DNA boyut markırı yüklenir.

RLFP Reaksiyonları

1. *eNOS* G894T Polimorfizmi için RFLP Analizi

Tablo 8. *eNOS* -786 T>C Polimorfizmi için RFLP Analizi

Buffer	2,5 µl
Mbo I enzimi (2,5U)	0,5 µl
DH ₂ O	7 µl
PCR ürünü	15 µl
37°C’de 1 gece inkübe edilir	

0.5 ml ependorf tüplere yukarıdaki karışımlar hazırlanır, 37°C’de 1 gece etüvde enzimle inkübe edilir. %4 Agaroz Jelde enzimle kesim sonrası sonuçlar değerlendirilerek genotipler belirlenir.

Çalışılan	Enzimi	PCR	(GG)	(GT)	(TT)
<i>eNOS</i> G894T	<i>Mbo I</i>	206 bç	206 bç	206 bç 119 bç 87 bç	119 bç 87 bç

2. *eNOS* -786 T>C Polimorfizmi için RFLP Analizi

Buffer	2,5 µl
Msp I enzimi (2,5U)	0,5 µl
DH ₂ O	7 µl
PCR ürünü	15 µl
37°C’de 1 gece inkübe edilir	

0.5 ml ependorf tüplere yukarıdaki karışımlar hazırlanır, 37°C’de 1 gece etüvde enzimle inkübe edilir. %3 Agaroz Jelde enzimle kesim sonrası sonuçlar değerlendirilerek genotipler belirlenir.

Çalışılan	Enzimi	PCR	(TT)	(TC)	(CC)
eNOS -786T>C	Msp I	180 bç	140 bç 40 bç	140 bç 90 bç 50 bç 40 bç	90 bç 50 bç 40 bç

Çalışmanın etik kurul onayı 08.05.2015 tarihinde alınmıştır. Sonrasında 17.08.2015’de Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminden kaynak sağlanması amacıyla başvurusu yapılmıştır. TTU-2015-6044 kodlu proje kapsamında malzeme temin edilmiştir. Etik Kurul tarafından çalışmanın yapılması uygun görüldükten sonra vakalardan örnek alınmasına başlanmıştır. Mayıs-2015 ve Haziran-2016 tarihleri arasında yapılan çalışma iki kısım olarak planlandı. İlki veri toplama kısmıdır ve acil servis muayene biriminde tamamlanmıştır. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Acil servisine verilerin toplandığı 10 aylık dönem içerisinde yaklaşık 65.900 hasta başvurmuştur ve bu vakaların tanı sürecince tam kan tetkikleri usg. Direk grafilere ve Bilgisayarlı tomografi kullanılmıştır.hastaların tanıları enfeksiyon hastalıkları konsültasyonu ile teyit edilmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme:

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı ve çıkarımsal istatistikler kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubunun yaşları arasındaki fark bağımsız örneklerde student t testi ile karşılaştırıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Veriler SPSS IBM statistics 22 istatistik paket programında değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan sepsis tanısı konan hastaların bazı laboratuvar ve klinik parametreleri aşağıda özetlenmiştir.

Sepsis tanısı konan çalışma grubundaki tüm vakaların ortalama arteriyal basınç (OAB) ortalaması $67,8 \pm 7.48$ mm/Hg, ortalama vücut sıcaklığı 37.5 ± 1.0 °C, ortalama solunum sayısı 20.6 ± 1.8 /dk, nabızların ortalaması 100.7 ± 9.4 /dk, ölçülmüştür.

Serum WBC değerlerine bakıldığında ortalaması 12795 ± 7189 mg/dl , ortalama HMG değeri 11.7 ± 2.8 mg/dl, ortalama PLT değeri 249.2 ± 138.8 mg/dl hesaplanmıştır.

Ortalama glukoz değeri 145.2 ± 78 mmol/L, ortalama BUN değeri 34.06 ± 27.4 mg/dl, ortalama kreatin değeri 2.7 ± 1.3 mg/dl, ortalama potasyum değeri 4.62 ± 0.9 mmol/L, ortalama sodyum değeri 135.7 ± 11.1 mmol/L olarak hesaplanmıştır.

Ortalama AST(Aspartat transaminaz) değeri 53.5 ± 42 U/L, ortalama ALT (Alanin Aminotransferaz) değeri 32.4 ± 22.9 u/L, ortalama Amilaz değeri 66.4 ± 42.3 U/L olarak hesaplanmıştır.

Kangazında ortalama PH değeri 7.38 ± 0.61 dir. Ortalama bikarbonat değeri 18.5 ± 3.1 mmol/L, ortalama laktat seviyesi ise 3.6 ± 1.9 mmol/L olarak hesaplanmıştır.

Tablo 9. Sepsis tanısı konan çalışma grubu vakaların bazı laboratuvar ve klinik parametreleri

Değişkenler	$\bar{X} \pm SS$	ORTSAPMA	Minumun-Maksimum
OAB	67,8±7.48	5.36	100-55
ATEŞ	37.5±1.0	0.83	35-38.9
SOLUNUM SAYISI	20.6±1.8	1.3	15-24
NABİZ	100.7±9.4	6.6	74-124
WBC	12795±7189	5701.1	75-36640
PLT	249.2±138.8	98.3	6-839
HBG	11.7±2.8	2.3	5.1-16.1
Glukoz	145.2±78	51.1	66-402
BUN	34.06±27.4	19.4	8-90.6
CRE	2.7±1.3	2.8	0.46-14.6
NA	135.7±11.1	4.56	117-149
K	4.62±0.9	0.72	2.97-6.58
CL	97.7±5.8	4.55	86-114
ALT	32.4±22.9	21.3	2-220
AST	53.5±42	40.6	1-177
AMİLAZ	66.4±42.3	41.3	7-1359
PH	7.38±0.61	0.72	7.2-7.58
PO2	66.8±18.9	13.4	31.1-139
PCO2	30.1±8.2	6.2	10.7-53.2
HCO3	18.5±3.1	2.3	12.2-27.2
LAKTAT	3.6±1.9	1.3	0.86-14.65

Tablo 10. Sepsisli çalışma grubundaki hastalın tanıları

TANI	n	%
PNÖNOSEPSİS	71	37.7
ÜROSEPSİS	43	23.0
DİĞER	74	39.9
Toplam	188	100.0

188 Çalışma grubunun 71(%37.7) adet hasta pnömosepsis, 43(%23) adeti üroses ve 74(%39.9) adeti diğer odaklarda olan sepsis olarak tespit edilmiştir.

Verinin analizi R 3.2.2 programı ile yapılmıştır. Kategorik verilerin karşılaştırılması için Ki kare testi kullanılmıştır. *P* anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

Tablo 11. Cinsiyete göre dağılım

	Değişkenler	Hasta Sayı(%)	Kontrol Sayı(%)	Toplam
Cinsiyet	Erkek	115(68.8)	114(60.6)	229
	Kadın	74(39.2)	74(39.4)	148
	Toplam	189	188	377

(P:0.967)

Kontrol grubunun 115(%68.8)'i erkek; 74(%39.2)'i kadındır. Çalışma grubunun 114 (%60.6)'ı erkek; 74(%39.4)'ü kadındır. Genotiplerin cinsiyetlere göre dağılımı incelendiğinde hasta erkek sayısı 115 (%68.8) ve kadın sayısı 74 (%39.2) olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ve hasta grubu cinsiyet özellikleri bakımından benzerdi ve kontrole alınanların 114 (60.6)'i erkek, 74 (39.4)'i kadındı. Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde p değeri 0,967 olarak saptanmıştır. Cinsiyet TNFa ve eNOS intron 4 genotipleri arası değerlendirmede kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p değeri>0,05 olduğundan anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 12. eNOS G894T polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı

eNOS G894T	Hasta Sayı(%)	Kontrol Sayı(%)	Toplam
Homozigot_normal	120(63.5)	106(56.1)	226
Heterozigot	58(30.9)	82(43.4)	140
Homozigot_mutant	10(5.3)	1 (0.5)	11
TOPLAM	188	189	377

(P:0.002)

eNOS G894T değişkeni ile grup arasında anlamlı bir ilişki vardır ($p<0.05$). Gruplar arasında homozigot normal kategorisinde anlamlı bir fark bulunmazken, heterozigot ve homozigot mutant kategorisinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu ilişki kontrol grubundaki heterozigot sayısının 82(%43.4) çalışma grubundaki heterozigot sayısından 58(%30.9) fazla olmasından ve çalışma grubundaki homozigot mutant sayısının 10(%5.3) kontrol grubundaki homozigot mutant sayısından 1(%0.5) fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 13. eNOS 786TC polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı

eNOS 786TC	Hasta Sayı(%)	Kontrol Sayı(%)	Toplam
Homozigot_normal	79(42.0)	107(56.6)	186
Heterozigot	92(48.9)	79(41.8)	171
Homozigot_mutant	17(9.0)	3(1.6)	20
TOPLAM	188	189	377

(P:0.001)

eNOS -786TC değişkeni ile gruplar arasında anlamlı bir ilişki vardır ($p<0.05$). Gruplar arasında heterozigot kategorisinde anlamlı bir ilişki bulunmazken, homozigot normal ve homozigot mutant kategorilerinde anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu ilişki kontrol grubundaki homozigot normal sayısının 107(%56.6) çalışma homozigot normal sayısından 79(%42.0); çalışma grubundaki homozigot mutant sayısının 17(%9.0) kontrol grubundaki homozigot mutant sayısından 3(%1.6) fazla olmasından kaynaklanmıştır.

Tablo 14. eNOS INT4 polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı

eNOS INT4	Hasta Sayı(%)	Kontrol Sayı(%)	Toplam
Homozigot_normal	152(80.9)	150(79.4)	302
Heterozigot	33(17.6)	35(18.5)	68
Homozigot_mutant	3(1.6)	4(2.1)	7
TOPLAM	188	189	377

(P:0.913)

eNOS INT4 değişkeni ile gruplar arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$)

Tablo 15. TNF- α 308G>A polimorfizminin kontrol ve çalışma gruplarının dağılımı

TNF-α 308G>A	Hasta Sayı(%)	Kontrol Sayı(%)	Toplam
Homozigot_normal	169(89.9)	129(68.3)	298
Heterozigot	19(10.1)	60(31.7)	79
TOPLAM	188	189	377

(P< 0.001)

TNF-α 308G>A değişkeni ile gruplar arasında anlamlı bir ilişki vardır ($p<0.05$). Bu ilişki, çalışma grubundaki homozigot normal sayısının 169(%89.9) kontrol grubundaki homozigot normal sayısından 129(%68.3) fazla olmasından; kontrol grubundaki heterozigot sayısının 60(%31.7) çalışma grubundaki heterozigot sayısından 19(%10.1) fazla olmasından kaynaklanmıştır.

Tablo 16. Kontrol ve çalışma grubu ile cinsiyet ve gen analizleri arasındaki ilişkilerin analizi

Değişkenler	Grup		<i>p</i>
	Kontrol Sayı (%)	Çalışma Sayı(%)	
Cinsiyet			
Erkek	115 (68.8)	114 (60.6)	0.967
Kadın	74 (39.2)	74 (39.4)	
eNOS G894T			
Homozigot_normal	106 (56.1)	120(63.8)	0.002
Heterozigot	82 (43.4) ^a	58(30.9) ^b	
Homozigot_mutant	1 (0.5) ^a	10(5.3) ^b	
eNOS 786TC			
Homozigot_normal	107 (56.6) ^a	79(42.0) ^b	0.001
Heterozigot	79(41.8)	92(48.9)	
Homozigot_mutant	3(1.6) ^a	17(9) ^b	
eNOS INT4			
Homozigot_normal	150 (79.4)	152 (80.9)	0.913
Heterozigot	35(18.5)	33(17.6)	
Homozigot_mutant	4(2.1)	3(1.6)	
<i>TNF-α</i> 308G>A			
Homozigot_normal	129(68.3) ^a	169(89.9) ^b	< 0.001
Heterozigot	60(31.7) ^a	19(10.1) ^b	

5. TARTIŞMA

Klasik tanımı ile sepsis, enfeksiyona sistemik inflamatuvar yanıt olarak bilinmektedir. Ancak sepsisli bir çok hastada enfeksiyon odağı gösterilememektedir. Diğer yandan yanık, travma, pankreatit gibi tablolar enfeksiyon olmamasına rağmen sepsisli hastalara benzer klinik bulgular göstermektedir (85). Sepsiste mikroorganizmalar ve onların ürünleri vücut savunma mekanizmasını tetikler. Bunun sonucunda sitokin salınımı, nötrofil ve monositlerin aktivasyonu, kompleman sistemi, koagülasyonun intrinsik ve ekstrinsik yolları, fibrinolitik sistem gibi plazma protein kaskat sistemleri aktive olur. Bu mediatörlerin aktivasyon ve salınımı dolaşımında olduğu gibi dokularda da meydana gelir. Başta kardiyovasküler sistemin etkilenmesiyle miyokardiyal baskılanmanın ortaya çıktığı, sistemik inflamatuvar bir reaksiyon görülür (86).

Angus ve ark.'nın ABD'deki 7 eyalet hastanesinde 1995 yılında ölen ve taburcu edilen toplam 6.621.559 kişinin dosyalarını inceledikleri bir çalışmada, 192.980 ciddi sepsis vakası tespit edilmiştir. Bu hastaların yaş ortalaması 63,8 olarak bulunmuştur. Hasta grubunun %49,6'sı erkek, %50,4'ü kadın olarak tespit edilmiştir (87). Bizim çalışmamızda ise, hastaların %60,4'ü erkek olarak bulunmuştur. ABD'de yapılan bu çalışmayla kıyaslandığında; bizim çalışmamızda erkek oranının fazla çıkma sebebi, toplumsal yapıda kadınların hastaneye müracaatının daha az olması, genellikle hastaneye müracaat etmeden evde eksitus olabilmeleri ve erkeklerin ise kadınlara kıyasla hastanelere daha fazla müracaatta bulunması olabilir.

Fidancı Ş. tarafından yapılan tez çalışmasındaki sonuçlara göre eNOS G894T polimorfizmin NO düzeylerinde de, kontrol (p=0.431) ve hasta (p=0.925) grubunda, NO

değerleri bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır(88). Penglin Ma ve ark. şiddetli sepsis hastalarında eNOS G894T polimorfizminde anlamlı bir ilişki bulamamışlardır.(90) Ancak bir başka çalışmada eNOS G894T GG genotipi ($p=0.181$), GT genotipi ($p=0.535$) ve TT genotipi ($p=0.594$) için, kontrol ve hasta grubu arasında NO değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (88). Bu çalışmada eNOS G894T polimorfizmine akut koroner sendromda bakılmıştır ancak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda da aynı gen polimorfizmine bakılmış ve sepsisli hastalarda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,002$). Literatür taramasına bakıldığında bu gen polimorfizmi ile ilgili başka bir çalışma bulunamamıştır.

Fidancı Ş. tarafından yapılan tez çalışmasında eNOS T786C polimorfizmi ile NO seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiştir. NO düzeylerinin, kontrol ($p=0,913$) ve hasta ($p=0,886$) grubunda eNOS T786C polimorfizmi açısından farklılık göstermediği saptanmıştır. eNOS T786C TT genotipi ($p=0,260$), TC genotipi ($p=0,693$) ve CC genotipi ($p=1,000$) için de, kontrol ve hasta grubu arasında NO değerleri bakımından anlamlı bir fark saptanmadığı görülmüştür (88). Bu çalışmada eNOS T786C polimorfizmine akut koroner sendromda bakılmıştır ancak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Penglin Ma ve arkadaşları şiddetli sepsis hastalarında eNOS T786C polimorfizminde anlamlı bir ilişki tespit etmemişlerdir (90). Bizim çalışmamızda da aynı gen polimorfizmine bakılmış ve sepsisli hastalarda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,001$). Literatür taramasına bakıldığında bu gen polimorfizmi ile ilgili başka bir çalışma bulunamamıştır.

Luna GI tarafından yapılan bir çalışmada TNF308GA polimorfizmine bakılmış ve tip 2 DM ile ilişkili bulunmuştur (89). Yine bu çalışma içerisinde bu genin ateroskleroz ile ilişkili olduğu da vurgulanmaktadır. Bizim çalışmamızda da aynı gen polimorfizmine bakılmış ve sepsisli hastalarda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,001$). Literatür taramasına bakıldığında bu gen polimorfizmi ile ilgili çalışma bulunamamıştır.

Çalışmamızda yukardaki gen polimorfizmlerine ek olarak eNOS3INT4 geninin de polimorfizmine bakılmıştır. Ancak bu gen polimorfizmine ilişkin olarak sepsisli hastalarda anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,913$).

Sepsis tanılı hastaların gen polimorfizimleri ile ilgili fazla sayıda çalışma yoktur. Daha fazla olgu sayısı içeren araştırmaların sayısının artması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

- Sepsis tanıli hastalarda erkekler ile kadınlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.
- Sepsis tanıli hastalarda bakılan **eNOS** G894T gen polimorfizmi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.
- Sepsis tanıli hastalarda bakılan **eNOS** 786TC gen polimorfizmi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.
- Sepsis tanıli hastalarda bakılan **TNF- α 308G>A** gen polimorfizmi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.
- Sepsis tanıli hastalarda bakılan **eNOS** INT4 gen polimorfizmi ise kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

KAYNAKLAR

- 1- Bahar, M. Sepsis Patofizyolojisi. Dikmen Y, Demirkıran O (Editörler). Güncel Bilgiler Işığında Sepsis 2006; 51 : 11-5.
- 2- Aygün, G. Sepsis Tanısı. Güncel Bilgiler Işığında Sepsis. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi 2006; 51: 51-60.
- 3- Karaböcüoğlu M. Sepsis ve septik şok tedavisinde nitrik oksit rolü. ANKEM Derg 1999;13: 380-385.
- 4- Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg 1995; 221: 220-235
- 5- Jorgensen JE, Hawkins RE, Bredenberg CE. Abdominal vascular catastrophes. Surg Clin North Am 1997; 77: 1305-1320.
- 6- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987; 327: 524-526.
- 7- Palmer, Richard MJ, D. S. Ashton, and S. Moncada. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988; 33: 664-666.
- 8- Tangürek, Burak, et al. "Endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) gen polimorfizminin (T-786 C) koroner arter hastalığı ile ilişkisi." Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi 33.8 (2005): 467-472.
- 9- Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. Hypertension. 2006;48:10.
- 10- Lee YH, Song GG Associations between eNOS polymorphisms and susceptibility to Behcet's disease: a meta-analysis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 Sep 29
11. Çekmen M, Mustafa B., et al. "Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri." Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics 10.4 (2001): 226-235.)
12. Doğan, C, et al. "Anti TNF-alfa kullanan hastalarda tüberküloz sıklığı."Turk Toraks Derg 13 (2012): 93-8.

13. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. 2001 SCCM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. Crit Care Med 2003;31:1250-1256.
14. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. Lancet Infect Dis 2003;3:148-55
15. Stenger S, Modlin RL. Control of Mycobacterium tuberculosis through mammalian Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 2002;14:452-7
16. Taşbakan, M. S.Sepsiste Antibiyotik Dışı Tedavi. ANKEM Derg 2014;28(Ek 2):52-56)
17. Nguyen HB, Corbett SW, Steele R, et al. Implementation of a bundle of quality indicators for the early management of severe sepsis and septic shock is associated with decreased mortality. Crit Care Med 2007;35:1105-12)
18. 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;36:296-32
19. Gao F, Melody T, Daniels DF, et al. The impact of compliance with 6-hour and 24-hour sepsis bundles on hospital mortality in patients with severe sepsis: a prospective observational study. Crit Care 2005;9:R764
20. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 2001;345:1368-1377
21. Nguyen HB, Rivers EP, Knoblich BP, et al. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. Crit Care Med 2004;32:1637-42
22. Jones AE, Shapiro NI, Trzeciak S, et al. Lactate clearance vs central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. JAMA 2010;303:739-46
23. Jansen TC, van Bommel J, Schoonderbeek FJ, et al. Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: a multicenter, open-label, randomized controlled trial. Am J Respir Crit Care Med 2010;182:752-61

24. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1589-96.
25. Yıldırım C, İkizceli İ, Avşaroğulları L. Acil serviste santral venöz kateter uygulamaları. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 1999; 5: 270-273.
26. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *NEJM* 2003; 348:138-150.
27. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. 2001 SCCM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003 ; 31: 1250-1256.
28. Tulunay M. Sepsis ve ilişkili durumların tanımlamaları. *Yoğun Bakım Derneği Dergisi* 2005`; 1 : 117-126.
29. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H,et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: 858-873.
31. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27 (Suppl 1): S3-S9
32. Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27 (Suppl 1) : S10- S32.
33. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis : an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004 ; 32(Suppl.) : S466-S494.
34. Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA. Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28: 2591-2594.
35. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling-regulation of the immun response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000 ; 28 Suppl: N3-N12.
36. Mitaka C. Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clinica Chimica Acta* 2005 351:17-29.

37. Carrol ED, Thomson APJ, Hart CA. Procalcitonin as a marker of sepsis. *Int J Antimicrobial Agents* 2002; 20: 1-9.
38. Brunkhorst FM, Wegsheider K, Korycki ZF at al. Procalcitonin for early diagnosis, and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26 : 148-152.
39. Chiesa C, Panero A, Rossi N, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998;26:664-672.
40. Simon L, Gauvin F, Amre DK, at al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39:206-217.
41. Holzheimer RG. Antibiotic-induced endotoxin release and clinical sepsis: a review. *J Chemother* 2001; 13:159-172.
42. Hurley JC. Concordance of endotoxemia with gram-negative bacteremia in patients with gram-negative sepsis: a meta-analysis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2120-2127.
43. Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharmacol Ther* 2001; 26: 319-329.
44. Angus DC, Burgner D, Wunderink R, at al. The PIRO concept : P is for predisposition. *Critical Care* 2003;7:248-251.
45. Schröder NWJ, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:156-164.
46. Vincent JL, Opal S, Torres A at al. The PIRO concept : I is for infection. *Critical Care* 2003;7:252-255.
47. Vidaur L, Rodriguez A, Rello J. Antibiotic therapy for sepsis, severe sepsis, and septic shock: The “Tarragona” strategy. In Vincent JL (ed) *Year Book of Intensive Care and Emergency Medicine* 2004, Springer Verlag, Berlin, 2005 s: 229-241.
48. Jaimes F, Arango C, Ruiz G , et al. Predicting bacteremia at the bedside. *Clin Infect Dis* 2004; 38:357-362.

49. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 444-465.
50. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990's: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology , and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997; 24:584-602.
51. Aygün G, Tabak F, Öztürk R, Aktuğlu Y (eds). Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar kitabında. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:31, 2002 :131-140.
52. Munford RS. Sepsis, severe sepsis, and septic shock. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6.th ed, Elsevier Churchill Livingstone , Philadelphia, 2005:906-926.
53. York MK, Henry M, Gilligan P. Blood cultures: General detection and interpretation. In Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2th ed, ASM Press, Washington D.C., 2004: 3. 4 .1-15.
54. Magadia RR, Weinstein MP. Laboratory diagnosis of bacteremia and fungemia. Infect Dis Clin North America 2001; 15: 1009-1024.
55. Kurt C, Yılmaz M, Mete B, ve ark. Yanlış pozitif kan kültürü oranları ve laboratuvar maliyeti. KLİMİK XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 16-20 Kasım 2005, Antalya. KLİMİK Dergisi 2005; 18 (Özel Sayı): 213.
56. Öztürk R. Damar içi kateterlere bağlı enfeksiyonlar ve korunma. Doğanay M, Ünal S (ed). Hastane İnfeksiyonları kitabında. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2003: 489-517.
57. Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. Clin Infect Dis 2001; 32: 1249-1272.
58. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. N Engl J Med 1977; 296: 1305-1309.

59. Raad I, Hanna HA, Alakech B, Chatzinikolaou I, Johnson MM, Tarrand J. Differential time to positivity : a useful method for diagnosing catheter-related bloodstream infections. *Ann Intern Med* 2004; 140:18-25.
60. Aygün G, Karaşahin K, Dikmen Y, ve ark. Yoğun bakım ünitesinde periferik venöz kateterlerin infeksiyon yönünden değerlendirilmesi . *Flora Dergisi* 2004; 9:43-46.
61. Reed CR, Sessler CN, Glauser FL, et al. Central venous catheter infections : concepts and controversies. *Intensive Care Med* 1995; 21:177-183.
62. Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, et al. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004;4:751-760.
63. Bauer V, Sotníková R. Nitric oxide – the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen Physiol Biophys* 2010; 29 : 319–340.
64. Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler HT. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulus Travma Derg* 2004;10: 149-159.
65. Loscalzo J. The Identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 2013; 113: 100–103.
66. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 879-886.
67. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y ve ark. Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)’ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001; 10: 226-236.
68. Eroğlu L. Nitrik oksit : genel özellikleri. *ANKEM Derg* 1999; 13: 370-373.
69. Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5: 473-480.
70. Wallace JL. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (Suppl 1): 5-9.
71. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1141-1151.
72. Murad F. Nitric oxide: the coming of second messenger. *Rambam Maimonides Med J* 2011; 2: e0038. doi: 10.5041/RMMJ.10038.

73. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med* 1998; 19:221-357.
74. PA Marsden, Heng HH, Scherer SV, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-17488.
75. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199: 8-17.
76. İnan S. Diyabetik Retinopati ve Nitrik Oksit. *Kocatepe Tıp Derg* 2015; 16: 57-66.
77. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685.
78. Shoji M, Tsutaya S, Saito R, et al. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci* 2000; 66: 2557-2562.
79. Jachymova M, Horky K, Bultas J, et al. Association of the Glu298Asp Polymorphism in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene with Essential Hypertension Resistant to Conventional Therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 426-430.
80. Kim JU, Chang HK, Lee SS, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1083-1087.
81. Nagase S, Suzuki H, Wang Y, et al. Association of eNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. *Mol Cell Biochem.* 2003; 244: 113-118.
82. Syed R, Biyabani MU, Prasad S, et al. Correlation and Identification of variable number of tandem repeats of eNOS gene in coronary artery disease (CAD). *Saudi J Biol Sci* 2010 ; 17:209-213.

83. Mehrab-Mohseni M, Tabatabaei-Malazy O, Hasani-Ranjbar S, et al. Endothelial nitric oxide synthase VNTR (intron 4 a/b) polymorphism association with type 2 diabetes and its chronic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 91: 348-352.
84. Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Exon 7 Polymorphism, Ischemic Cerebrovascular Disease, and Carotid Atheroma. *Stroke* 1998; 29: 1908-1911
85. Angus DC, Wax RS: Epidemiology of sepsis: An update, *Crit Care Med*, 29 (Suppl.7) 2001; 109-16
86. Hack EC, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: Source of and a target for Inflammation. *Crit Care Med* .2001; 29 :21-25.
87. Derek C. Angus, MPH, FCCM; Walter T. Linde-Zwirble; Jeffrey Lidicker, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *FCCM Crit Care Med* 2001; 29: 1303-10
88. Fidancı Ş. Yüksek lisans tezi.eNOST786C ve g894t polimorfizmlerinin koroner arter hastalığında risk olarak değerlendirilmesi. Mersin üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. 2012.
89. Luna GI, Silva ICR, Sanchez MN. Association between -308G/A TNFA Polymorphism and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Journal of Diabetes Research* Volume 2016, Article ID 6309484, 6 pages.
90. Ma, Penglin, et al. "Endothelial nitric oxide synthase 894G→ T but not– 786T→ C gene polymorphism is associated with organ dysfunction and increased mortality in patients with severe sepsis." *J Trauma* 2011; 71: 872-877.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Mustafa ÖZKAN'a ait "Acil Servise Başvuran Sepsis ve Septik Şoktaki Hastalarda e NOS (Endotelial Nitrik Oksitaz) ve TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa) Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Acil Tıp Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 14/04/2016

Başkan Prof. Dr. Ömer Lavant Aygün İmza 

Üye Prof. Dr. Nurullah Gony İmza 

Üye Prof. Dr. Zeynep Keleş İmza 