

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT PANKREATİTLİ HASTALARDA NOD2
GEN VARYANT SIKLIĞI VE BAKTERİYEL
TRANSLOKASYON ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Mehmet ÖZBEK
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. M. Murat HARPUTLUOĞLU**

MALATYA-2017

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT PANKREATİTLİ HASTALARDA NOD2 GEN VARYANT
SIKLIĞI VE BAKTERİYEL TRANSLOKASYON ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Mehmet ÖZBEK
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. M. Murat HARPUTLUOĞLU**

Bu tez İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015/95 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.Akut Pankreatit Tanısı.....	2
2.2.Akut Pankreatit Başlangıç Tanımı	2
2.3.Akut Pankreatit Türleri.....	2
2.3.1.İnterstisyel Ödemli Pankreatit.....	2
2.3.2. Nekrotizan Pankreatit	3
2.3.2.1. Enfekte Pankreas Nekrozu	3
2.4.1.Organ Yetmezliği Tanımı	3
2.4.2.Lokal Komplikasyonlar	4
2.4.2.1.Pankreatik ve Peripankreatik Koleksiyonlar	4
2.4.2.2.Akut Peripankreatik Sıvı Toplanması.....	4
2.4.2.3.Pankreas Psödokisti	4
2.4.4. Akut nekrotik koleksiyon	5
2.4.2.5. Duvarlı Nekroz.....	5
2.4.2.6.Enfekte Nekroz.....	6
2.5. Akut Pankreatitin Aşamaları.....	6
2.5.1.Erken Evre	6
2.5.2. Geç Evre	7
2.6.Akut Pankreatitin Şiddetinin sınıflaması	7
2.6.1.Hafif Akut Pankreatit	7
2.6.2.Orta Derecede Şiddetli Akut Pankreatit	8
2.6.3.Şiddetli Akut Pankreatit.....	8
2.7. Akut Pankreatitte Patogenez	8
2.8 Akut Pankreatit ve İntestinal Mukoza Bariyeri.....	9

2.9. Bakteriyal Translokasyon	10
2.9.1.İntestinal Geçirgenlik Artışı ve İmmunolojik Zayıflama.....	10
2.9.2.İntestinal Bakteriyal Overgrowth (İBO)	11
2.9.3.Bakteriyal Translokasyonun Tanı Metotları	11
2.9.4.Bakteriyal Translokasyonun Klinik Sonuçları	12
2.10.NOD 2 Geni	12
2.11.Akut Pankreatitte Sitokinler.....	13
2.11.1.Tümör nekrozis Faktör Alfa.....	14
2.11.2.İnterlökin-6	14
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1.Gruplardaki Hasta Sayılarının Belirlenmesi	15
3.2.Klinik Örneklerin Toplanması	15
3.3.Moleküler Yöntemler	16
3.3.1.NOD2 Gen Mutasyonlarının Tespiti	16
3.3.2.Baz dizi analizi.....	17
3.4.Elisa Kitlerinin Çalışılması.....	17
3.5. İstatistik	19
4.BULGULAR	20
5.TARTIŞMA.....	25
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR.....	30

TEŐEKKÖR

İhtisas sürem boyunca yetişmemde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli anabilim dalı başkanımız Prof. Dr Emin Tamer ELKIRAN'a, tezimin şekillenme aşamasından bitiş aşamasına kadar her türlü yardım ve desteği veren değerli hocam Prof. Dr. Murat HARPUTLUOğLU'na, tezin ölçüm çalışmalarına özveriyle destek veren Prof. Dr. Barış OTLU'ya, tezimi 2015/95 proje numarası ile maddi açıdan destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, asistanlık eğitimim boyunca geniş bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tüm hocalarımıza, değerli uzmanlarımıza ve asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Yıllarca beraber çalıştığımız doktor arkadaşlarıma, tüm hemşirelerimize, personelimize, kliniğimizde görev almış tüm çalışanlara sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Akut Pankreatitli Hastalarda NOD2 Gen Varyant Sıklığı ve Bakteriyel Translokasyon

Giriş ve Amaç: Şiddetli akut pankreatit gelişiminde barsak bariyer disfonksiyonları patogeneizde sorumlu etkenlerden birisidir. NOD2 intestinal savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan bir proteindir. Çalışmamızın amacı şiddetli ve hafif pankreatitli hastalar arasında NOD2 varyant sıklığının araştırılması idi.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda üç grup vardı. Grup 1 sağlıklı kişilerdi. Grup 2 ve Grup 3 Atlanta 2012 sınıflamasına göre hafif ve şiddetli pankreatitli hastalardan oluşturuldu. Tüm gruplarda 4 adet NOD2 varyant sıklığı ile birlikte serumda IL-6, TNF- α ve LBP düzeyleri çalışıldı.

Bulgular: İki mutasyon (p.G908R ve c.3020insC) herhangi bir grupta saptanmadı. Çalışmamızda p.R702W varyantı şiddetli pankreatit grubunda 3 hastada (3/32,% 9.4) pozitif, ancak bu varyant diğer iki grupta negatif. 1007fs mutasyonu sağlıklı grupta 1 kişide (1/27, %3.7), hafif pankreatitli grupta 3 (3/36,%8.3), şiddetli pankreatitli grupta ise 3 (3/32, %9.4) kişide saptandı. Gruplar arasında NOD2 varyantları açısından anlamlı farklılık yoktu. Şiddetli pankreatit grubunda serum IL-6, TNF- α ve LBP düzeyleri sağlıklı gruptan ve hafif pankreatitli gruptan anlamlı şekilde yüksekti (her ikisi de $p<0.001$).

Sonuç: Bulgularımız şiddetli pankreatit ve p.R702W varyantı arasında kuvvetli bir ilişki olabileceğini desteklemektedir. İnflamatuvar sitokin düzeyleri ile NOD2 varyantları arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için akut pankreatitli hastalarda çok daha fazla NOD2 varyantı araştırmak yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Akut pankreatit, bakteriyel translokasyon, NOD2.

SUMMARY

NOD2 Gene Variant Frequency and Bacterial Translocation in Patients with Acute Pancreatitis

Introduction and Aim: Intestinal barrier dysfunctions are one of the responsible factors in pathogenesis of severe acute pancreatitis. NOD2 is a protein that plays an important role in intestinal defense mechanisms. The aim of our study was to investigate the frequency of NOD2 variants among patients with severe and mild acute pancreatitis.

Materials and Methods: There were three groups in our work. Group 1 was healthy. Group 2 and Group 3 were composed of mild and severe pancreatitis patients according to the Atlanta 2012 classification. In all groups, 4 NOD2 variant frequencies and serum IL-6, TNF- α and LBP levels were studied.

Results: Two mutations (p.G908R and c.3020insC) were not detected in any group. In our study, p.R702W variant was positive in 3 patients (3/32, 9.4%) in severe pancreatitis group, but this variant was negative in the other two groups. 1007fs variant was positive in 3, 3 and 1 patient in mild (3/36, 8.3%) and severe pancreatitis (3/32, 9.4%) groups, and in healthy group (1/27, 3.7%), respectively. There was no significant difference for p.R702W and 1007fs variants between mild and severe pancreatitis group. Serum IL-6, TNF- α and LBP levels were significantly higher in the severe pancreatitis group than in the healthy group and mild pancreatitis group (both $p < 0.001$).

Conclusion: Our results support that may be a strong relationship between the presence of p.R702W variant and severe pancreatitis. To elucidate the association between levels of inflammatory cytokines and NOD2 variants, it may be useful to investigate much more NOD2 variants in patients with acute pancreatitis.

The keywords: Acute pancreatitis, bacterial translocation, NOD2.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BT	: Bakteriyel Translokasyon
GİS	: Gastrointestinal Sistem
IL-6	: İnterlökin 6
LBP	: Lipopolisakkarit Binding Protein
LPS	: Lipopolisakkarit
MDP	: Muramyl Dipeptid
MLN	: Mezenterik Lenf Nodları
NF- κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NOD2	: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Containing 2
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
RES	: Retiküloendotelyal Sistem
TLR	: Tool-like Reseptör
TNF-α	: Tümör Nekrosiz Faktör-alfa
AP	: Akut pankreatit
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
CT	: Bilgisayarlı tomografi
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MOF	: Çoklu organ yetmezliği
GVHH	: Graft Versus Host Hastalığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. p.R.702W primer problemlerinin NOD2 geni üzerinde şematik gösterimi..	17
Şekil 3.2. p.G908R primer problemlerinin NOD2 geni üzerinde şematik gösterimi....	18
Şekil 3.3. c.3020insC primer problemlerinin NOD2 geni üzerinde şematik gösterimi	18
Şekil 3.4. 1007fs primer problemlerinin NOD2 geni üzerinde şematik gösterimi.....	19
Şekil 4.1. Real-time PCR ile p.R702W mutasyonun araştırılması	21
Şekil 4.2. Real-time PCR ile p.G908R mutasyonun araştırılması.....	22
Şekil 4.3. Real-time PCR ile 1007fs mutasyonun araştırılması.....	22



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Marshal skorlama tablosu	3
Tablo 4.1 Gruplara göre yaş ve cinsiyet ortalamaları.....	20
Tablo 4.2 Cinsiyet ile akut pankreatit şiddeti ve NOD2 gen aleli arasındaki ilişki.....	20
Tablo 4.3. Akut pankreatit şiddeti ile NOD2 gen sıklığı arasındaki ilişki.....	21
Tablo 4.4. Gruplara göre NOD2 risk varyantları arasındaki ilişki.....	23
Tablo 4.5. Gruplara göre serum IL-6, TNF- α ve LBP düzeylerinin ortalamaları..	24



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Şiddetli akut pankreatitin yönetimi ve tedavi yöntemlerindeki önemli gelişmelere rağmen, şiddetli akut pankreatit halen enfeksiyonlardan ve kontrolsüz inflamatuvar cevaplardan kaynaklanan yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir (1). Günümüzde hangi hastaların şiddetli akut pankreatite ilerleyeceğini tahmin eden belli bir moleküler veya genetik belirteç yoktur. Son yıllarda, şiddetli akut pankreatit klinik seyrinde iki farklı periyot olduğu kabul edilmiştir. İlk 1-2 haftalık dönemde, ağır sistemik inflamatuvar yanıt sendromu pankreatik ve peripankreatik dokuların otosindirimine neden olur. Bu ilk periyodun ardından anti-inflamatuvar faz başlar. Bu ikinci periyotta, hastalar bağırsak bariyer disfonksiyonunun bir sonucu olarak enfekte pankreatik ve peripankreatik nekroz, sepsis ve mortalite riski ile karşı karşıya kalmaktadırlar (2). Ağır akut pankreatitli hastalarda hastaneye yatış gününde bile, gram-negatif enterik bakterilerden kaynaklanan önemli ölçüde yüksek endotoksin seviyeleri tespit edilmiştir. Ek olarak, bu hastalarda endotoksemi ve artan mortalite oranı arasında sıkı bir korelasyon gözlemlenmiştir (3). Tüm bu veriler, bağırsak bariyerinin akut pankreatitin seyrinde önemli rol oynadığını göstermektedir.

Son yıllarda, pankreas enfeksiyonu ve sepsisin ana nedeni olarak bakteri translokasyonu gösterilmiştir (4). Şiddetli akut pankreatitli hastalarda motilite değişiklikleri, barsak bakteriyel aşırı çoğalma ve immünsüpresyon, bakteriyel translokasyon gelişiminde ana mekanizmalardır (4). Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Containing 2 (NOD2) geni sitozolik bir proteindir. Bu protein bakteriyel hücre duvarı komponenti olan muramyl dipeptid (MDP)'i tanır ve konak defansının doğal yolunu aktifler. Bu da Nucleer factor (NF)- κ B'yi aktive eder ve sonuçta TNF- α and interleukin-6 indüklenir (5). Normalde, NOD2, α -defensinlerin indüklenmesi ve peptidoglikana makrofaj cevabına aracılık eden Toll-like 2 reseptörlerin düzenlenmesi gibi intestinal savunma mekanizmalarının düzgün çalışmasında önemli rol oynamaktadır. NOD2 varyantlarının bu savunma mekanizmalarını bozduğu gösterilmiştir (5,6). İnsanlarda akut pankreatitin seyrinde NOD2 varyantlarının etkileri hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır (7). Biz bu çalışmada, hafif ve şiddetli akut pankreatitli hastalarda NOD2 varyantlarının sıklığını araştırmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Akut Pankreatit Tanısı

Akut pankreatit tanısı için aşağıdaki üç özellikten ikisi gereklidir:

- (1) Akut pankreatit ile uyumlu karın ağrısı; akut başlangıçlı, kalıcı, şiddetli, genellikle sırta yayılan epigastrik ağrı olmalıdır.
- (2) Serum lipaz aktivitesi (veya amilaz aktivitesi) normalin üst sınırından en az 3 kat daha yüksek olmalıdır.
- (3) Bilgisayarlı tomografi (CT) ve Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ya da transabdominal ultrasonografide karakteristik akut pankreatit bulguları olmalıdır (8).

Karın ağrısı şiddetli ise akut pankreatit olduğunu düşündürür. Mevcut amilaz ve/veya lipaz aktivitesi yüksekliği normalin üç katından daha az olabilir, gecikmiş yanıt olabilir, bu durumda tanı için görüntüleme yapmak gerekli olacaktır. Acil serviste ya da hastaneye gelişte karın ağrısı ve serum pankreatik enzim aktivitesi artışı ile akut pankreatit tanısı konulursa, genellikle CT tanı için gerekli değildir (8).

2.2.Akut Pankreatit Başlangıç Tanımı

Akut pankreatit başlangıcı hastanın hastaneye başvuru zamanı değildir, karın ağrısının başlama zamanıdır. Karın ağrısının başlangıcı ile hastaneye yatış arasındaki zaman aralığına dikkat edilmelidir (8).

2.3.Akut Pankreatit Türleri

Akut pankreatit ikiye ayrılır: İnterstisyel ödemli pankreatit ve nekrotizan pankreatit (8).

2.3.1.İnterstisyel Ödemli Pankreatit

Akut pankreatit hastalarının büyük çoğunluğunda pankreasın genişlemesiyle oluşan inflamatuvar ödem vardır. CT’de pankreas parankimi nispeten homojen dağılım gösterir ve peripankreatik alanda inflamatuvar değişiklikleri gözlenir. Ayrıca biraz peripankreatik sıvı olabilir. İnterstisyel ödemli pankreatit genellikle ilk hafta içinde düzelir.(8).

2.3.2. Nekrotizan Pankreatit

Hastaların yaklaşık% 5-10'unda pankreatik parankim, peripankreatik doku ya da her ikisinde birden nekroz gelişir. Pankreas perfüzyonunda bozulma ve peripankreatik nekroz belirtileri birkaç gün içinde gelişmeye başlar (8).

2.3.2.1. Enfekte Pankreas Nekrozu

Pankreas ve peripankreatik nekroz steril kalabilir ya da enfekte olabilir. Bulguların çoğunda nekrozunun çapı ile enfeksiyon riski ve semptomların süresi arasında mutlak korelasyon saptanamamıştır. Enfekte nekroz ilk hafta boyunca nadirdir.(8).

Enfekte pankreas nekrozu tanısı önemlidir. Çünkü enfekte pankreas nekrozunda antibiyotik tedavisi gereksinimi ve acil müdahale ihtiyacı vardır. CT de pankreas ve / veya peripankreatik dokular içinde ekstraluminal gaz olduğunda ya da perkütan ince iğne aspirasyon (FNA) ile alınan kültürde Gram boyamada bakteri ve / veya mantar pozitifliğinde enfeksiyon tanısı konur (8).

2.4.Akut Pankreatit Komplikasyonları

2.4.1.Organ Yetmezliği Tanımı

Solunum, kardiyovasküler ve böbrek sistemleri organ yetmezliğini tanımlamak için değerlendirilmelidir.

Organ yetmezliği modifiye Marshall skorlama sistemine göre (Tablo 1) bu üç organ sisteminden birisinin 2 ya da daha yüksek bir puan alması olarak tanımlanmaktadır (8).

Tablo 2.1. Marshal skorlama tablosu

Kardiyovasküler sistem	Solunum sistemi (PaO ₂ /FiO ₂ oranı)	Renal sistem (Kreatinin)	Puanlama
>90 mmHg	>400	<1.4 mg/dL	0
<90 mmHg (sıvı tedavisine cevaplı)	301-400	1.4-1.8 mg/dL	1
<90 mmHg (sıvı tedavisine cevapsız)	201-300	1.9-3.6 mg/dL	2
<90 mmHg ve pH <7.3	101-200	3.6-4.9 mg/dL	3
<90 mmHg ve pH <7.2	≤101	>4.9 mg/dL	4

2.4.2.Lokal Komplikasyonlar

Lokal komplikasyonlar; akut peripankreatik sıvı toplanması, pankreas psödokisti, akut nekrotik koleksiyon ve duvarlı nekrozdur. Diğer lokal komplikasyonlar mide çıkış disfonksiyonu, dalak ve portal ven trombozu ve kolon nekrozudur. Tekrarlayan veya nüks karın ağrısı, serum pankreas enzim aktivitesinin ikinci kez artışı, artan organ yetmezliği, ateş ve lökositoz gibi sepsis klinik belirtileri olduğunda lokal komplikasyonlar akla gelmelidir. Bu gelişmeler olduğu takdirde akut lokal komplikasyonların morfolojik özelliklerini saptamak için CT çekilmeli, pankreas ve peripankreatik koleksiyonlar tarif edilmelidir. Konumu (pankreas, Peripankreatik, diğer), içeriği (sıvı, katı, gaz) ve herhangi bir duvarın kalınlığı (ince veya kalın) tarif edilmelidir (8).

2.4.2.1.Pankreatik ve Peripankreatik Koleksiyonlar

Mevcut sınıflandırmada; sadece sıvı komponent içeren ile solid komponent ve nekroz içeren koleksiyonlar arasında önemli bir ayrım yapılmıştır. Akut peripankreatik sıvı koleksiyonu interstisyel ödematöz pankreatitte meydana gelir. Pankreas psödokisti, interstisyel ödematöz pankreatitin gecikmiş bir (genellikle > 4 hafta) komplikasyonudur. Nekroz erken dönemde oluşan akut nekrotik koleksiyon ya da radyolojik olarak tanımlanabilen 4 haftaya kadar oluşan duvarlı nekroz şeklinde tanımlanabilir (8).

2.4.2.2.Akut Peripankreatik Sıvı Toplanması

Sıvı koleksiyonları genellikle pankreatitin erken döneminde gelişir. CT'de tanımlanmış bir duvarı yoktur, homojendir, retroperitonda normal fasyalar tarafından sınırlandırılmıştır ve çoklu olabilir. Çoğu akut sıvı koleksiyonu steril kalır ve genellikle kendiliğinden iyileşir. Lokalize koleksiyonlar 4 haftadan sonra devam ederse, akut pankreatitte nadir bir olay olmasına rağmen pankreatik psödokist gelişebilir. Sıvı koleksiyonları asemptomatik kalır veya kendiliğinden iyileşir, tedavi gerektirmez ve şiddetli akut pankreatit oluşturmazlar (8).

2.4.2.3.Pankreas Psödokisti

Pankreas psödokisti peripankreatik dokularda bir sıvı toplanması olarak tanımlanır (zaman zaman kısmen veya tamamen pankreas içinde de olabilir). Bir pankreas psödokisti iyi tanımlanmış bir duvarla çevrilidir ve esasen hiç solid komponent

içermez. Tanı genellikle bu morfolojik kriterler ile yapılabilir. Kist içeriğinin aspirasyon yapılırsa, genellikle belirgin amilaz aktivitesi artışı vardır (8).

Bir pankreas psödokistinin pankreas parankim nekrozu olmadan ana pankreas kanalında ya da pankreas içi dallarındaki bozulmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Büyük miktar sıvı dolu boşluk içinde belirgin katı nekrotik materyal olduğunda psödokist terimi kullanılmamalıdır (8). CT psödokisti tanımlamak için en sık kullanılan görüntüleme yöntemi olmasına rağmen, koleksiyonda katı içeriği yokken tanıyı doğrulamak için MRG veya ultrasonografi kullanılır (8).

2.2.4. Akut nekrotik koleksiyon

İlk 4 hafta görülür. Akut nekrotik koleksiyon değişken miktarlarda sıvı ve nekrotik doku miktarı içermesi ile akut peripankreatik sıvı koleksiyonundan ayrılır (8). Nekroz pankreas parankimi ve / veya peripankreatik dokularda ortaya çıkabilir. CT'de, akut pankreatik ve peripankreatik nekrotik koleksiyonlar çeşitli miktarlarda solid nekrotik materyal ve sıvı içerir. Bu koleksiyonlar multiple olabilir ve loküle görünebilir. Akut nekrotik koleksiyon, akut peripankreatik sıvı koleksiyonu değildir. Çünkü akut nekrotik koleksiyon nekrotizan pankreatitte oluşur ve nekrotik doku içerir. Bir akut nekrotik koleksiyon parankimal nekroz bölgesi içinde ana pankreatik kanalın bozulması ile ilişkili olabilir ve enfekte olabilir (8).

Ardışık görüntüleme yapmak akut koleksiyonlarının karakteri için yararlı olabilir. Hastalığın ilk haftası içinde, akut nekrotik koleksiyonu akut peripankreatik sıvı koleksiyonundan ayırt etmek zor olabilir. Bu aşamada, her iki koleksiyon türü sıvı yoğunluklu alanlar olarak görülebilir. İlk haftadan sonra, bu iki önemli koleksiyon tipi arasındaki ayrım netleşir. Nekrozun bu aşamasında, peripankreatik koleksiyon pankreasın parankimal nekrozuyla ilişkilidir. MRG, transkutanöz ultrasonografi veya endoskopik ultrasonografi koleksiyondaki solid madde içeriğini doğrulamada yararlı olabilir (8).

2.4.2.5. Duvarlı Nekroz

Duvarlı nekroz, içinde reaktif doku duvarı bulunan nekrotik dokudan oluşur. Duvarlı nekroz matürdür, pankreatik ve/veya peripankreatik nekrozun kapsüllü koleksiyonudur ve iyi tanımlanmış olan inflamatuvar duvarı vardır. Genellikle nekrotizan pankreatit başlamasından 4 hafta sonra oluşur (8).

Duvarlı nekroz enfekte olabilir, birden fazla olabilir , pankreastan uzak alanlarda görülebilir. CT’de sıvı içerikten katıyı ayırt etmek kolay olmayabilir, bu nedenle CT’de pankreatik ve peripankreatik nekroz, pankreatik psödokist ile karışabilir. Bu ayrımı yapmak için MRG, transabdominal ultrasonografi veya endoskopik ultrasonografi kullanılabilir (8).

2.4.2.6.Enfekte Nekroz

Bir akut nekrotik koleksiyon veya duvarlı nekrozda enfekte nekroz gelişebilir. Hastanın klinik seyrinden veya CT’de görülen koleksiyon içindeki gazın varlığı ile enfekte nekroz gelişiminden şüphelenilir. Bu ekstraluminal gaz nekroz alanları içinde mevcuttur. Şüpheli hallerde kültür için ince iğne aspirasyonu yapılabilir, ancak bazı serileri göstermiştir ki, enfekte nekrozların büyük çoğunluğu ince iğne aspirasyon olmadan tedavi edilebilir. Özellikle perkütan drenaj tedavi algoritmasının parçasıdır (8).

2.5. Akut Pankreatitin Aşamaları

Bu dinamik hastalığın erken ve geç evre olarak örtüşen iki evresi vardır. Genellikle erken evre ilk haftada gözlenir, geç evre haftalar veya aylar sürebilir (8).

2.5.1.Erken Evre

Genellikle ilk haftadır ancak ikinci haftaya uzayabilir. Sitokin kaskadlar pankreas tarafından aktive edilir. Sistemik inflamatuvar Response (yanıt) Sendromu (SIRS) ortaya çıkar. Ne zaman SIRS kalıcı olursa, organ yetmezliği gelişme riski vardır. Erken dönemde akut pankreatit şiddetinin belirleyicisi öncelikle organ yetmezliğinin varlığı ve süresidir. Organ yetmezliği 48 saat içinde düzelse geçici, 48 saat içinde düzelmezse 'Kalıcı organ yetmezliği' olarak tarif edilir. Organ yetmezliği birden fazla organı etkilerse, buna çoklu organ yetmezliği (MOF) denir (8).

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS)

Aşağıdaki iki veya daha fazla kriterin varlığı ile SIRS tanımlanır.

- Kalp hızı >90 atım / dk
- Vücut sıcaklığı <36 °C veya >38 °C
- Beyaz kan sayımı <4000 veya > 12000 / mm³
- Solunum sayısı > 20 / dakika veya PCO₂ <32 mm Hg (8).

Nekroz ve diğer lokal komplikasyonlar erken dönemde hastalığın şiddeti ile direkt olarak orantılı değildir. Bu nedenle, erken dönemde akut pankreatitin şiddeti organ yetmezliği varlığı ve süresine bağlıdır (8).

2.5.2. Geç Evre

Geç evre inflamasyonun sistemik belirtilerinin devam etmesi veya lokal komplikasyon varlığı ile karakterizedir. Tanım olarak, geç evre yalnızca orta şiddette ya da şiddetli akut pankreatitli hastalarda gözlenir. Lokal komplikasyonlar geç evrede gelişir. Lokal komplikasyonların farklı morfolojik özelliklerini radyolojik görüntüleme ile ayırt etmek önemlidir. Kalıcı organ hasarı şiddetin temel belirleyicisidir, ancak geç fazda akut pankreatit karakterizasyonu için hem klinik ve hem morfolojik kriterler gereklidir (8).

2.6.Akut Pankreatitin Şiddetinin sınıflaması

Akut pankreatiti erken tanımak ve ciddiyetini derecelendirmek önemlidir. Çünkü potansiyel olarak şiddetli akut pankreatit tespit edilen hastalar için agresif erken tedavi gereklidir. İkinci olarak ikinci basamakta klinisyenlerin mümkün olduğunca uzman bakımı gerektiren bu tür hastaları tespit etmeleri ve üçüncü basamağa sevk etmeleri gerekir. Bu tür hastaları sınıflandırmak bize tedavide avantaj sağlar (8).

2012 Atlanta sınıflandırmasında akut pankreatit şiddetine göre hafif, orta şiddetli ve şiddetli akut pankreatit olmak üzere üç gruba ayrılır. Bu sınıflandırma geçici organ yetmezliğini, kalıcı organ yetmezliğini ve lokal veya sistemik komplikasyonları içerir. Geçici organ yetmezliğinde mevcut organ yetmezliğinin süresi 48 saatin altındadır. Kalıcı organ yetmezliğinde bu süre 48 saatin üzerindedir. Sistemik komplikasyonlar altta yatan komorbid faktörlerin alevlenmesi ile ilişkili olabilir iken, lokal komplikasyonlar peripankreatik sıvı koleksiyonları ve akut nekrotik koleksiyonu içerir.(8).

2.6.1.Hafif Akut Pankreatit

Hafif akut pankreatit organ hasarı, lokal veya sistemik komplikasyonların olmaması ile karakterizedir. Hafif akut pankreatitli hastalar genellikle erken dönemde iyileşir. Hafif akut pankreatiti olan hastalarda genellikle pankreas görüntülemesi gerekmez ve hafif akut pankreatite bağlı mortalite gözlenmez (8).

2.6.2.Orta Derecede Şiddetli Akut Pankreatit

Orta derecede şiddetli akut pankreatit geçici organ yetmezliği ya da lokal veya sistemik komplikasyonların varlığı ile karakterizedir. Kalıcı organ yetmezliği yoktur.

2.6.3.Şiddetli Akut Pankreatit

Şiddetli akut pankreatit kalıcı organ yetmezliği ile karakterizedir. Erken dönemde gelişen organ yetmezliği SIRS'de oluşan sitokin kaskadların aktivasyonu ile ortaya çıkar. SIRS ortaya çıktığında ve kalıcı olduğunda, kalıcı organ yetmezliği ve komplikasyon riski vardır, bu hastalar şiddetli akut pankreatit gibi tedavi edilmelidir. Kalıcı organ yetmezliği tek veya çoklu organ yetmezliği şeklinde olabilir. Kalıcı organ yetmezliği olan hastalarda genellikle bir tane ya da daha fazla lokal komplikasyon vardır (8).

Kalıcı organ yetmezliği gelişen hastalar, hastalığın ilk birkaç günü içinde artmış ölüm riski altındadır. Bu hastalarda % 36-50 oranında artmış ölüm riski bildirilmiştir. Kalıcı organ yetmezliği ile birlikte enfekte nekroz gelişen hastalarda son derece yüksek bir mortalite saptanmıştır (8).

2012 Atlanta sınıflamasına göre şiddetin sınıflaması (8)

►Hafif akut pankreatit

- Hiçbir organ yetmezliği yok
- lokal veya sistemik komplikasyonlar bulunmaz

► Orta şiddetli akut pankreatit

- 48 saat içinde düzelen Organ yetmezliği (geçici organ yetmezliği) ve / veya
- Kalıcı organ yetmezliği olmadan lokal veya sistemik komplikasyonlar

► Şiddetli akut pankreatit

- Kalıcı organ yetmezliği (> 48 saat)
 - Tek Organ yetmezliği
 - Birden çok Organ yetmezliği (8).

2.7. Akut Pankreatitte Patogenez

Akut pankreatitin patogenezini ile ilgili önemli teoriler, enzim aktivasyon teorisi, kinin ve kompleman sistem aktivasyon teorisi, mikrosirkülasyon bozukluk teorisi, aşırı

lökosit aktivasyonu teorisi, ortak kanal teorisi, pankreatik oto sindirim teorisi, safra taşı migrasyon teorisi, pankreatik asiner hücre apoptozisi ve nekrozu teorisidir. Bunlardan ortak kanal teorisi ve safra taşı migrasyon teorisi ön plandadır. Koledok daralması sonucunda pankreatik kanal basınç artışı, safra reflüsü, tripsin aktivasyonu ve pankreatik otosindirim gerçekleşir (9,10). Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS); lokalize inflamasyonun kontrol altına alınamamasına bağlı olarak inflamatuvar hücrelerin ve mediyatörlerin kontrolsüz aşırı aktivasyonu olarak tanımlanmaktadır (11,12).

Tripsinin proinflamatuvar kaskad sistemlerini aktive etmesiyle ciddi akut inflamatuvar reaksiyon ve çeşitli akut faz reaktanları ortaya çıkar. Proelastaz, kimotripsinojen, prokarboksipeptidaz ve fosfolipaz A2 gibi pankreatik proenzimlerin tripsin ile aktivasyonu otosindirime neden olur (13,14).

İnflamatuvar sürecin temelinde interlökinler (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve IL-18) ve Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α)'nın salınımı vardır (15-18). Bunlar sistemik inflamatuvar yanıt sendromunda (SIRS) yer almaktadır ve multiorgan yetmezliğine neden olmaktadır (15,18). TNF- α ve IL-1 β , sistemik dolaşıma portal ven ve lenfatik sıvı drenajı aracılığı ile katılır. Karaciğerdeki C-reactive protein (CRP) ve prokalsitonin gibi akut faz proteinlerinin sentezi IL-6 tarafından sağlanır (15). IL-1 ve IL-6 uyarısı ile CRP sentezlenir, CRP ağrının başlangıcından sonraki 3. gün ve devamında serum pik değerine ulaşır (15).

2.8 Akut Pankreatit ve İntestinal Mukoza Bariyeri

Barsak mukozası, sindirim komponentlerinin emilmesini sağlar. Epitelyal hücre proliferasyonu, diferansiyasyon, migrasyon ve apoptosiz tarafından barsak mukozasının bütünlüğü sağlanır (19). Akut pankreatitin şiddetindeki tetikleyici faktörler sekonder bakteriyel enfeksiyonlar ve endotoksemdir. (20). Bu nedenle intestinal bakteriyel translokasyon ile pankreatik nekroz ve enfeksiyon arasında kuvvetli bir ilişki vardır (21). Bakteriler ve toksin gibi zararlı maddelerin barsak duvarına penetrasyonunun engellenmesi ve buna bağlı olarak vücut içi stabilitesinin korunması intestinal mukoza bariyeri tarafından sağlanır (20).

Ciddi akut pankreatit, travma, operasyonlar, radyoterapi, kemoterapi ve ciddi enfeksiyonlar gibi durumlarda hücrelerarası bağlantılarda hasarlanma ve apoptotik hücrelerde artma, intestinal mukoza mikrovillüslerinde dökülme, mikrovillüs alanlarının genişliğinde ve yüksekliğinde anlamlı düzeyde azalma olur. İntestinal geçirgenlikteki

bu artış sonucu, bakteri ve endotoksin translokasyonu gerçekleşir. Akut pankreatit hastalarındaki ana ölüm nedeni olan multiple organ yetmezliği, bakteri ve lipopolisakkaritlerin sistemik dolaşıma katılması ve pankreatik dokunun sekonder enfeksiyonu sonrası gelişir (20,22).

2.9. Bakteriyal Translokasyon

Şiddetli akut pankreatitte çoğu komplikasyon ve ölüm, pankreatik nekroz ve/veya enfeksiyona sekonder meydana gelen inflamatuvar immün yanıtlara bağlıdır. Çok sayıda veri barsağın bu immün ve inflamatuvar yanıtta önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Deneysel veriler bu yanıtta rol alan endojen sitokinlerin, endotoksin ve diğer bakteriyel ürünlerce stimüle edildiğini düşündürür. Yine deneysel çalışmalar şiddetli AP de pankreatik enfeksiyonun barsaktan mezenterik lenf nodları, peritonal sıvı, kan ve sonrasında bu yerlerden pankreasa bakterilerin translokasyonuna bağlı geliştiğini göstermektedir (23). Şiddetli akut pankreatitte bakteriyel translokasyonda (BT) ana mekanizmalar intestinal disfonksiyon, intestinal permeabilitenin bozulması ve konak immünitesi bozukluğundan dolayı enterik floranın aşırı çoğalmasıdır. Endotelial ve epitelyal bariyer enterik mikroorganizmaların invazyonuna karşı korunmada önemlidir ve multipl organ yetmezliğinin önlenmesinde rol alır (23).

2.9.1.İntestinal Geçirgenlik Artışı ve İmmunolojik Zayıflama

İntestinal epitelyum hücrelerince salgılanan müsinöz komponent ve sıkı bağlantılar (tight junctions) intestinal bariyeri oluşturur (24-27). Müsin bakterilerin enterosit mikrovillusları ile direk temas kurmasını önler. İmmunglogulin A intestinal mukus salgıları içerisinde bulunur ve bakterilerin intestinal epitelyuma yapışmasını ve kolonize olmasını engeller (28).

İntestinal immün sistem; peyer plakları, lamina propria lenfositleri (dendritik hücrelerde dahil), intraepitelyal lenfosit ve MLN'den oluşur (28).

Pankreatit kliniğinin kötüleşmesinde İntestinal geçirgenlik artışı önemli rol oynar. Yasuda ve arkadaşları intestinal geçirgenlikte tight junction proteinlerinin (ZO-1 ve occludin) değişmediğini fakat intestinal epitelyal hücrelerde apoptosizin hızlandığını göstermişlerdir (29).

İmmunglobülin A (IgA) sekresyonundaki düzensizliğin sonucu olarak, enterik mikroflora ekolojisinde bozulma, mukozal patolojik değişiklikler, intestinal

geçirgenliğin artması, endotoksemi ve iskemi/reperfüzyon hasarı oluşur. Wang ve arkadaşları, yaptıkları akut pankreatit çalışmasında, intestinal kan damarlarından gastrointestinal lümen içine radyoaktif albümin kaçışını ölçmüş ve distal ince barsak ve kolonda geçirgenliğin artmış olduğunu tespit etmişlerdir (30). Ammori ve arkadaşları, şiddetli akut pankreatit de erken intestinal geçirgenliğin önemli rol oynadığını, intestinal bariyer fonksiyonlarının korunmasının şiddetli akut pankreatit tedavisinde önem kazanacağını savunmuşlardır (31).

2.9.2.İntestinal Bakteriye Overgrowth (İBO)

İBO tanısında proximal jejunum aspiratının her bir mm³'de 10⁵ veya daha fazla bakteri kolonisinin üremesi ve jejunal aspiratın mikrobiyolojik araştırılması ile konur. İnvaziv bir test olması, birden fazla örnekleme ihtiyacı duyulabilmesi nedeniyle invaziv olmayan glikoz veya laktoz uygulaması sonrası hidrojen yada metan nefes testi pratikte daha çok kullanılır (32). İBO'nun BT'ye ilerlemesi, yavaşlamış intestinal transit zamanı, düşük asit gastrik sekresyonu, intestinal immünolojik faktörler, pankreatik ve safra sekresyonlarıyla ilişkilidir. Farelerde MLN (mezenterik lenf nodu)'de bulunan canlı bakteri sayısı ile intestinal sistemin herhangi bir segmentindeki spesifik bakteriyel yoğunluk arasında ilişki saptanmıştır (33).

2.9.3.Bakteriyel Translokasyonun Tanı Metotları

BT, MLN kültür pozitifliği olarak tanımlanmakta olup invaziv bir yöntem olması nedeniyle çok kullanılmamaktadır.

Gram (-) bakterilerde bakteri duvarının majör komponenti olan Lipopolisakkaritler (LPS) gibi bakteriyel endotoksinler karaciğerde LPS bağlayıcı proteinin sentezini (LBP) uyarır ve CD14'e bağlanan bir LPS-LBP kompleksi oluştururlar. Serum LBP düzeylerinin ölçülmesi BT da marker olarak önerilmiştir. Şu anda, BT için en uygun markır aydınlatılamamıştır (34).

Proinflatuar durumlarda ve hemodinamisi bozulmuş hastalarda LPB düzeyleri yüksek izlenmiş ve norfloksasin ile barsaktaki kontaminasyon düzeltilindiğinde LPB düzeyleri normale gelmiştir. Gutschmann ve arkadaşları LBP'nin sadece serumda çözünür bir protein olarak bulunmadığını aynı zamanda mononükleer hücrelerin sitoplazmik membranında bulunan bir transmembran proteini olarak bulunduğunu saptadılar. LBP mononükleer hücrelerdeki LPS ile indüklenen sitokinlerde artışa aracılık

edebilmektedir. Harputluoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SBP olan ve SBP olmayan hastalarda LBP düzeyleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (34).

2.9.4.Bakteriyal Translokasyonun Klinik Sonuçları

İmmün sistem doğal ve kazanılmış(adaptif) komponentlerden oluşur. Doğal immün sistem antimikrobiyal peptidler, makrofajlar, dentritik hücreler ve alternatif kompleman yolundan oluşur. Enfeksiyon sonrası hızla aktive olur ve patojenin çoğalmasını kontrol altına alır. Kazanılmış immün sistem B ve T lenfositler tarafından oluşturulur ve antijen spesifiktir. Lenfosit bir antijen ile karşılaşır, lenfositte spesifik klonal genişleme olur. Lenfositteki klonal genişleme ve bunların efektör hücrelere diferansiyasyonu üç dört günde olur (35).

PMN aktivasyonu ve hücre göçü, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interferon- γ (IFN- γ) ve nitrik oksit gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmaktadır (23).

2.10.NOD 2 Geni

NOD reseptörleri nükleotid bağımlı oligomerizasyon alanları içerir. Bu reseptörler bakteriyel patojenleri tanıma ve temizlemede önemli rol oynayan model tanıma reseptör ailesidir. NOD2 intestinal epitelyal ve mononükleer hücrelerden salgılanır. NOD2 geni sitozolik bir protein kodlar. Bu protein bakteriyel hücre duvarı komponenti olan muramyl dipeptid (MDP)'i tanır ve konak defansının doğal yolunu aktifler. NOD2 bir 'pattern recognition receptor'(model tanıma reseptörü) olarak ifade edilir. Muramyl dipeptidi algılayarak proinflamatuvar NF- κ B pathway (sinyal yolunu) aktiveleştirir. NOD 2'nin azalmış fonksiyonu sonucu olarak NF- κ B indüksiyonu, inflamatuvar yanıt ve alfa defensin gibi bağırsaklarda üretilen antimikrobiyal peptidlerin üretimi azalır.NOD2 varyantlarında sadece bozulmuş mukoza bariyeri ile yaşam süresi değişmez, bu kişilerde yaşam süresi ekstraintestinal mekanizmalardan da etkilenir. Çünkü NOD2 karaciğerde hepatosit ve bağışıklık hücrelerinde de tariflenmiştir ve muramyl dipeptid üzerinden hücresel yanıtları, hepatik IFN ve NF- κ B'yı stimüle eder. NOD2 nin riskli varyantları Crohn hastalığı ile ilişkilidir ve allojenik kök hücre nakli sonrası gelişen gastrointestinal Graft Versus Host Hastalığı (GVHD) ile de ilişkili olabilir. Appenrodt ve arkadaşları yaptıkları çalışmada NOD2 geninin riskli

varyantlarına sahip karaciğer sirozu ve asitli hastalar ile SBP arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada sirozlu hastalarda NOD2 geninin riskli varyantlarında ölüm riskinin arttığı bildirilmiştir (36).

Bruns ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada asit sıvı kültür sonucu pozitif olan hastaların% 50'sinde NOD2 varyant taşıyıcılığı tespit edildi. Kan kültürü pozitifliği ve sepsis, R702W veya G908R varyant taşıyıcıların % 58 inde, 1007fs genetik varyant taşıyıcıların % 100 ünde, NOD2 wild tip bulunduğu bireylerin% 50 sinde saptanmıştır.(36).

Harpitluoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SBP grubunda dört hastada p.G908R varyantı tespit edildi (% 4.9). Bu çalışmada SBP ve non-SBP grupları arasında NOD2 risk varyantlarında anlamlı bir fark bulunmadı. Asit sıvısının bakteriyel DNA sıklığı NOD2 varyantları olan hastalarda varyant olmayan hastalardan daha yüksekti. Serum IL-6 düzeyleri SBP grubu olanlarda SBP olmayan gruba göre daha yüksek bulunmuştur. SBP hastalarında NOD2'nin riskli varyantları ve BT arasında güçlü bir ilişki olduğu tespit edildi (34).

Guenther ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada akut pankreatitli 941 hasta ile 926 kontrol grubu alındı. Çalışmada p.R702W mutasyonu taşıyıp p.G908R ve p.L1007fs mutasyonu taşımayanlarda şiddetli pankreatit ve mortalite riski taşıdığı saptandı. Şiddetli pankreatitten dolayı ölen hastalarda % 40 p.R702W alleli ve 16.4% wild type allel saptandı. Heterozigot p.R702W taşıyıcılarında ölüm olasılık oranı 2.5 homozigot taşıyıcılarında bu oran 9 du. Multiple organ yetmezliği ile arasında ilişki saptandı. Ama sepsis, tekli organ yetmezliği ve enfekte nekroz arasında ilişki saptanamadı. Çalışmada p.R702W mutasyonun akut pankreatitte artmış mortalite ve multiple organ yetmezliğinden sorumlu olduğu saptandı (7).

2.11.Akut Pankreatitte Sitokinler

Bağırsakta bakteriyel aşırı çoğalma ve translokasyon, monositlerin ve lenfositlerin aktivasyonuna, Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlekin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin artmasına yol açabilir (34).

Deneyisel çalışmalar akut pankreatitte hasarın IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α gibi proinflamatuvar araçlar ve nötrofil, makrofaj, lenfositler gibi inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ile oluştuğunu göstermektedir (1). TNF- α ve IL-1 makrofajlardan salınır ve akut pankreatitte inflamasyonun şiddetini artırır. Deneyisel akut pankreatit

modellerinde IL-1 reseptör antagonistleri, IL-1 dönüştürücü enzim blokerleri veya TNF- α antagonistleri kullanılarak akut pankreatitin şiddetinin azaldığı gösterilmiştir (38). Hem IL-6 hem IL-8 akut pankreatitte hastalığın seyri ve komplikasyonlardan sorumludur (38).

2.11.1.Tümör nekrozis Faktör Alfa

TNF- α öncelikle aktive makrofajlarda salgılanmakla birlikte, B hücreleri, T hücreleri, NK hücreleri, keratinositler, astrositler, fibroblastlar, eozinofiller ve epitelyal hücreler tarafından da üretilir (39,40). Gukovskaya ve arkadaşları tarafından hem rat pankreasında hem de dağınık pankreatik asinüs kültürlerinde TNF- α mRNA'sının eksprese edildiği, TNF- α üretildiği ve salındığı gösterilmiştir (40).

Çözünebilir reseptörler TNF- α 'nın pankreatitteki sistemik etkilerinden sorumludur (41,42). Farelerde yapılan çalışmalarda TNF- α geninin ortadan kaldırılmasının endotoksik şoka dirençli bir fenotip oluşturduğu saptanmıştır (39). Çalışmalarda serum TNF- α ve çözünebilir reseptörünün akut pankreatitli hastalarda arttığı saptanmıştır ve hastalığın şiddeti ile orantılı olduğu ortaya konmuştur (43). TNF- α blokörlerinin pankreatitin sistemik etkilerinin şiddetini azalttığı ortaya konmuştur.(42).

2.11.2.İnterlökin-6

Öncelikle T ve B lenfositler, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotelyal hücreler, astrositler, kemik iliği stromal hücreleri ve mezenkimal hücrelerce üretilen İnterlökin-6 (IL-6), bunlar dışında lenfosit, monosit, mesane, akciğer hücreleri, kardiyak miksoma, myeloma ve hipernefroma gibi tümör hücrelerince de sentezlenir (44). IL-6 gen ekspresyonu IL-1, TNF, IFN ve sikloheksimid tarafından artırılır, glukokortikoidler tarafından azaltılır. İnterlökin-6, B lenfositlerin antikor yapmasını ve IgG, IgM, IgA yapan plazma hücrelerine dönüşümünü sağlar. IL-6 reseptörleri istirahat halindeki T lenfositlerinde bulunurken istirahat halindeki B lenfositlerinde bulunmamaktadır. IL-6 B lenfositlerin son dönemini etkiler. IL-6 timosit ve dalak T lenfositlerden sitotoksik T lenfosit oluşmasını IL-2 reseptör ekspresyonunu artırarak yapar. IL-3 ile IL-6 hücre kültürlerinde sinerjist etki gösterirler. IL-6 makrofajlarda fagositozu artırır, C3b, Fc gamma reseptörlerinin ortaya çıkmasını sağlar (45).

3. MATERYAL VE METOD

Mayıs 2015-Ağustos 2016 tarihleri arasında Turgut Özal Tıp Merkezi Gastroenteroloji bilim dalına başvuran akut pankreatitli hastalar etiyoloji ayırt edilmeksizin çalışmaya dahil edildi. Akut pankreatit; klinik, biyokimyasal ve görüntülemenin kombinasyonu ile tanımlandı. Çalışmaya 18 yaşın üstündeki erişkin hastalar dahil edildi. Çalışmamıza 2015/56 protokol no ile 13.05.2015 tarihinde etik kurul onayı alındı.

3.1.Gruplardaki Hasta Sayılarının Belirlenmesi

Yapılan power analizinde $\alpha=0.05$ 1-beta (güç) $=0.80$ alındığında akut pankreatit hastalarında NOD2 mutasyon sıklığındaki değişimin %20 olması baz alınarak her bir grupta en az 26 denek olması gerektiği hesaplandı.

Çalışmamızda gruplar şu şekilde düzenlendi.

Grup 1 (n=27): Sağlıklı 18-55 yaş arası herhangi bir şikayeti olmayan insanlar dahil edildi.

Grup 2 (n=36): Hafif akut pankreatitli hastalar (Atlanta 2012 sınıflamasına göre hiçbir organ yetmezliği olmayan ve lokal veya sistemik komplikasyonları bulunmayan hastalar)

Grup 3 (n=32): Şiddetli akut pankreatitli hastalar (Atlanta 2012 sınıflamasına göre 48 saatten uzun süren kalıcı tek veya birden çok organ yetmezliği bulunan hastalar)

Toplam 95 birey çalışmaya dahil edildi. Tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam alındı. Hastalar prospektif olarak karakterize edildi. Cinsiyet ve yaşları kaydedildi.

3.2.Klinik Örneklerin Toplanması

Çalışmamızda hafif pankreatit hastalarından kanları hastalığın başlamasından itibaren 0-3. günler arasında alındı. Şiddetli pankreatitli hastalardan ise 3-10. günler arasında alındı. Hastalardan sadece birer kez kan alındı. NOD2 gen analizi için, venoz tam kan 9 ml EDTA içeren numunelere alındı. Eliza kitlerinin çalışılması için alınan kan 3500rpm'de 10 dk santrifüje edildi. Oluşan süpernatant 1.5 ml'lik numuneler şeklinde epandev tüplere aktarılıp çalışma gününe kadar -70°C 'de derin dondurucuda saklandı. Amilaz, lipaz, kreatin, bilirubin, ast, alt değerleri rutin laboratuvar analizleri ile belirlendi.

3.3.Moleküler Yöntemler

3.3.1.NOD2 Gen Mutasyonlarının Tespiti

Örneklerden NOD2 gen varyasyonlarının tespiti için Appenrodt ve arkadaşlarının (23) tanımladıkları Real-Time PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle en sık görülen NOD2 varyantlarından p.R702W, p.G908R ve c.3020insC araştırıldı. Aynı zamanda bunlara ek olarak Bruns ve arkadaşlarının kullandığı 1007fs de kullanıldı (36). Bu amaçla kullanılan primer/probların NOD2 geni üzerindeki mutasyonları aşağıda verilmiştir.

p.R702W: MGB_F CTGAGTGCCAGACATCTGAGAAG, MGB_R GCTGCGGGCCAGACA, VIC CCTGCTCTGGCGCC, FAM CTGCTCCGGCGCC; (Şekil 1)

p.G908R: MGB_F TGATCACCCAAGGCTTCAGC; MGB_R GAACACATATCAGGTACTCA CTGACAC; VIC ACTCTGTTGCGCCAGA; FAM CTGTTGCCCCAGAAT; (Şekil 2)

c.3020insC: MGB_F CCAGGTTGTCCAATAACTGCATC; MGB_RCCTTACCAGACTTCCA GGATGGT; VIC TGCAGGCCCTTG; FAM CTGCAGGCCCTTG. (Şekil 3)

1007fs: Forward primer: GTCCAA TAACTGCATCACCTACCTAG, reverse primer: CTTAC CAGACTTCCAGGATGGTGT, probe 1: FAM-CCCTCC TGCAGGCCCTTGAAAT-TAMRA, probe 2: VIC-CCTC CTGCAGGCCCTTGAAA-TAMRA

Real-time PCR reaksiyonu için Quantitect Probe RT-PCR kit(Lot no:154027285 Qiagen,Hilden,Germany) kullanıldı.Reaksiyona her bir primerden 0.4 µM ve problardan 0.2 µM eklendi. Rotor-Gene Q Real cihazında (Qiagen,Hilden,Germany) amplifikasyon koşulları 95 °C' de 15 dakika ilk denaturasyonun ardından, 40 siklus olarak 94°C' de 15 saniye denaturasyon, 60 °C'de 1 dakika bağlanma (floresans ölçümü) olarak iki basamaklı şekilde uygulandı. NOD2 varyantlarının saptandığı örneklerde, DNA dizi analizi yapılarak mutasyonlar doğrulandı.

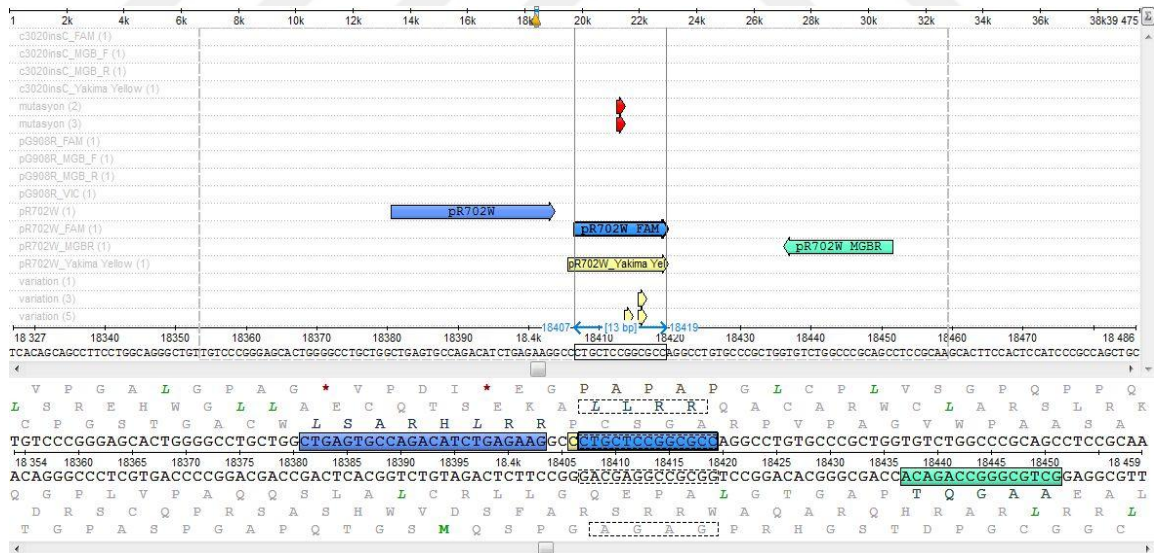
3.3.2.Baz dizi analizi

Mutasyon bölgelerini hedefleyen primerler baz dizi analizine hazırlandı. BigDye terminator 3.1 (Applied Biosystems) kiti ve ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) otomatik baz dizi analizi cihazı kullanılarak, PCR ile çoğaltılan gen bölgelerinin dizi analizi yapılarak mutasyonlar doğrulandı.

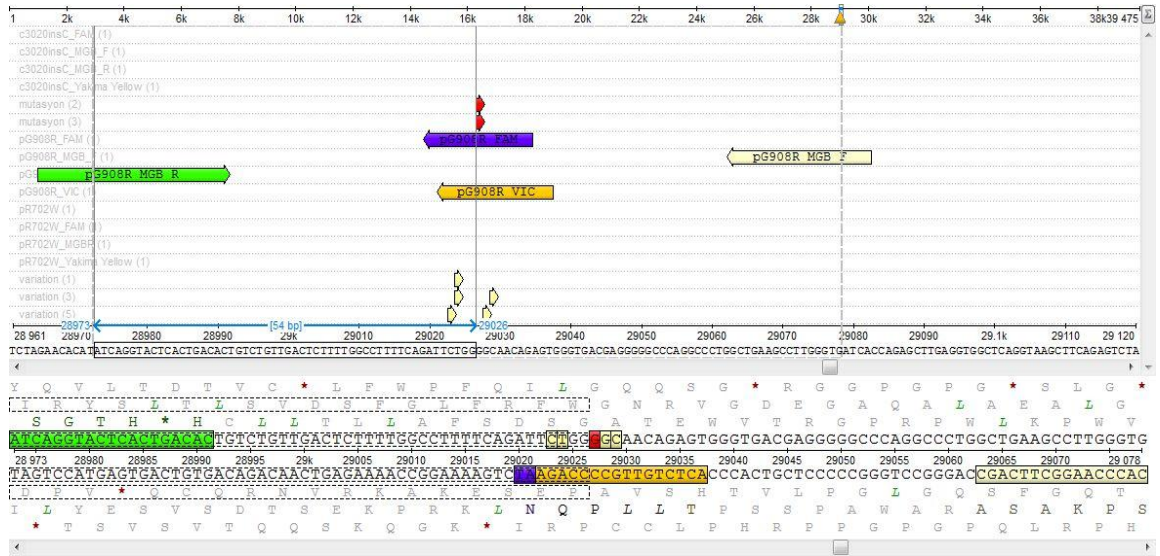
3.4.Elisa Kitlerinin Çalışılması

LBP düzeyleri (Catalog Number:201-12-0361 sunred biological technology No.128 Lane 628, Jufengyuan Road, Baoshan District, Shanghai) sensitivitesi 0.135 µg/ml normal aralığı 0.2–60 µg/ml ELISA kiti ile, IL-6 düzeyleri (Catalog Number:201-12-0091 sunred biological technology No.128 Lane 628, Jufengyuan Road, Baoshan District, Shanghai) sensitivitesi 2.112 ng/ml, normal aralığı 3–600 ng/ml ELISA kiti, TNF-α düzeyleri (Catalog Number: 201.12.2047 sunred biological technology No.128 Lane 628, Jufengyuan Road, Baoshan District, Shanghai) sensitivitesi 0.153 ng/ml, normal aralığı 0.2–60 ng/ml ELISA kiti ile çalışıldı.

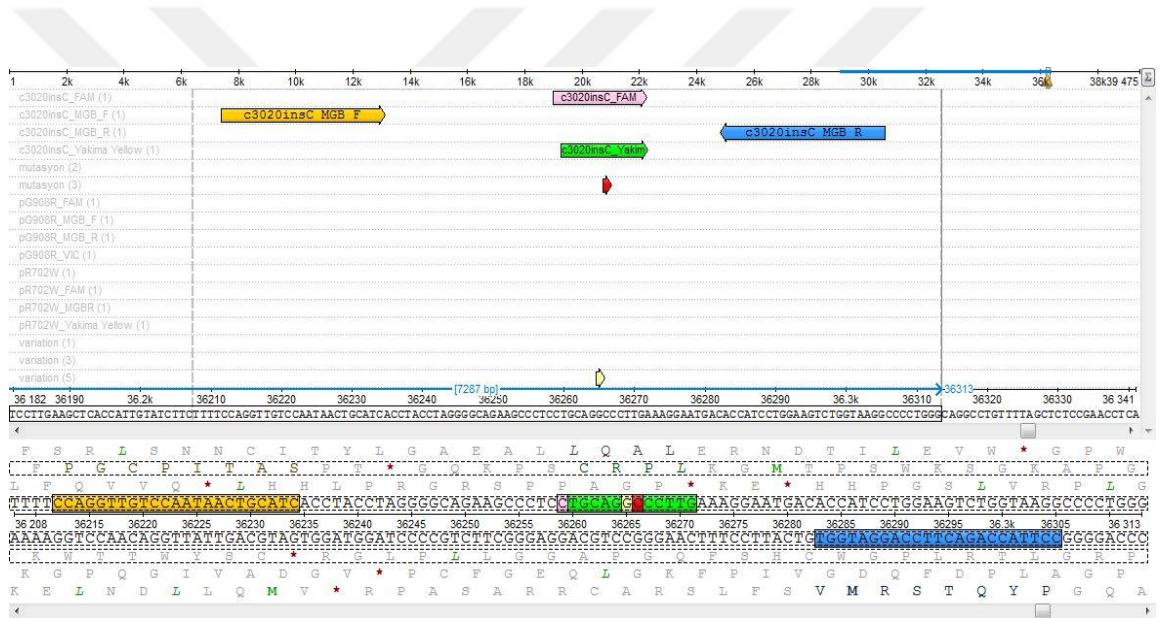
Basic Radim Immunoassay Operator (BRIO); Radim spa, Pomezia, Italy marka cihaz ve bu yönteme uygun ELISA kitleri kullanıldı.



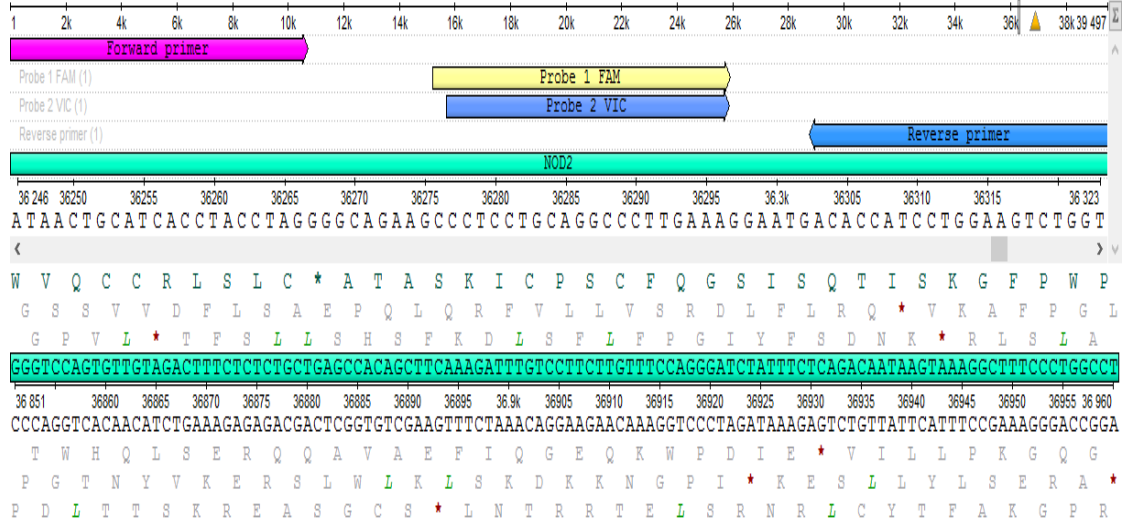
Şekil 3.1. p.R702W primer probleminin NOD2 geni üzerinde şematik gösterimi



Şekil 3.2. p.G908R primer probleminin NOD2'geni üzerinde şematik gösterimi



Şekil 3.3. c.3020insC primer probleminin NOD2 geni üzerinde şematik gösterimi



Şekil 3.4. 1007fs primer problemlerinin NOD2 geni üzerinde şematik gösterimi. FAM işaretli prob normal alel içeren bölgeye, VIC ile işaretli prob ise 1007fs mutasyonuna özgül belge ile hibridize olmak üzere Bruns ve arkadaşları tarafından dizayn edildiler.

3.5. İstatistik

Grupların karşılaştırılmasında Fisher's Exact test ve One Way Anova testi kullanıldı. Post-hoc test olarak Tukey kullanıldı. Tüm değerlendirilmelerde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen bireylerin gruplara göre cinsiyet ve yaş ortalamaları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Şiddetli pankreatitlerde erkek sıklığı hafif pankreatitli gruptan yüksekti. Kadınlarda pankreatit daha sık görüldü.

Tablo 4.1. Gruplara göre yaş ve cinsiyet ortalamaları.

	Erkek/Kadın	Yaş ortalaması ($\pm$ SD)
Sağlıklı (n=27)	11(%40)/ 16(%60)	34.59 $\pm$ 8.23
Hafif (n=36)	13(%36)/23(%64)	61.42 $\pm$ 16.73
Şiddetli (n=32)	18(%56)/14 (%44)	59.58 $\pm$ 21.06
Total (n=95)	42(%44)/53 (%56)	53.11 $\pm$ 20.19

Tablo 4.2. Cinsiyet ile akut pankreatit şiddeti ve NOD2 gen aleli arasındaki ilişki

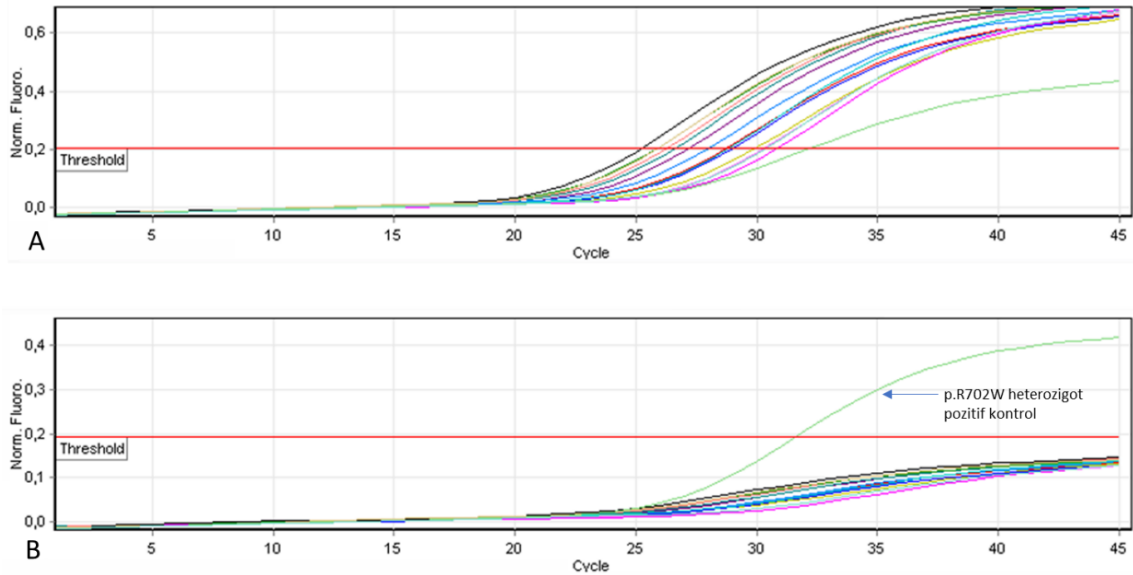
	p.R702W		1007fs	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
Sağlıklı	0	0	1	0
Hafif	0	0	3	0
Şiddetli	2	1	3	1
Toplam	2	1	7	1

Tablo 4.2 gruplara göre mutasyon saptanan hastaların cinsiyetlerine göre dağılımını göstermektedir. Cinsiyet ve NOD2 mutasyon sıklığı arasında anlamlı bir ilişki yoktu. Şiddetli pankreatit atağı geçiren bir erkek hastada her iki mutasyon pozitif saptandı (Tablo 3).

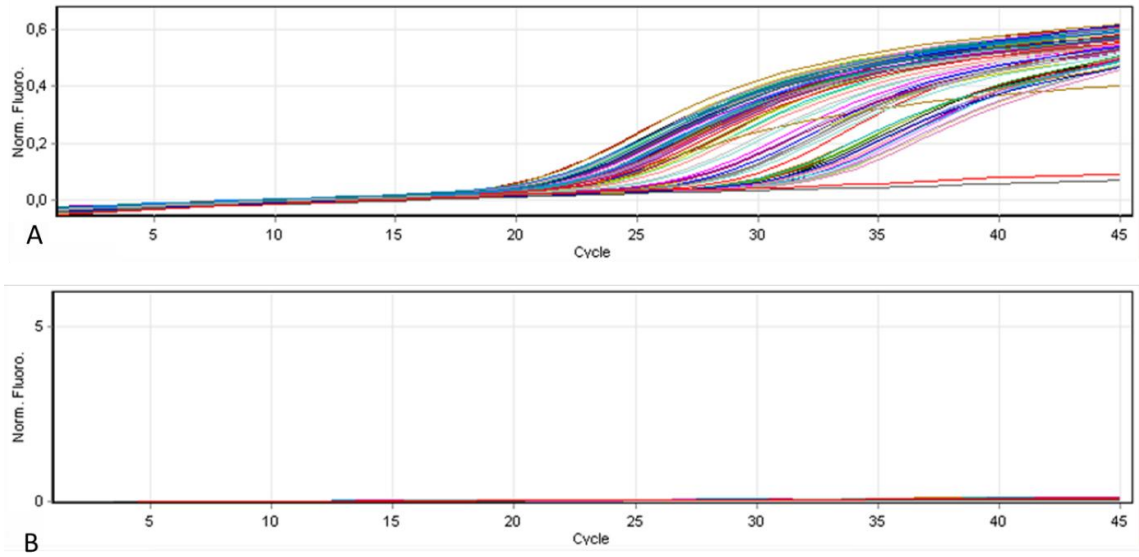
Tablo 4.3. Akut pankreatit şiddeti ile NOD2 gen sıklığı arasındaki ilişki

	NOD2		Total
	Yok	Var	
Sağlıklı (n=27)	26(%96.3)	1(%3.7)	27(%28.4)
Hafif (n=36)	33(%91.7)	3(%8.3)	36(%37.9)
Şiddetli (n=32)	27(%84.4)	5(%15.6)	32(%33.7)
Total (n=95)	86(%90.5)	9(%9.5)	95(%100.0)

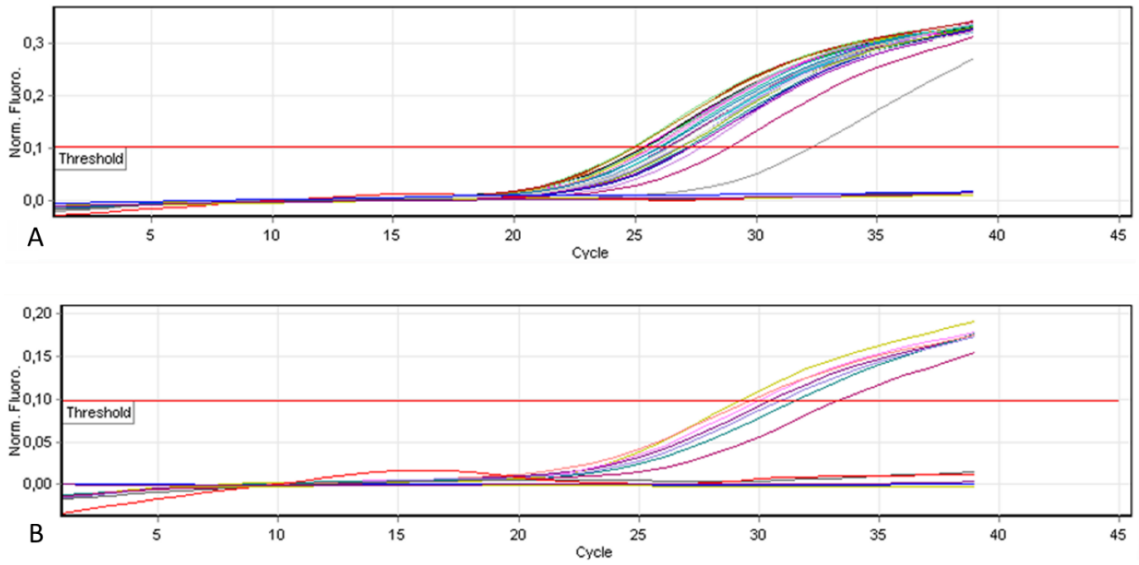
Çalışılan NOD2 risk varyantlarından p.G908R ve c.3020insC mutasyonları hiçbir grupta izlenmedi. Tablo 4.4 gruplara göre saptanan NOD2 gen sıklıklarını göstermektedir. Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3 real time PCR ile NOD2 mutasyonların araştırılmasını göstermektedir. NOD2 mutasyonlarının sıklığı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Hafif pankreatitli hastaların 3 (%8.3)'ünde, şiddetli pankreatitli hastaların 5 (%15.6)'inde mutasyon izlendi (Tablo 4.3).



Şekil 4.1. Real-time PCR ile p.R702W mutasyonunun araştırılması. A) FAM işaretli prob ile normal aleller çoğaltılmış. B) Yakima Yellow ile işaretli prob ile p.R702W mutasyonun gösterilmesi. (pozitif kontrol olarak dizi analizi ile p.R702W doğrulanmış hasta örneği kullanılmıştır)



Şekil 4.2. Real-time PCR ile p.G908R mutasyonun araştırılması. A) FAM işaretli prob ile normal aleller çoğaltılmış. B) Yakima Yellow ile işaretli prob ile p.G908R mutasyonun gösterilmesi.



Şekil 4.3. Real-time PCR ile 1007fs mutasyonun araştırılması. A) FAM işaretli prob ile normal aleller çoğaltılmış. B) VIC ile işaretli prob ile 1007fs mutasyonun gösterilmesi. (pozitif kontrol olarak dizi analizi ile 1007fs doğrulanmış hasta örneği kullanılmıştır)

Tablo 4.4. Gruplara göre NOD2 risk varyantları arasındaki ilişki

	p.R702W		1007fs		Total
	Yok	Var	Yok	Var	
Sağlıklı(n=27)	27(%100.0)	0(%0.0)	26(%96.3)	1(%3.7)	27(%28.4)
Hafif(n=36)	36(%100.0)	0(%0.0)	33(%91.7)	3(%8.3)	36(%37.9)
Şiddetli(n=32)	29(%90.6)	3(%9.4)	29(%90.6)	3(%9.4)	32(%33.7)
Total(n=95)	92(%96.8)	3(%3.2)	88(%92.6)	7 (%7.4)	95(%100.0)

Tablo 4.4'de gruplara göre p.R702W ve 100fs risk varyantların sıklığı gösterilmiştir. NOD2 gen alellerinden p.R702W pozitif saptanan 3 (%9.4) hastada şiddetli pankreatit mevcuttu. 1007fs mutasyonu sağlıklı grupta 1 kişide (%3.7), hafif pankreatitli hastalardan 3 (%8.3) kişide, şiddetli pankreatitli hastalardan 3 (%9.4) kişide saptandı (Tablo 4.4). Şiddetli pankreatit grubunda bir hastada her iki mutasyonun da mevcut olduğu belirlendi. Gruplar karşılaştırıldığında bu mutasyonlar açısından şiddetli pankreatit ile hafif pankreatitli grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Daha sonraki izlemleri sırasında p.R702W pozitif saptanan bir kadın hasta ile 1007fs pozitif gelen bir erkek hastada mide kanseri saptandı. Hafif pankreatitli grupta mortalite bulunmaz iken şiddetli pankreatitli grupta 3 (%9.) hastada mortalite saptandı. Bu hastalardan birinde p.R702W pozitif saptandı. Ölüm oranları açısından şiddetli pankreatit ve hafif pankreatit arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Ayrıca ölüm oranları açısından NOD risk varyantı bulunan ve bulunmayan hastalar arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

Tablo 4.5. Gruplara göre serum IL-6, TNF- α ve LBP düzeylerinin ortalamaları

	IL-6 (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)	LBP (μ g/ml)
Sağlıklı (n=27)	3.17 $\pm$ 2.22	7.16 $\pm$ 5.18	8.43 $\pm$ 6.37
Hafif (n=36)	3.64 $\pm$ 2.58	8.46 $\pm$ 5.91	9.64 $\pm$ 7.19
Şiddetli (n=32)	6.61 $\pm$ 2.57 ^{a, b}	15.17 $\pm$ 5.99 ^{a, b}	18.85 $\pm$ 8.83 ^{a, b}

^a kontrol ile karşılaştırıldığında p<0.001

^b hafif grup ile karşılaştırıldığında p<0.001

Şiddetli pankreatit grubunda serum IL-6, TNF- α ve LBP düzeyleri sağlıklı gruptan ve hafif pankreatitli gruptan anlamlı şekilde yükseldi (her ikisi de p<0.001) (Tablo 4.5).

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada şiddetli ve hafif pankreatitli gruplar arasında NOD2 risk varyantları açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Şiddetli pankreatitli grupta IL-6, TNF- α and LBP düzeyleri hafif pankreatitli gruptaki düzeylerden anlamlı şekilde yüksekti.

Ölüm oranı hafif pankreatitte yaklaşık %0 civarında iken, şiddetli pankreatitte bu oran yoğun tedavilere rağmen %80'e kadar çıkabilmektedir (8). Şu anda, hangi vakaların şiddetli pankreatite ilerleyeceğini gösteren güvenilir bir belirteç yoktur. Güvenilir bir belirtecin varlığı, şiddetli akut pankreatit vakalarını erkenden tanımayı ve uygun önlemlerle ciddi komplikasyonların başlamasını engelleyerek mortalite oranlarının azalmasını sağlayabilir. AP' de infeksiyöz komplikasyonların gelişmesinde bakteriyel translokasyonun önemli rol oynadığı bildirilmiştir (46). Ağır AP'de bakteriyel translokasyonunun gelişmesindeki mekanizmalar, sepsis, karaciğer hastalıkları ve yanık gibi kritik hastalıklarda da ortaktır (34, 47, 48). Bu mekanizmalar, intestinal bariyerin fonksiyon kaybı, bağırsak motilitesindeki değişiklikler ile birlikte bakteriyel aşırı çoğalma ve immün yetmezliktir (4).

NOD2, konakçı savunmasında yer alan önemli bir hücre içi reseptörüdür (49). NOD2, bakteri duvar peptidlerini algılayan ve yanıt veren bir NOD benzeri reseptör aile üyesidir (50). NOD2'nin bağırsak hemostazının korunmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (51). Son yıllarda, NOD2 varyantlarının sirotik hastalarda infeksiyöz komplikasyonlar için genetik risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (23,34). Benzer şekilde, NOD2 varyantlarının, Crohn hastalığı, Blau sendromu ve erken başlangıçlı sarkoidoz gibi çeşitli kronik inflamatuvar bozukluklara duyarlılık kazandırdığı gösterilmiştir (52). Bütün bu veriler, NOD2'nin BT patogenezinde anahtar rol oynadığını ileri sürmektedir. Bu bağlamda, biz bu çalışmada şiddetli akut pankreatit patogenezinde NOD varyantlarının herhangi bir rol oynayıp taşımadığını araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda sağlıklı kişilerde ve hafif ve şiddetli pankreatitli hastalarda dört NOD2 varyantı (p. R702W, p.G908R, c.3020insC ve 1007fs) incelendi. Herhangi bir grupta iki varyantın (p.G908R ve c.3020insC) olmadığını tespit ettik. Aksine, p.R702W varyantı şiddetli pankreatit grubunda 3 hastada (3/32,% 9.4) pozitif, ancak bu varyant diğer iki grupta negatifti. 1007fs mutasyonu sağlıklı grupta 1 kişide (1/27, %3.7), hafif pankreatitli hastalardan 3(3/36,%8.3) kişide, şiddetli pankreatitli

hastalardan 3 (3/32, %9.4) kişide saptandı. Ağır pankreatit grubundaki bir hastada p.R702W ve 1007fs varyantlarının ikisi de mevcuttu. Hafif ve pankreatitli gruplar arasında p.R702W ve 1007fs varyantları için anlamlı fark yoktu. NOD varyantlarının sıklığı gruplar arasında istatistiksel olarak farklı olmasa da, ağır pankreatit hastalarında (5/32,% 15.6) NOD2 varyantının sıklığı, hafif pankreatitli hastalardan (3/36,% 8.3) ve sağlıklı kişilerden (1/27,% 3.7) daha yüksekti. Gruplar arasında mortalite oranları açısından belirgin bir fark yoktu. Guenther ve ark. p.R702W mutasyonunun, geniş hasta popülasyonunda (Avrupa ve ABD) akut pankreatitli hastalarda multipl organ yetmezliği ve mortalite ile ilişkili olduğunu saptadı (7). Çalışmamızda, gruplar arasında p.R702W varyantları için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen şiddetli pankreatitli hastalarda p.R702W varyantı sıklığı hafif pankreatitli hastalardan daha yüksekti (sırasıyla % 9.4'e karşı % 0). Sonuçlarımız, yukarıdaki çalışma gibi p.R702W varyantı ve şiddetli pankreatit varlığı arasında kuvvetli bir ilişki olabileceğini desteklemektedir.

Bai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1990'dan 2005'e kadar şiddetli akut pankreatit tanısı ile on beş merkeze başvuran 1976 hastanın tıbbi kayıtları gözden geçirildi. 1976 hastadan 1028' i erkek, 948'i kadındı. Hastaların yaş ortalaması 56.2 ± 16.5 yıldır (yaş aralığı 9-94 yıl). Genel mortalite oranı % 11.8 idi (53). Çalışmamızda hafif akut pankreatit ile şiddetli akut pankreatit arasında yaş ortalaması açısından anlamlı fark yoktu. Akut pankreatit kadınlarda daha sık izlendi. Şiddetli akut pankreatit hastalarında erkek oranı daha fazla saptandı. Hastalarımızda akut pankreatitin şiddetinin cinsiyet ve yaşa göre dağılımı literatür ile uyumlu saptandı. Çalışmamızda p.R702Wve 1007fs mutasyonları erkeklerde daha sık izlendi.

NOD1 rs2709800 ve NOD2 rs718226'nın, prekanseröz mide lezyonu ile ilişkili olduğu saptandı. (54). NOD2 mutasyonları kolorektal kanser ile ilişkisi bildirilmiştir (55). Ailevi pankreas kanseri vakalarında NOD2 alellerinden 3020insC mutasyon sıklığının arttığı saptanmış. Ancak sporadik pankreas kanseri vakalarıyla ilişkisi saptanamıştır (56). Çalışmamızda p.R702W pozitif saptanan bir kadın hasta ile 1007fs pozitif gelen bir erkek hastada mide kanseri saptandı. Bu verilerler NOD2 varyantları ve mide kanseri arasında ilişkiye dair yorum yapmak zordur ancak bu konuda daha fazla çalışma yapılması halinde mide kanseri ve NOD2 ilişkisine dair ilave bulgular elde edilebilir.

NOD2'nin birçok varyantı mevcuttur (57,58). NOD2 varyantlarının geniş coğrafi dalgalanmaları da farklı popülasyonlarda gözlenmiştir (59,60). Şimdiye kadar, Türkiye'de akut pankreatitli hastalarda NOD2 varyantlarının sıklığına dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, etnisite bizim sonucumuzu etkilemiş olabilir.

Klinik ve deneysel çalışmalarda, AP' deki sistemik enfeksiyonların muhtemelen enterik mikroorganizmaların transmural göçünden kaynaklandığı saptanmıştır (46). Bakteriyel translokasyonun AP'de akut inflamasyon ve septik şokta önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (46). Şiddetli akut pankreatit erken intestinal bariyer fonksiyonuyla ve sistemik endotoksin translokasyonu ile ilişkili iken sistemik bakteriyel translokasyon ile arasında moleküler kanıt bulunamadı. Şiddetli akut pankreatitte hücrel immünite ve retikuloendotelial disfonksiyon olmasına rağmen transloke olan bakteriler sistemik dolaşıma geçmeyebilir. Profilaktik antibiyotik kullanımı bu duruma yol açmış olabilir (31).

Akut pankreatitte inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ve lokal yanıt interlökin 6 ve TNF- α da dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar. Bu proinflamatuvar mediatörler, şiddetli akut pankreatit patogeneğinde ve akut pankreatitle ilişkili uzak organ yetmezliklerinde merkezi bir role sahiptir (61-63). Çalışmamızda, şiddetli akut pankreatitli hastalarda serum IL-6 ve TNF- α düzeyleri, hafif pankreatitli hastalardan anlamlı olarak yüksekti. Malstrom ve ark. akut pankreatitte renal, solunum ve dolaşım yetmezliği gelişen hastalarda IL-6 ve TNF- α düzeylerinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, NOD2 varyantı olan ve NOD2 varyantları olmayanların arasında IL-6 ve TNF- α düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu. NOD2'nin NF- κ B aktivasyonuna ve sitokin indüksiyonuna yol açan bir sitoplazmik protein olduğu bilinmektedir (64). Qian ve ark. akut pankreatitin sıçan modelinde NOD2 ekspresyonunu araştırdı. Akut pankreatitte NOD2 ekspresyonunun TNF- α ile negatif olarak korele olduklarını bildirmişlerdir (49). Crohn hastalığı ve sirozda NOD2 varyantlarının, TNF- α ve interlökinlerin üretimini etkilediği bildirilmiştir. (34, 65-67). Literatürde akut pankreatitli hastalarda bu sitokin düzeyleri ile NOD2 varyantları arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bulgularımız şiddetli pankreatitte artmış sitokin düzeylerini (IL-6 ve TNF- α) bildiren önceki çalışmaları desteklemektedir. Bu bulguların tümü, sitokin seviyeleri ile NOD2 varyantları arasında herhangi bir ilişki olduğunu düşündürse de, bu bulgularla net bir hükme varmak zordur. Bunun sebebi birkaç nedenden ötürü olabilir. Öncelikle çalışmamızda hasta sayısı çok sınırlıdır. İkinci olarak, p.R702W varyantı haricinde NOD2 varyantları ile şiddetli

pankreatit arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Üçüncü olarak, farklı etnik kökenlerde en az 30 NOD2 risk varyantı bulunmuştur (57). Bu çalışmada yalnızca dört tanınmış varyant incelendi. İnflamatuvar sitokin düzeyleri ile NOD2 varyantları arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için akut pankreatitli hastalarda çok daha fazla NOD2 varyantı araştırmak yararlı olabilir.

Lipopolisakkarit-bağlayıcı protein ağırlıklı olarak karaciğer tarafından sentezlenen bir akut faz proteindir (68). Yüksek LBP seviyeleri şiddetli inflamatuvar koşullarda bir belirteç olarak bilinir. Sepsis, SIRS ve akut pankreatitli hastalarda serum LBP düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (68-71). Çalışmamızda şiddetli akut pankreatitli hastalarda yüksek LBP düzeyleri bulduk. LBP seviyeleri ile NOD2 varyantları arasında herhangi bir ilişki bulamadık. Şimdiye kadar akut pankreatitli hastalarda LBP düzeyleri ile NOD2 varyantları arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Sınırlı araştırmalarda çeşitli hastalıklarda LBP ve NOD2 varyantları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Reiberger ve ark. NOD2 varyantları olan sirozlu hastalarda yüksek LBP düzeyleri gözlemlendiğini bildirmiştir. Lakatos ve ark. Crohn hastalığı olan hastalarda LBP ve NOD2 varyantlarının varlığı arasında bir ilişki bulamadıklarını bildirdiler (72). Akut pankreatitte LBP ve NOD2 arasındaki ilişkiyi belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda NOD2 mutasyonlarının sıklığı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Çalışmamızda, gruplar arasında p.R702W varyantları için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen şiddetli pankreatitli hastalarda p.R702W varyantı sıklığı hafif pankreatitli hastalardan daha yüksekti (sırasıyla % 9.4'e karşı % 0). Sonuçlarımız p.R702W varyantı ve şiddetli pankreatit varlığı arasında kuvvetli bir ilişki olabileceğini desteklemektedir. NOD2'nin birçok varyantı mevcuttur. NOD2 varyantlarının geniş coğrafi dalgalanmaları da farklı popülasyonlarda gözlenmiştir. Şimdiye kadar, Türkiye'de akut pankreatitli hastalarda NOD2 varyantlarının sıklığına dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, etnisite bizim sonuçlarımızı etkilemiş olabilir.

Çalışmamızda, şiddetli akut pankreatitli hastalarda serum IL-6 ve TNF- α düzeyleri, hafif pankreatitli hastalardan anlamlı olarak yüksekti. Çalışmamızda, NOD2 varyantı olan ve NOD2 varyantları olmayanlar arasında IL-6 ve TNF- α düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu. Bulgularımız şiddetli pankreatitte artmış sitokin düzeylerini (IL-6 ve TNF- α) bildiren önceki çalışmaları desteklemektedir. Bu bulguların tümü, sitokin seviyeleri ile NOD2 varyantları arasında herhangi bir ilişki olduğunu düşündürse de, elde ettiğimiz bulgularla net bir hükme varmak zordur. İnflamatuar sitokin düzeyleri ile NOD2 varyantları arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için akut pankreatitli hastalarda çok daha fazla NOD2 varyantı araştırmak yararlı olabilir.

Çalışmamızda şiddetli akut pankreatitli hastalarda yüksek LBP düzeyleri bulduk. LBP seviyeleri ile NOD2 varyantları arasında herhangi bir ilişki bulamadık. Akut pankreatitte LBP ve NOD2 arasındaki ilişkiyi belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Zerem E. Treatment of severe acute pancreatitis and its complications. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 14;20(38):13879-92.
2. Deng W, Abliz A, Xu S, Sun R, Guo W, Shi Q, Yu J, Wang W. Severity of pancreatitis-associated intestinal mucosal barrier injury is reduced following treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocynin. *Mol Med Rep*. 2016;14(4):3525-34.
3. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg*. 1999 May-Jun; 3(3):252-62.
4. Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2003;10(6):415-8.
5. Tsay TB, Chang CJ, Chen PH, Hsu CM, Chen LW. Nod2 mutation enhances NF-kappa B activity and bacterial killing activity of macrophages. *Inflammation*. 2009 Dec;32(6):372-8.
6. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003; 124(4):993–1000.
7. Guenther A, Nijmeijer RM, Nitsche C, Aghdassi A, Boermeester MA, Schulz HU, Papachristou GI, Mayerle J, van Santvoort HC, Zenker M, Simon P, Weber E, Whitcomb DC, Lerch MM, Weiss FU. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2 (NOD2/CARD15) mutation p. R702W predisposes to a fatal outcome of severe acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2013; 13(3): S7-S8.
8. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013 Jan;62(1):102-11.

9. Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2009 Mar 28;15(12):1427-30.
10. Zhang XP, Li ZJ, Zhang J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009, Aug; 8(4): 351-7.
11. Kylänpää ML, Repo H, Puolakkainen PA. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2010; Jun 21; 16(23): 2867-72.
12. Hayden P, Wyncoll D. Severe acute pancreatitis. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2008; 19(1): 1-7.
13. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2000 Feb; 190(2): 117-25.
14. Sandberg AA, Borgström A. Early prediction of severity in acute pancreatitis. Is this possible? *JOP*. 2002 Sep;3(5):116-25.
15. Digalakis MK, Katsoulis IE, Biliri K, Themeli-Digalaki K. Serum profiles of C-reactive protein, interleukin-8, and tumor necrosis factor- α in patients with acute pancreatitis. *HPB Surgery*. 2009;1-5.
16. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut*. 2000; Oct 47(4): 546-52.
17. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg*. 1998 Jan; 175(1): 76-83.
18. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock*. 2005 Dec; 1: 45-51.
19. Hollande F, Shulkes A, Baldwin GS. Signaling the junctions in gut epithelium. *Sci STKE*. 2005; 29: 13-15.
20. Zhang XP, Zhang J, Song QL, Chen HQ. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury of intestinal mucosa barrier. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007 Dec; 8(12):888-95.
21. Liu ZH, Peng JS, Li CJ, Yang ZL, Xiang J, Song H, Wu XB, Chen JR, Diao DC. A simple taurocholate-induced model of severe acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol*. 2009 Dec 7; 15(45):5732-9.

22. Flint RS, Windsor JA. The role of the intestine in the pathophysiology and management of severe acute pancreatitis. *HPB(Oxford)*. 2003;5(2):69-85.
23. Appenrodt B, Grunhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1327-33.
24. Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Solá-Vera J, Pérez-Mateo M. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Apr;14(4):371-6.
25. Astaldi G, Strosselli E. Peroral biopsy of the intestinal mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J DigDis*. 1960; 5: 603-12.
26. Norman DA, Atkins JM, Seelig LL Jr, Gomez-Sanchez C, Krejs GJ. Water and electrolyte movement and mucosal morphology in the jejunum of patients with portal hypertension. *Gastroenterology*. 1980 Oct;79(4):707-15.
27. Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Am J Clin Pathol*. 1997 Dec;108(6):652-7.
28. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*. 2013 Jan;33(1):31-9.
29. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res*. 2006 Sep;135(1):18-26.
30. Wang XD, Wang Q, Andersson R, Ihse I. Alterations in intestinal function in acute pancreatitis in an experimental model. *Br J Surg*. 1996 Nov;83(11):1537-43.
31. Ammori BJ, Fitzgerald P, Hawkey P, McMahon MJ. The early increase in intestinal permeability and systemic endotoxin exposure in patients with severe acute pancreatitis is not associated with systemic bacterial translocation: molecular investigation of microbial DNA in the blood. *Pancreas*. 2003 Jan;26(1):18-22.

32. Singh VV, Toskes PP. Small bowel bacterial overgrowth: presentation, diagnosis, and treatment. *Curr Gastroenterol Rep.* 2003 Oct;5(5):365-72.
33. Steffen EK, Berg RD. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect Immun.* 1983 Mar; 39(3): 1252-9.
34. Harputluoglu MM, Dertli R, Otlı B, Demirel U, Yener O, Bilgic Y, Erdogan MA, Atayan Y, Cagin YF. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 variants in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci.* 2016 Jun;61(6):1545-52.
35. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology.* 2000 Jan;31(1):43-8.
36. Bruns, T, Peter J, Reuken PA, Grabe DH, Schuldes SR, Brenmoehl J, SchölmerichJ, Wiest R, Stallmach A. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. *Liver Int.* 2012 Feb;32(2):223-30.
37. Frossard JL, Hadengue A, Pastor CM. New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jul 1;164(1):162-70.
38. Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001;8(3):195-203.
39. Kılıçturgay K. *İmmünoloji* 2003;3: 113-153.
40. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells produce release and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest.* 1997 Oct 1;100(7):1853-62.
41. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by it soluble receptors. *J Exp Med.* 1992 Feb 1;175(2):323-9.
42. Granell S, Pereda J, Gómez-Cambronero L, Cassinello N, Sabater L, Closa D, Sastre J. Circulating TNF-alpha and its soluble receptors during experimental acute pancreatitis. *Cytocine.* 2004 Feb 21;25(4):187-91.

43. Hughes CB, Gaber LW, Mohey el-Din AB, Grewal HP, Kotb M, Mann L, Gaber AO. Inhibition of TNF improves survival in an experimental model of acute pancreatitis. *Am Surg*. 1996 Jan;62(1):8-13.
44. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989 Jul;74(1):1-10.
45. Bienvenu J. Exploration of cytokines in inflammation in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil*. 1995;189(4):545-55.
46. Li Q, Wang C, Tang C, He Q, Li N, Li J. Bacteremia in patients with acute pancreatitis as revealed by 16S ribosomal RNA gene-based techniques. *Crit Care Med*. 2013 Aug;41(8):1938-50.
47. Gatt M, Reddy BS, MacFie J. Review article: bacterial translocation in the critically ill--evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Apr 1;25(7):741-57.
48. Earley ZM, Akhtar S, Green SJ, Naqib A, Khan O, Cannon AR, Hammer AM, Morris NL, Li X, Eberhardt JM, Gamelli RL, Kennedy RH, Choudhry MA. Burn Injury Alters the Intestinal Microbiome and Increases Gut Permeability and Bacterial Translocation. *PLoS One*. 2015 Jul 8;10(7):e0129996.
49. Qian M, Fang L, Cui Y. Expression of NOD2 in a rat model of acute pancreatitis. *Pancreas*. 2010 Oct;39(7):1034-40.
50. Strober W, Asano N, Fuss I, Kitani A, Watanabe T. Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease. *Immunol Rev*. 2014 Jul;260(1):249-60.
51. Benjamin JL, Sumpter R Jr, Levine B, Hooper LV. Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. *Cell Host Microbe*. 2013 Jun 12;13(6):723-34.
52. Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1479-84.
53. Bai Y, Liu Y, Jia L, Jiang H, Ji M, Lv N, Huang K, Zou X, Li Y, Tang C, Guo X, Peng X, Fang D, Wang B, Yang B, Wang L, Li Z. Severe acute pancreatitis in China: etiology and mortality in 1976 patients. *Pancreas*. 2007 Oct;35(3):232-7.
54. Li ZX, Wang YM, Tang FB, Zhang L, Zhang Y, Ma JL, Zhou T, You WC, Pan KF. NOD1 and NOD2 Genetic Variants in Association with Risk of

- Gastric Cancer and Precursors in a Chinese Population. *PLoS One*. 2015 May 1;10(5):e0124949.
55. Kurzawski G, Suchy J, Kładny J, Grabowska E, Mierzejewski M, Jakubowska A, Debniak T, Cybulski C, Kowalska E, Szych Z, Domagała W, Scott RJ, Lubiński J. The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 2004 Mar 1; 64(5):1604-6.
 56. Nej K, Bartsch DK, Sina-Frey M, Rieder H, Hahn SA, Lubiński J. The NOD2 3020insC Mutation and The Risk of Familial Pancreatic Cancer? *Hered Cancer Clin Pract*. 2004 Jul 15;2(3):149-50.
 57. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.
 58. Filik L. NOD2 gene variants and spontaneous bacterial peritonitis. *Liver Int*. 2012 Mar;32(3):521.
 59. Hugot JP, Zaccaria I, Cavanaugh J, Yang H, Vermeire S, Lappalainen M, Schreiber S, Annese V, Jewell DP, Fowler EV, Brant SR, Silverberg MS, Cho J, Rioux JD, Satsangi J, Parkes M; IBD International Genetics Consortium. Prevalence of CARD15/ NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol*. 2007 Jun;102(6):1259-67.
 60. Ozen SC, Dagli U, Kilic MY, Törüner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. NOD2/CARD15, NOD1/ CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2006 Apr;41(4):304-10.
 61. Malmström ML, Hansen MB, Andersen AM, Ersbøll AK, Nielsen OH, Jørgensen LN, Novovic S. Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis. *Pancreas*. 2012 Mar;41(2):271-7.
 62. Aoun E, Chen J, Reighard D, Gleeson FC, Whitcomb DC, Papachristou GI. Diagnostic accuracy of interleukin-6 and interleukin-8 in predicting severe acute pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreatology*. 2009;9(6):777-85.
 63. Berney T, Gasche Y, Robert J, Jenny A, Mensi N, Grau G, Vermeulen B, Morel P. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10

- in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas*. 1999 May;18(4):371-7.
64. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8869-72.
 65. Beynon V, Cotofana S, Brand S, Lohse P, Mair A, Wagner S, Mussack T, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Folwaczny C, Glas J, Török HP. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Aug;14(8):1033-40.
 66. Salem M, Seidelin JB, Eickhardt S, Alhede M, Rogler G, Nielsen OH. Species-specific engagement of human nucleotide oligomerization domain 2 (NOD)2 and Toll-like receptor (TLR) signalling upon intracellular bacterial infection: role of Crohn's associated NOD2 gene variants. *Clin Exp Immunol*. 2015 Mar;179(3):426-34.
 67. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, Mandorfer M, Heinisch BB, Hayden H, Lammert F, Trauner M, Peck-Radosavljevic M, Vogelsang H; Vienna Hepatic Hemodynamic Lab. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013 May;58(5):911-21.
 68. Cunningham SC, Malone DL, Bochicchio GV, Genuit T, Keledjian K, Tracy JK, Napolitano LM. Serum lipopolysaccharide-binding protein concentrations in trauma victims. *Surg Infect (Larchmt)*. 2006 Jun;7(3):251-61.
 69. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3800-8.
 70. Myc A, Buck J, Gonin J, Reynolds B, Hammerling U, Emanuel D. The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997 Mar;4(2):113-6.

71. Erwin PJ, Lewis H, Dolan S, Tobias PS, Schumann RR, Lamping N, Wisdom GB, Rowlands BJ, Halliday MI. Lipopolysaccharide binding protein in acute pancreatitis. *Crit Care Med*. 2000 Jan;28(1):104-9.
72. Lakatos PL, Kiss LS, Palatka K, Altorjay I, Antal-Szalmas P, Palyu E, Udvardy M, Molnar T, Farkas K, Veres G, Harsfalvi J, Papp J, Papp M. Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Mar;17(3):767-77.

