

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

**SİROZLU HASTALARDA SPONTAN BAKTERİYAL  
PERİTONİT İLE NOD2 GEN MUTASYONU VE  
BAKTERİYAL TRANSLOKASYON  
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ramazan DERTLİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

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

**MALATYA-2013**

## TEŞEKKÜR

İhtisas sürem boyunca yetişmemde bana destek olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli anabilim dalı başkanımız Prof. Dr.Hülya Taşkapan'a, tezimin şekillenme aşamasından bitiş aşamasına kadar her türlü yardım ve desteği veren değerli hocam Prof. Dr. Murat HARPUTLUOĞLU'na, asistanlık eğitimim boyunca geniş bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tüm hocalarımıza, değerli uzmanlarımıza ve asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Yıllarca beraber çalıştığımız ve birlikteliğimizden büyük keyif aldığım sevgili doktor arkadaşlarıma, tüm hemşirelerimize, personelimize, kliniğimizde görev almış tüm çalışanlara sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Benim bu günlere gelmemi sağlayan, bana her türlü güçlüğüň altından nasıl kalkabileceğimi öğreten ve öğretirken de her zaman yanımda olan, gerek maddi gerek manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve onlarla daima gurur duyup onlara layık olmaya çalışacağım sevgili anne ve babama, biricik eşim Ülkü ve oğlum Ahmet Umut'a sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımla...

## ÖZET

### **SİROZLU HASTALARDA SPONTAN BAKTERİYAL PERİTONİT İLE NOD2 GEN MUTASYONU VE BAKTERİYAL TRANSLOKASYON ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Bakteriyel translokasyon (BT) spontan bakteriyel peritonitin (SBP) gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda karaciğer sirozunda SBP'nin nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) gen aleli ve BT sıklığıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Biz bu çalışmada asitli sirotik hastalarda spontan bakteriyel peritonit ile BT ve NOD2 varyantı arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

Çalışmamıza etyoloji ayırt etmeksizin sirotik asit gelişmiş SBP'si olan 82 hasta ve SBP'si olmayan 89 hasta dahil edildi. Çalışmamızda BT ilişkili olduğu düşünülen 3 NOD2 gen aleli (p.R702W, p.G908R, c.3020insC) çalışıldı. BT varlığını saptamak için tüm hastalarda asit sıvısında bakteriyel DNA ve serumda İnterlökin-6(IL-6), tümör nekrosis faktör reseptörü(TNF-R) ve lipoprotein binding protein (LPB) bakıldı. SBP olan hastalarda asit sıvısında bakteriyel DNA varlığı SBP olmayan hastalardan anlamlı şekilde farklıydı. SBP ve SBP olmayan hastalar arasında NOD2 gen varyant sıklığı açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Kültür pozitif SBP'li hastalarda NOD2 gen varyant sıklığı kültür negatif hastalardan anlamlı şekilde farklıydı. NOD2 gen varyantı olan hastalarda asit sıvısında bakteriyel DNA sıklığı, NOD2 gen varyantı olmayan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı saptandı.

Bu çalışmada bulgularımız asit kültürü ve bakterial DNA pozitifliği ile NOD2 gen mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** NOD2, Bakteriyel Translokasyon, Spontan Bakteriyel Peritonit

## SUMMARY

### THE RELATIONSHIP BETWEEN SPONTAN BACTERIAL PERITONITIS AND NOD2 GENE MUTATION AND BACTERIAL TRANSLOCATION IN CIRRHOTIC PATIENTS

Bacterial translocation (BT) plays an important role at development of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). At recent studies, spontaneous bacterial peritonitis has been found to be related to nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) gene allele and frequency of BT. In this study, we aimed to investigate the relationship between spontaneous bacterial peritonitis and BT and NOD2 variant in cirrhotic patients with ascites.

Total of 82 cirrhotic patients with SBP regardless of etiology and total of 89 patients without SBP were included to the study. In our study, we examined 3 NOD2 gene alleles (p.R702W, p.G908R, c.3020insC) which were thought to be related to BT. Bacterial DNA in ascitic fluid and serum interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor receptor (TNF-R) and lipopolysaccharide binding protein (LPB) levels were examined at all patients for detect BT. Existence of bacterial DNA in ascitic fluid in patients with SBP was significantly different than those without SBP. There was no significant difference for NOD2 gene variant frequency in patients with or without SBP. In patients with culture-positive SBP, NOD2 gene variant frequency was significantly different than those of culture-negative patients. Frequency of bacterial DNA in ascitic fluid of patients with NOD2 gene variant were statistically different than those without NOD2 gene variant.

Our findings suggest that there was a significant relationship between ascites culture and bacterial DNA positivity and NOD2 gene mutation.

**The key words:** NOD2, bacterial translocation, spontaneous bacterial peritonitis

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>1. SPONTAN BAKTERİYAL PERİTONİT(SBP):</b> .....	<b>3</b>
1.1. TANIM.....	3
1.2. ETYOPATOGENEZ .....	3
1.3. KLİNİK.....	4
1.4. TANI .....	4
1.5. AYIRICI TANI .....	5
1.6. TEDAVİ.....	6
1.6.1. POLİMİKROBİYAL BAKTERASİT .....	6
1.6.2. PROFLAKSİ .....	7
<b>2. BAKTERİYAL TRANSLOKASYON</b> .....	<b>8</b>
2.1. İNTESTİNAL BAKTERİYAL OVERGROWTH .....	8
2.2. İNTESTİNAL GEÇİRGENLİK ARTIŞI.....	9
2.3. İMMUNOLOJİK ZAYIFLAMA .....	10
2.4. BAKTERİYAL TRANSLOKASYON TANI METOTLARI .....	13
2.5. BAKTERİYAL TRANSLOKASYONUN KLİNİK SONUÇLARI.....	14
<b>3. NOD 2 GEN</b> .....	<b>16</b>
<b>4. TÜMÖR NEKROSİS FAKTÖR</b> .....	<b>18</b>
<b>5. İNTERLÖKİN-6</b> .....	<b>20</b>
<b>6. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>21</b>
6.1. Klinik Örneklerin Toplanması .....	21
6.2. Moleküler Yöntemler .....	22
6.2.1. Örneklerde Bakteriyel DNA'nın Tespiti .....	22

6.2.1.1.DNA izolasyonu: .....	22
6.2.1.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile 16S rRNA'nın çoğaltılması: .....	22
6.3. Real-Time PCR ile NOD2 Gen Mutasyonlarının Tespiti .....	22
6.4.Baz dizi analizi.....	23
6.5.Elisa Kitlerinin Çalışılması .....	24
6.6. İstatistik.....	25
<b>7. BULGULAR.....</b>	<b>26</b>
<b>8. TARTIŞMA.....</b>	<b>31</b>
<b>9. SONUÇ .....</b>	<b>37</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>38</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Bakteriyal Translokasyon Patogenezi(BT).....	12
<b>Şekil 2.</b> p.R.702W Gen Mutasyonu .....	23
<b>Şekil 3.</b> p.G908R Mutasyonu.....	24
<b>Şekil 4.</b> c.3020insC Mutasyonu .....	24

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Mutasyon tespiti için kullanılan primer ve probalar .....	23
<b>Tablo 2:</b> NOD2 Gen Aleli ve SBP arasındaki ilişki .....	26
<b>Tablo 3.</b> NOD 2 Gen varyant sıklıkları ile asit sıvısında bakteriyel DNA sıklığı arasındaki ilişki. ....	27
<b>Tablo 4.</b> NOD 2 Gen varyant sıklıkları daha önce geçirilmiş varis kanama ve SBP atak öyküsü arasındaki ilişki .....	27
<b>Tablo 5.</b> NOD 2 Gen varyant sıklıkları ile CHILD,MELD,IL-6,LBP ve TNFR arasındaki ilişki.....	28
<b>Tablo 6.</b> NOD 2 Gen varyant sıklığı ile asit kültür pozitifliği arasındaki ilişki .....	29
<b>Tablo 7.</b> SBP varlığı ile Child, MELD skorları ve serum IL-6, TNF-R ve LBP düzeyleri arasındaki ilişki.....	29
<b>Tablo 8.</b> SBP varlığı ile asit sıvısında bakteriyel DNA varlığı arasındaki ilişki .....	30
<b>Tablo 9.</b> SBP varlığı ile daha önce geçirilmiş SBP ve varis kanama öyküsü arasındaki ilişki.....	30



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BT	: Bakteriyal Translokasyon
GİS	: Gastro İntestinal Sistem
IL	: İnterlökin
KNNA	: Kültür Negatif Nötrositik Asit
KS	: Karaciğer Siroz
LPB	: Lipopolisakkarit Binding Protein
LPS	: Lipopolisakkarit
MDP	: Muramyl Dipeptid
MLN	: Mezenterik Lenf Nodları
MNB	: Monomikrobial non-nötrositik bakterisit
NF-KB	: Nükleer Faktör
NOD2	: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Containing 2
PAMPs	:Patojenin korunmuş değişik moleküler paternlerini
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
RES	: Retiküloendotelyal Sistem
SBP	: Spontan Bakteriyal Peritonit
TLR	: Tool-like Reseptör
TNF	: Tümör Nekrosis Faktör
TNF-alfa	: Tümör Nekrosis Faktör-alfa
TNF-R	: Tümör Nekrosis Faktör reseptör

## GİRİŞ VE AMAÇ

Spontan bakteriyal peritonit(SBP) sirozun sık ve ciddi bir komplikasyonudur. Şiddetli karaciğer yetmezliğinin bir işareti olan SBP siroz ve asitli hastaların %30 da meydana gelir (1). SBP terimi yaklaşık 40 yıl önce Conn tarafından ortaya atıldı(2,3). SBP teriminin geliştirilmesinde intestinal bakteri translokasyon (BT) önemli yer tutmaktadır. Ancak BT ve SBP'ye zemin hazırlayan genetik faktörler bu güne kadar tespit edilememiştir. Uzun bir süre artmış bakteriyal overgrowth ve immun disfonksiyonuna ek olarak, SBP riski olan hastalarda artmış intestinal permabilite ve barsaktaki BT bir ön koşul olarak kabul edilmiş(5,6) ve bu bakterilerin mezenterik lenf nodları ve extraintestinal lenf nodlarına göç ettiği tahmin edilmiştir(4). SBP patogenezinde BT'nin yeri hayvan deneyleriyle de kanıtlanmıştır(5,7). İmmün sistem SBP gelişiminin her basamağında rol alır. Asidik sıvıdaki yetersiz serum kompleman aktivitesi, retiküloendotelial sistem disfonksiyonu, yetersiz opsonik aktivite gibi sebepler, SBP gelişiminde rol almaktadır(9,10). 2001 yılında nucleotide-binding oligomerization domain containing 2(NOD2) gen varyantları Crohn hastalığında bozulmuş mukozal bariyer fonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur(11,12). NOD2 barsakta bakteri ve bakteriyal ürünleri tanımada rol almakta olup, NOD2 risk varyant taşıyıcılarında NF-KB(nükleer faktör) aktivasyonu yetersiz olduğundan barsakta bakterilerin ve translokasyon ürünlerinin ortadan kaldırılmasında yetersizlik olabilir(13). Ayrıca NOD2 varyantlarının sepsis(14) ve graft-versus-host hastalığında(15) sağkalım üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir ancak herhangi bir karaciğer hastalığı için çok az veri mevcuttur. Appendrodt ve arkadaşlarının, ufuk açan çalışmalarında, prospektif ve combine retro-prospektif analizlerinden sonra, NOD2 varyantı taşıyan sirozlu ve asitli hastalarda nötroitik asit riskinin 3 kat arttığını raporladı, yine aynı çalışmada NOD2 risk alleli taşıyanlarda 4 kat artmış mortalite gözlemlendi(94). Burns ve arkadaşlarının çift merkezli prospektif çalışmalarında, sirozlularda, NOD2 geninin yaygın risk varyantı ile kültür pozitif SBP ve monomikrobiyal bakterasitliler arasında bağımsız bir ilişki raporladılar(116). Biz karaciğer sirozlu hastalarda BT ve SBP gelişimini NOD2 risk varyantları ile ilişkili olduğunu varsaydık. Bu çalışmamızın amacı ileri karaciğer yetmezliği, siroz ve asit gelişmiş hastalarda SBP, BT ile NOD2 geni arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.

Araştırma için seçilen 3 NOD2 türevi (p.R702W, pG908R, and c.3020 sC;) lipopolisakkarit ve peptidoglikana yanıt olarak NF-KB aktivasyonunu olumsuz etkilemektedir(16).

## 1. SPONTAN BAKTERİYAL PERİTONİT(SBP):

### 1.1. TANIM

SBP hastanede yatan sirozlu hastaların %10-20'sinde ortaya çıkan yaygın bir enfeksiyöz komplikasyon olup destek ve antibiyotik tedavisine rağmen ortalama %20 ölüme neden olmaktadır (17).

Spontan bakteriyel peritonitin üç varyantı tanımlanmıştır:

1-Monomikrobiale non-nötrositik bakterasit(MNB): Asit sıvısında polimorfonükleer lökosit (PMNL) sayısı < 250/mm<sup>3</sup> olması, asit sıvı kültüründe bir mikroorganizmanın üremesi ve intraabdominal cerrahi ile tedavi edilebilecek enfeksiyon kaynağının olmaması kriterleri ile tanı konur (18).

2- Kültür negatif nötrositik asit (KNNA): Asit sıvısında PMNL sayısının 250 mm<sup>3</sup> veya daha fazla olması, asit kültürde üreme olmaması ve PMNL artışının başka sebebe (asit içine kanama, peritonitis karsinomatoza olması, tüberküloz veya pankreatit) bağlı olmaması ile tanı konur (19).

3-Klasik SBP: Asit sıvısında PMNL sayısının 250 mm<sup>3</sup> veya daha fazla olması, asit sıvısı kültüründe bir bakteri üremesi ve sekonder bakteriyel peritonitin dışlanmasıyla konur (20,21).

### 1.2. ETYOPATOGENEZ

Asiti olan tüm sirotik hastalarda SBP gelişebilir. Gram negatif aerob bakteriler ve non-enterokok streptokok türleri (E.coli, Klebsiella pneumoniae ve pneumococci türleri) bu hastaların asitlerinde en sık izole edilen bakterilerdir(1). Enterik mikroorganizmaların barsak mukozal bariyerini geçerek mezenterik lenf nodlarına ulaştığı (bakteriyel translokasyon) ve duktus torasikus aracılığıyla sistemik kan dolaşımına geçtiği öne sürülmüştür(23,7). Düşük bakterisidal ve opsonik aktivitesi olan asitik sıvıya bakteri ekilmesinden SBP'nin sebebi olabilir(25). Karaciğer hastalığının etyolojisinin SBP için predispozisyon yarattığına, prognoz ve tedaviye yanıt üzerine etkisinin olduğuna dair ciddi veriler bulunmamaktadır(26,27). Opsonik aktivite asit sıvı protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır(10). SBP gelişimi ile asit sıvı protein miktarında farklılık olmamaktadır(29). Asit proteininin düşük olması (<1gr/dl) SBP gelişimi için risk faktörüdür(30).

MNB sıklıkla antibiyotik ihtiyacı olmadan iyileşmektedir(21). Asit, PMNL sayısında artış olmadan steril hale geçmektedir. PMNL'lerin sıvıya geçişi periton makrofajlarının infeksiyonun kontrolünde yeterli olmadıkları anlamındadır(29). KNNA tanılarının çoğu duyarlı kültür yöntemlerinin kullanımına bağlıdır (32). Antibiyotik tedavisi öncesi ardışık parasentez yapılan KNNA hastalarında PMNL sayılarının spontan düştüğü ve kültürlerin negatifleştiği görülmüştür(29). Duyarlı kültür yöntemleri kullanıldığında KNNA spontan düzelen SBP'yi temsil edebilir. Bu hastalarda parasentez sırasında vücut savunma sistemleri tarafından tüm bakteriler temizlenmiş ama PMNL sayısı daha normale dönmemiştir(32). Üst Gastro İntestinal Sistem (GİS) kanamalı sirotik hastalarda yatış esnasındaki infeksiyon riski %40 dolayındadır(33). Şoka gelişen hastalarda GİS'ten bakteri translokasyonunun(BT) artışı SBP gelişimine neden olabilir (34). İdrar yolu infeksiyonu SBP gelişimi için bir risk faktörüdür(35).

Sonuç olarak SBP, barsakların bakterileri barsakta sınırlayamamasının ve immün sistemin barsaktan transloke olan virulan bakterileri yok edememesinin sonucudur(36).

### **1.3. KLİNİK**

SBP'de klinik çok farklı olabilir. Karın ağrısı ve ateş tek bulgu olabilir. GİS motilite değişikliği, bulantı, kusma, diyare, hipotermi, hipotansiyon, böbrek fonksiyon testlerinde bozulma, hepatik ensefalopati, elektrolit imbalansı saptanabildiği gibi hastaların üçte birlik kısmında bu semptom ve bulguların hiçbiri olmayabilir(19,38).

Ateş %45-66 ve karın ağrısı %42-73 ile en sık görülen semptomlardır. Asit dekompanasyonu ile başvuran hastaların %22,2'sinde ateş ve karın ağrısı saptanmıştır(27). SBP hastaları genellikle artmış bilirubin düzeyi ve uzamış PTZ değerlerine sahip Child B, C siroz hastalarıdır(39).

### **1.4. TANI**

Tanı parasentez ile konur. Tanı için şüpheli olunmalı ve parasentez endikasyonu için eşik düşük olmalıdır. Klinik kötüleşme, ateş ve karın ağrısı varlığında parasentez yapılmalıdır(32).

KNNA; klinik özellikler, seyir, asit ve serum testleri, takip, tedavi ve prognoz

açısından SBP ile aynı olmaması(19) nedeniyle farklı bir SBP varyantı (kültür negatif SBP) kabul edilebilir. Daha duyarlı metotlar kullanılmasına rağmen klinik SBP özelliklerine ve yüksek asit PMNL sayılarına sahip hastaların %40'ında asit kültürlerinde etken ürememektedir(39). Bu nedenden dolayı SBP tanısı esas olarak asitteki PMNL sayısına göre konmaktadır ve KNNA hastaları SBP grubu içinde yer alabilir. İnternational Ascites Club tarafından asit PMNL sayısı 250 ve daha fazla olan hastaların asit kültür sonuçları beklenmeden SBP olarak değerlendirilmesi ve bu hastalara antibiyotik tedavisi başlanması önerilmektedir(1). Asit hemorajikse (asit kırmızı küre  $>10000 \text{ mm}^3$ ) her 250 kırmızı küre için asit PMNL sayısı bir tane düşürülmelidir. Asit lökosit sayısı, steril asitte de artabilmesi(40,41) ve diüretik tedavisinden etkilenebilmesi nedeni ile tanıda daha az yararlıdır. Asit sıvısı hücre sayımında manuel yöntem altın standart kabul edilmiştir. Angeloni ve arkadaşları tarafından 74 siroz hastasından elde edilen 130 örneklik seride manuel ve otomatik hücre sayımı arasında çok iyi bir uyum olduğunu göstermişlerdir. Otomatik hücre sayımı ile ortalama  $6 \text{ hücre/mm}^3$  fark, SBP tanısında %94 sensitivite %100 spesifite, %100 pozitif prediktif değer ve %99,1 negatif prediktif değer ortaya çıkmıştır(41). Otomatik yöntemin avantajlarından biri acil şartlarında bulunabilmesi, 2 dakikada sonuç verebilmesi ve daha ucuz olmasıdır. SBP tanısında strip testleri artık ucuz, hızlı ve etkin olması, asitte lökosit bakılması nedeniyle kullanılabilir(42).

Asit sıvının gram boyaması birçok bakterinin görüldüğü sekonder peritonitte ayırıcı tanısında yararlıdır. Ancak spontan asit infeksiyonlarında ampirik antibiyotik tedavisini yönlendirmede çok az öneme sahiptir(29).

### **1.5. AYIRICI TANI**

Genellikle barsak perforasyonu veya karın içi apselere bağlı oluşan sekonder peritonit, tedavisinin cerrahi olması nedeniyle ayırıcı tanıda değerlidir. Asit sıvı kültüründe birden fazla mikroorganizma üremesi, standart antibiyotik tedavisine yanıt olmaması veya glukoz  $<50 \text{ mg/dl}$ , asit protein  $>1 \text{ gr/dl}$ , LDH'nin normal serum değerinin üzerinde olması kriterlerinden iki tanesinin bulunması durumunda sekonder peritonit tanısı olasıdır. Monomikrobiyal olan sekonder peritonitin tek sebebi ise perforasyon safra kesesidir(43).

Bir çalışmada asit sıvı karsinoembriyjenik antijen ve alkalen fosfataz

düzeyleri de sekonder peritonitin SBP'den ayırt edilmesinde yararlı bulunmuştur(43). Bu hastalarda araya asit girmesiyle inflame visseral ve paryetal periton birbirine temas etmediğinden klasik cerrahi karın gelişmez.

## **1.6. TEDAVİ**

SBP ciddi, mortalitesi ve nüks olasılığı yüksek bir komplikasyon olup enerjik şekilde tedavi edilmelidir. Tedavi aktif enfeksiyon tedavisi ve nükslerin önlenmesi şeklinde yapılmalıdır. Aktif enfeksiyonun erken tanısı ve etkili tedavisi mortaliteyi azaltır. Ciddi SBP hastaları tercihen hastaneye yatırılarak yakın takip edilerek tedavi edilmelidir.

Aktif enfeksiyonun tedavisinde asit ile mücadele edilerek asit olabildiğince azaltılmalı ve intravenöz geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılmalıdır. Eğer antibiyotik tedavisi uygun ise 48 saat içinde asit sıvı PMNL sayısı %50 azalır. Yapılan klinik çalışmalarda; ampicilin ve aminoglikozit kombinasyonunun tam kür başarısı %76, üçüncü kuşak sefalosporin ve özellikle cefotaxime ile (3x2 gr İV) %85 tam kür sağlamak mümkündür. Cefotaxime geniş spektrumlu, hidroliz işlemine ve Beta laktamazların pek çoğuna dirençli bir antibiyotiktir. Gram negatiflere etkinliği 1. ve 2. kuşak sefalosporinlere göre daha fazla olup gram pozitif etkinliği daha az olsa da streptokokların çoğuna etkilidir(44).

### **1.6.1.POLİMİKROBİYAL BAKTERASİT**

Genellikle travmatik parasentez nedeniyle gelişir(Parasentezde hava veya gaita ile bulaşılır). Asit sıvısında PMNL  $<250 \text{ mm}^3$  ve kültürde gram pozitif bakteriler veya multiple organizmalar ürer. Eğer asit mayide protein  $>1 \text{ gr/dl}$  saptanırsa klinik izlem, protein  $<1 \text{ gr/dl}$  ise veya bulgu varsa Gr (+) ve aneroblara yönelik antibiyotik başlanmalıdır. Sekonder olarak gelişen bir olaydır. Üçüncü kuşak bir sefalosporin (cefotaxime 3x2 gram İV dozda) + anti-anaerobik bir ilaç (metranidazol) verilir. Tedavinin süresi klinik cevap ve seri asit sıvısı PMNL sayımı ve kültür sonuçlarına göre planlanır.

### **1.6.2. PROFLAKSİ**

Tedaviye cevap veren hastalardaki en önemli problemlerde biri de nüksür. Nüks oranı %68 civarındadır. İlk SBP atağından sonra 1 yılda nüks oranı %40- 69 olarak bildirilmiştir (21,45). Nüksü engellemek için profilaktik antibiyotik gerekmektedir. Özellikle asit protein düzeyi 1 gr/dl altında olanlara planlanmalıdır. Profilaksi için genellikle kinolon (DNA- giraz inhibitörleri) grubu antibiyotikler öncelikli tercih edilir. Özellikle de norfloksasin ile 400mg/gün dozda tedavi edilen hastalarda nüks %20'ye kadar düşmektedir. Norfloksasin yanında siprofloksasin de profilakside kullanılabilir. Bu antibiyotiklerin dezavantajı pahalı olmaları, kinolon türevlerine rezn mikroorganizmaların artması ve bunların gelecekte bir problem olabileceğidir.



## **2. BAKTERİYAL TRANSLOKASYON**

Bakteriyal enfeksiyonlar sirotik hastalarda sık görülen komplikasyonlar olup hastanede yatan sirozlu hastalarda enfeksiyon insidansı %32 civarındadır(46,47). Genel populasyonun nosokomiyal enfeksiyon insidansı %5-7'dir. Sirozlu hastalarda bakteriyal enfeksiyonlar kötü prognoz ve mortalite artışıyla ilişkilidir(48). Sirozlu hastalarda ensık görülen enfeksiyon %80 Gram (-) basiller, özellikle E. coli neden olduğu SBP, pnömoni ve idrar yolu enfeksiyonlarıdır. Sirozlu hastalarda enfeksiyon ataklarının enterik kökenli olduğu görülmektedir. İntestinal lümeden bağırsak duvarını aşp mezenterik lenf noları (MLN) ve diğer lenf nodlarına canlı bakteri geçişi SBP ve bakteriyemi gibi spontan enfeksiyonları açıklayan patofizyolojik mekanizmadır. Bu mekanizma ilk olarak 1979 da tanımlanmış olup BT olarak adlandırılmıştır(49). BT karaciğer sirozu dışında hemorajiler-hemorajik şok, bağırsak tıkanıklığı, majör travmalar, yanık ve şiddetli akutpankreatit ataklarında da görülür(50, 51). Yapılan klinik çalışmalara göre BT karaciğer fonksiyon kaybı olan siroz hastalarının %25-30'unda görülürken(52), sirozlu ve asit gelişen denek farelerin %45-78'inde görülür(5,55). CCl<sub>4</sub> kullanılarak oluşturulan deneysel siroz modellerinde BT, siroz ve asit gelişen ratlarda MLN kültür pozitifliği bildirilmiş olup, MLN kültür pozitifliği asitsiz sirozlu hayvanlarda %0-10 olarak bildirilmiştir(54). Yapılan bir çalışmada profilaksi almayan sirotik hastalarda BT Child-A grubunda %3.4, Child-B grubunda %8.1, Child-C grubunda %30 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada profilaksi verilen hastaların sadece %4.5'inde BT tespit edilmiştir(52). BT ve MLN tutulumu ileri derecede sirozu olan hastalarda anlamlı derecede fazladır.

Portal hipertansiyon ince barsak duvarında yapısal değişikliklere neden olarak, motiliteyi azaltarak, protein kaybettirici enteropati gibi işlevsel bozukluklara ve GİS bakteri aşırı çoğalmasına neden olarak BT'yi artırabilir(52,56).

### **2.1. İNTESTİNAL BAKTERİYAL OVERGROWTH**

İntestinal bakteriyal overgrowth(İBO) ince bağırsakta anormal bakteriyal artış ile karakterize heterojenik bir sendromdur(57). Bir çok yazar İBO teşhisinde proximal jejunum aspiratının her bir mm<sup>3</sup>'de 10<sup>5</sup> veya daha fazla bakteri kolonisinin üremesini dikkate almıştır. Bununla beraber İBO tanısında altın standart jejunal aspiratın mikrobiyolojik araştırmasıdır. Ancak klinik uygulamalarda bazı zorluklar vardır. Bu

invaziv bir testtir. Mikrobiyal araştırmalar laboratuvar tetkiklerinde yüksek kalite ve özgünlük bekler. İBO dağılımlı düzensiz olabilir ve bunu tespit etmek için birden fazla örneklemeye ihtiyaç duyulabilir. İnvaziv olmayan, daha çok klinik uygulamalarda glokuz veya laktoz uygulaması sonrası hidrojen yada metan nefes testi kullanılır.(58) Ancak gelişi güzel elde edilen nicel jejunal kültür, nefes testleri ile kıyaslandığında hiç birinin mükemmel olmadığı görülür. Muhtemelen yavaşlamış intestinal transit zamanı, düşük asit gastrik sekresyonu, intestinal immünolojik faktörler, pankreatik ve safra sekresyonlarıyla ilişkisi olan İBO'nun BT'ye ilerlemesindeki ana faktörlerden biridir. İntestinal sistemdeki herhangi bir segmetteki spesifik bakteriyal yoğunluk ile MLN'de bulunan canlı bakteri sayısı arasında doğrudan ilişki farelerde gösterilmiştir(59). Yapılan deneysel çalışmalarla asidi ve BT'si olan sirozlu denek fareleri BT'si olmayanlarla kıyaslandığında daha yüksek İBO oranına sahiptirler(60). BT'nin İBO'lu denek farelerinin %50'sinde mevcut olmayışı gerçeği İBO dışındaki başka faktörlerin BT patogenesisinde rol aldığını göstermektedir. Klinik çalışmalar İBO'nun kontrol grubu hastalarından ziyade ileri derecede karaciğer yetmezliği olan siroz hastalarında daha yaygın olduğunu göstermiş olup(61). SBP öyküsü olan hastalarda İBO sık görölmektedir(62). Bu çalışmalarda tanı için güvenilir bir test olmayan nefes hidrojen testi ile İBO tanısı konmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada ise jejenum aspiratlarının kantitatif kültürleri SBP'nin gelişimi ile İBO'nun varlığıyla bir ilişkisi olmadığı gösterilmiştir. İlginç olan şudur ki, SBP tekrarlama oranı ve asidik sıvıdaki protein sıvısı, lokal bağışıklık belirteçleri ve serum bilirubin oranları arasında anlamlı bir ilişki vardır(63).

## 2.2. İNTESTİNAL GEÇİRGENLİK ARTIŞI

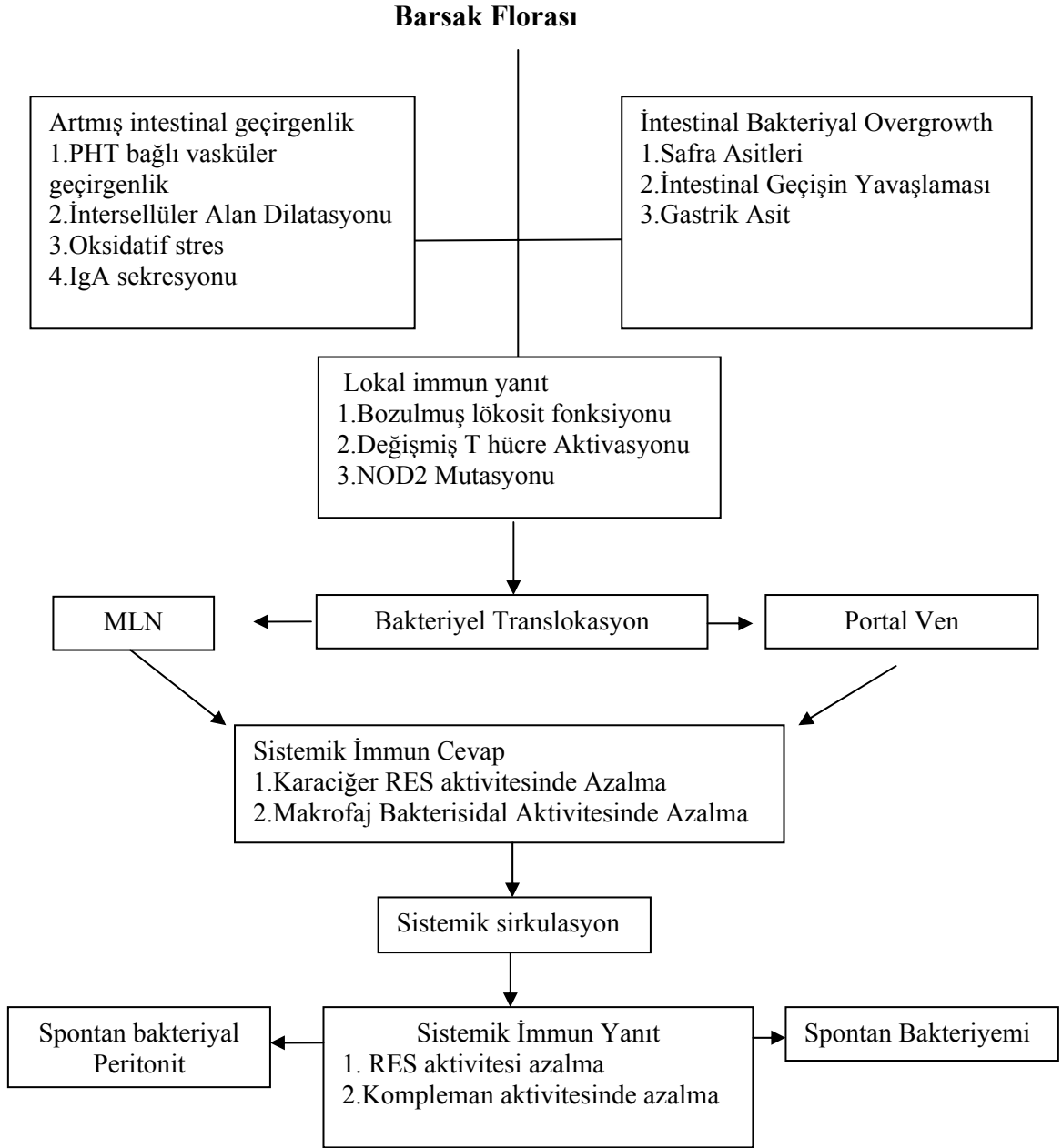
İntestinal bariyer; intestinal epitelyum hücrelerince salgılanan müsinöz komponent ve maddelerin seçici geçisine izin veren epityum hüclerince oluşturulan sıkı bağlantılarca (tight junctions) oluşturulur. Siroz bakteri ve ürünlerine geçirgenliği artıran intestinal mukozadaki yapısal ve foksiyonel değişkenlere neden olur. Deneysel çalışmalarla intestinal epitelyumda mukozal konjesyon, hücreler arası genişleme, intestinal bariyerde ödem ve submukozal inflamatuvar değişiklikler gözlemlenmiştir(64,65,66,67). Ancak bu yapısal değişikliklerin BT'nin sebebi yada sonucu olup olmadığı net değildir. Müsin büyük mitarlarda (3 l/gün) enterosit goblet

hücrelerince salgılanıp kalın bir bir tabaka oluşturan glikoproteinler bakterilerin enterosit mikrovillusları ile direk temas kurmasını önler. Ayrıca intestinal mukus salgıları içerdikleri immunglogulin A'nın etkisiyle toksin ve diğer bakteriyel ürünleri nötralize ederken, bakterileri bağlar ve böylece bakterilerin intestinal epitelyuma yapışmasını ve kolonize olmasını engeller(68). Safra salgıları barsak mukozası üzerinde uyguladığı trofik etki, endotoksini nötralize etmesi ve İBO'yu inhibe etmesi ile BT'yi önlemede rol oynar(69). Safra asitleri BT'ye karşı korurken intestinal lümeden bakteriyal ürünlerin geçişini önler(70,71). Yapılan çalışmalarla ileri derecede siroz hastalığı olanlarda özellikle SBP , hepatic ensefalopati ve sepsis geçirenlerde makromoleküllere intestinal geçirgenliğin arttığı gösterilmiştir(72,73). İntestinal mukozanın oksidatif hasarı(74) ve endotoksemi nitrik oksit ve inflamatuvar sitokinlerin seviyesini artırır, buda sirozdaki intestinal geçirgenliğin artışından rol oynayabilir(75,76). Yapılan deneysel çalışmalar ile İBO ve intestinal geçirgenlik artışı olan ratların %87'den fazlasında BT meydana geldiği gösterilmiş olup, buna karşılık sadece intestinal geçirgenlik artışı olan hayvanların hiçbirisinde BTbulgusuna rastlanmamıştır(60). Ayrıca intestinal geçirgenlik müdahalesi olmadan sadece İBO'ya karşı yapılan tedavi ile sirotik ratlarda BT oranı düşmektedir(77).

### **2.3. İMMUNOLOJİK ZAYIFLAMA**

İntestinal sistem aktif bir bağışıklık organı olup bağışıklık sistemi ile alakalı her türlü lökositleri içerir. İntestinal immun sistem barsak ilişkili lenfoid dokudan oluşur, vücudun en büyük immunolojik organı olup dört lenfoid kompartmandan oluşur. O dört bölüm şunlardır; peyer plakları, lamina propria lenfositleri(dentritik hücrelerde dahil), intra epitelyal lenfosit ve hem adaptif, hemde doğal yanıtları içeren MLN'dir. Lokal sistemik bağışıklıktaki değişiklikler sirotik hastalarda BT'nin ilerleyişi ile ilişkilidir. MLN veya portal kana transloke olan bakteriler bağışıklığı normal olan hastalarda bakteriyemi yada enfeksiyonlara sebep olmaya başlamadan önce fagosite edilirler ve etkisizleşirler. Siroz hastaları sistemik bağışıklık değişikliklerine sahip olup buda enfeksiyonun ve BT'nin gelişmesine katkıda bulunur(68). İlerlemiş siroz olgularında azalmış hücrel ve humoral immun yanıt(78,79) ile SBP gelişme olasılığı birbiriyle ilişkilidir(80). Siroz bakteriyemi ve hematogen edinilen diğer enfeksiyonlara karşı en uygun savunma sistemlerinden biri olan retiküloendotelyal sistemin(RES) aktivitesinin

azalması ilişkilendirilmiştir. Porto-sistemik şantın varlığı ve kupfer hücrelerinin fagositik kapasitesinin düşüşü bakteriyemi ve SBP gelişimi ile ilişkilidir(81). RES'in değişmiş temizleme kapasitesi sadece canlı bakterileri değil, aynı zamanda endotoksin veya bakteriyel DNA gibi bakteriyel ürünleride etkiler(68). İnamura ve arkadaşları sirotik farelerde BT oranı, intraepitelyal lenfositlerin azalmış hücresel çoğalma kapasitesi ve interferon gamma sentezi arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir(82). Sentezlenen sitokinler, özellikle tümör nekrosis faktör alfa(TNF-alfa), interlökin(IL) ve nitrik oksit barsak mukozasında oksidatif hasarı artırarak(83) muhtemelen BT lehine barsak geçirgenliğini artırır. Öte yandan, sirozlu ve asitli denek farelerine monoklonal anti TNF(tümör nekrosis faktör) antikorlarının verilmesi BT'de devasa bir düşüş sağlamıştır(84) Lokal immun cevap intestinal lümendeki bakterinin sistemik sirkülasyona geçmesini engellemede yeterli değildir. Lokal ve sistemik hastalıkların mantıklı bir sonucu olarak, canlı bakteri ve ürünleri (endotoksin veya bakteri DNA), asit sıvısının düşük bakterisidal kapasitesi nedeniyle sistemik sirkülasyona geçebilir. Bir bütün olarak bu immunolojik anormallikler BT patogenezinde, spontan bakteriyemide, SBP ve BT ilişkili komplikasyonların gelişiminde rol oynar. Sonuç olarak öncelikli olarak değerlendirilen bu üç bozukluk (İBO,intestinal geçirgenlik artışı ve immun sistem bozuklukları) sirozda BT'nin patogenezinde önemli rol oynar(68).



**Şekil 1.** Bakteriyel Translokasyon Patogenezi(BT). BT sürecine dahil faktörler; intestinal bakteriyel overgrowth, bakteri bağlanmasını ve penetresyonunu önleyen mekanizmalarda değişiklikler(intestinal permabilite artışı) ve son olarak lokal ve sistemik bağışıklık yanıtlarını içerir. MNL: Mezenterik Lenf Nodu, RES:Retikulo-endotelial Sistem, PHT: Portal Hipertansiyon

## 2.4. BAKTERİYAL TRANSLOKASYON TANI METOTLARI

Yapılan çalışmalarda BT, MNL kültür pozitifliği olarak tanımlanmıştır. BT ile alakalı insanlarda yapılan çalışmalar sınırlıdır, zira cerrahi gerektirmekte, optimal olmayan koşullarda MLN çıkarılmasını gerektirmektedir(örneğin perioperatif antibiyotik kullanımı). Buna karşın insanlarda BT tanısını koymak için alternatif yaklaşımlar ortaya konmuştur.

Lipopolisakkarit(LPS) Gram(-) bakterilerin bakteri duvarının majör komponenti olup, önemli bir markır olarak sistemik sirkülasyonda olması hastada BT'nin olduğunu gösterir. Fakat BT tespitinde LPS ölçümünün tek başına dikkate alınması için pek çok durum sözkonusudur; lymulus amebocyte lysate aslında sudaki LPS tespiti için kullanılan bir metottur ve bu protokoller biyolojik örneklerdeki LPS'lerin kantitatif ölçünü sağlayan spesifik metotlar değildir. Dahası LPS'ler kısa yarılama ömürleri ve pek çok faktörden (LPS transporter konsantrasyonu, antikorlar, HDL ve diğer immunogenetik, mikrobiyolojik ve fizyolojik değişkenler)(85), örneklerin vucuttan toplanması sırasında kullanılan materyalin endoksinde arındırılmış olması gerekmektedir. Bu handikapları nedeniyle sirozda endotoksin tespiti farklı çalışmalarda %0-93 kadar değişen oranlarda verilmektedir(86). Karaciğerden bakteriyemi veya endotoksemi halinde sentezlenerek salınan ve rölatif olarak uzun yarılanma ömrüne sahip lipopolisakkarit binding protein(LPB) ölçümü BT'yi gösteren bir marker olarak önerilmiştir. Hastalarda yükselmiş LPB düzeyleri hastanın proinflamatuvar durumda olduğunu ve hemodinamisinin bozulmuş olduğunu göstermekte ve norfloksasin ile barsaktaki kontaminasyon düzeltildiğinde LPB düzeyleri normale gelmektedir(87). Enterasan olarak siroz ve asiti olup enfeksiyonu olmayan hastalarda yapılan prospektif bir çalışmada LPB düzeyi artmış olanlarda bakteriyel enfeksiyon gelişme riskinin normal LPB düzeyleri olanlara göre 4 kat arttığı gösterilmiştir(88). Buna karşın LPB yalnızca Gram (-) bakteriyel translokasyonu yansıtmakta, Gram (+) translokasyona karşı gösterge olmamakta, buda yöntemin en önemli eksikliğidir(89). Gr(+) bakterilerin hücre duvarını oluşturan şeker ve aminoasit içeren bir polimer olan serum peptidoglikan varlığı BT'de bir markır olarak hemorajik şok modeli olan yalnızca bir deneysel çalışmada denenmiştir(90). Ancak bu sirozdaki BTda bakteriyel ürünün tespit edilmesinde yararlı bir metot olduğunun kanıtlanması için daha çok çalışmalara ihtiyaç vardır(68). Geçen 10 yılda PCR bazlı bakteriyel DNA tespitinin gelişmesiyle

BT'nin tespitinde iyi bir markır olabileceği düşünöldü, çünkü sirozu olup da költürü (-) olan hastaların yaklaşık üçte birinde kanda bakteriyal DNA tespit edilebildi(91,92). Buna benzer sonuçlar insan çalışmalarıında da elde edilmiştir(52). Deneysel olarak siroz ve asit oluşturulmuş hayvan modellerinde MLN költür pozitif yada negatif olsada asit sıvılarında bakteriyel DNA tespit edilmesi, MLN'da bakteriyel translokasyon ürünlerinin varlığı ile eş zamanlılık gösterir(93). Bu veriler ileri sirozlu hastaların biyolojik sıvılarında bakteriyal DNA tespitinin BT'nin tanısında geçerli ve bir markır olabileceği hipotezini desteklemektedir. Fakat bakteriyal ürünün tespit edilmesi bakterinin canlılığını koruyup korumadığını belirtmez ama bununla birlikte bunların varlığının klinik sonuçları canlı bakteri varlığı ile karşılaştırıldığında farklılık olabilir. Bakteriyal DNA tespitinde standart metodun olmaması nedeniyle farklı sonuçlar rapor edilebilmektedir (94-96). Bu nedenle kliniğe katkısını tespit edebilmek için analitik metodların tek tip olması gerekmektedir(60).

## **2.5.BAKTERİYAL TRANSLOKASYONUN KLİNİK SONUÇLARI**

İmmun sistem geleneksel olarak doğal ve adaptif komponentlerden oluşur. Adaptif komponent iki tip hücre olan B ve T lenfositler etrafında organize olur ve bu belirli bir antijen için her bir hücre reseptörünün spesifik özelliğine dayanır. İlk olarak lenfosit bir antijen ile karşılaşır, o lenfositte spesifik klonal genişleme olur ve bu efektif bir immün cevabın oluşabilmesi için mutlaka gereklidir. Fakat adaptif immün sistemin lenfositteki klonal genişlemeyi sağlaması ve bunların efektör hücelere diferansiyasyonu genellikle 3-4 günü bulur. Bu süre konakçının zarar görmesinde daha fazla bir zaman alır. Bunun tersine doğal immün sistem komponentleri; ki bunlar antimikrobiyal peptidleri, makrofajları, dentritik hüceleri ve alternatif kompleman yolunu içermektedir, bunlar enfeksiyon sonrası hızlıca aktive olurlar ve patojenin replikasyonunu hızla kontrol altına alabilirler(60).

Tool-like reseptörler (TLR) bir tür membran proteini olup doğal immün cevapta rol alır, patojenin korunmuş değişik moleküler paternlerini(PAMPs) tanırlar. Günümüzde 10 tip TLR tanımlanmıştır. Her biri değişik patojenlerin korunmuş yapılarını veya PAMPs ları tanımaktadır. Sirozda TLR çalışmalarının çoğunu TLR-4(LPS tanır), TLR-2( Gram pozitif kok hücre duvarı peptidoglikan komponentinin varlığında aktive olur) ve TLR-9 (bakteriyal DNA'yı tanır) oluşmaktadır. Bu

reseptörlerin aktive olmasına müteakip sirozda özellikle splanik vazodilatasyon ve hiperdinamik sendroma neden olan hemodinamik değişikliklerin kötüleşmesini sağlayan proinflamatuvar sitokinler salgılanır(60). Riordan ve arkadaşları sirozlu hastalarda periferik kanda dolaşan mononükleer hücrelerde TLR ekspresyonunu araştırmışlar, TLR-2 ekspresyonunun up regüle edildiğini buna karşın TLR-4 ekspresyonunun ya değişmediği ya da down regüle edildiği, bununda Gr (+) koklar için önemli stimulatuar rolü varken Gr (-) basiller için böyle bir önemin olmadığını belirtmişlerdir(97). Fakat LPS'lerden farklı diğer bakteriyel ürünler örneğin bakteriyel DNA, lipoproteinler, ısı şok proteini 60'da değişik TLR'leri stimüle edebilir. Bilinen tüm TLR agonistleri monositlerden TNF sekresyonu ile indüklendiği gösterilmiştir. Bunun yanında sirozda mononükleer hücreler ve ilişkili proinflamatuvar sitokinler TLR ekspresyonunun up regülasyonuna neden olabilirler(98). Bakteriyel DNA omurgalı hayvanların DNAsından farklı olarak pek çok metillenmemiş dinükleotid dizileri içerir(bunlar ayrıca 'CpG' motifleri olarak aldandırırlar). CpG motifleri TLR-9 ile etkileşime girerler ve inflamatuvar yanıtı indüklerler(99). Yapılan çalışmalarda bakteriyel DNA'nın hücre aracılı immun cevabı aktive ettiği ve sirozlu asiti bulunan hastalarda peritoneal makrofajlarca nitrik oksitini aşırı üretimine sebep olduğu gösterilmiştir(100). Dahası non enfekte asitli olan hastalarda bakteriyel DNA varlığı SBP'li hastalardaki gibi immun yanıtı neden olmaktadır. Bakteriyel DNA ile ilişkili inflamatuvar yanıt bakteriyel DNA'nın serum konsantrasyonu ile direkt olarak orantılıdır, buda immun yanıtındaki bakteriyel DNA'nın translokasyonunun rolünü göstermektedir(101).

BT hepatik, sistemik ve hemodinamik anormalliklerini alevlendirebilir. Deneysel çalışmalarda sirozun hemodinamik sirkülasyonunun dahada kötüleşmesinin BT ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir(102). İnsanlardaki çalışmalar BT'nin indirek bir markırı olan LBP'nin artmış düzeylerine sahip sirotik hastalarda daha belirgin sistemik hemodinamik bozulma olduğunu göstermiştir ve bunu norflaksisin ile selektif intestinal dekontaminasyonla geriye çevrilebilir(87). Dahası asitli ve pulmoner hipertansiyonlu hastalarda bakteriyel DNA translokasyonu sistemik sirkulatuar disfonksiyonu artırıp periferik vazodilatasyonu alevlendirir, buda Tümör Nekrosis Faktör-alfa(TNF-alfa) artmış plazma düzeylerinin varlığı ile tahmin edilen artmış enflamatuvar durumla ilişkilidir(103).



### 3. NOD 2 GEN

Nükleotid bağımlı oligomerizasyon alanlarını içeren NOD reseptörler bakteriyel patojenleri tanıma ve temizlemede önemli rol oynayan model tanıma reseptör ailesidir. NOD2 geni bakteriyel hücre duvarı komponenti muramyl dipeptid(MDP)'i tanıyan ve konak defansının doğal yolunu aktifleyen sitozolik bir protein kodlar. NOD2'nin Kafkasyalılarda en az 30 varyasyon gösterirken, 3 yaygın tek nükleotid polimorfizmi iyice araştırılmış olup; çerçeve kayması mutasyonu 1007fs [3020insC, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) 13] (104) ve 2 missens mutasyonu R702W (2104C4T, SNP 8) ve G908R (2722G4C, SNP 12) (11). NOD2 gen varyasyonunun birkaç mekanizma ile bakteriyel translokasyonu desteklediğini gösteren kanıtlar var(106). Yapılan genetik çalışmalar NOD2 varyant taşıyıcılarının lokal immün sisteminin barsaklardaki BT sınırlamada aciz olabileceğini göstermiştir. NOD2; bağırsak epitelyal ve mononükleer hücreler ve hücre içi bir 'pattern recognition receptor'(model tanıma reseptörü) olarak ifade edilir ve bakteriyel hücre duvarı potansiyel bileşeni olan MDP algılayarak proinflamatuvar NF-KB pathway(sinyal yolunu) aktiveleştirir(13,114). NOD2 eksik farelerde bozulmuş epitelyal konak defansı, artmış bakteri yükü ve mukozal inflamasyondan dolayı Paneth hücrelerinin ve enterositlerin MDP'e yanıtı körelmiştir(106). NOD2 1007fs varyasyonu homozigot olan farelerin MDP'e maruz kaldıklarında, intestinal bütünlüğü bozan bakterinin indüklediği intestinal inflamasyondan dolayı artmış NF-KB aktivasyonu gösterdikleri belirlenmiştir(107). Crohn hastalarının intestinal biyopsileri üzerine yapılan bir çalışmada, NOD2 varyasyonu (özellikle R702W ve 1007fs), BT'ye korele olarak yükselmiş intramukozal endotoksin seviyelerinden dolayı artmış NF-KB aktivasyonu ve değişmiş epitelyal hücre-hücre teması gösterilmiştir(108). Klinik ortamda, Crohn'lu hastalarda ve diğer kohortlarda, NOD2'nin yaygın 3 varyantı ile olumsuz sonuç arasında bir ilişki raporlandı(109,110). Özellikle NOD2'nin 1007fs çerçeve kayması mutasyonu, sepsis hastaları(14) ve akraba olmayan allojenik kök hücre transplantasyonu vericilerinde tedavi ilişkili mortalite konulu bir kohort çalışmasında, 30 günlük mortalitenin bağımsız risk faktörüydü(112). Appendrodt ve arkadaşlarının, ufuk açan çalışmalarında, prospektif ve combine retro-prospektif analizlerinden sonra, NOD2 varyantı taşıyan sirozlu ve asitli hastalarda nötroitik asit riskinin 3 kat arttığını raporladı(94). Ancak bu

çalışma modeli poliklinikteki sirozlu SBP hastalarının kaydedilmemesi, tanı almaması ve asemptomatik süreçte olmasından dolayı yanılmaya müsaitti(113). Ayrıca NOD2 varyantlı hastalarda bozulmuş monosit/makrofaj cevabının yanında(114) NOD2 değişikliğinin inflamatuvar stimuluslara nötrofil aktivasyonu ve migrasyonu bozduğuna dair bazı kanıtlar mevcuttur(115). Bu nedenle NOD2 varyasyonu mevcut olan hastalarda, nötrofil migrasyonu ve asit sıvısının mikroorganizmalardan temizlenmesi bozulmuş olabilir(116).

Appenrodt ve arkadaşları yaptıkları çalışmada NOD2 risk alleli taşıyanlarda 4 kat artmış mortalite gözlemlediler(94). Bu hastalarda pozitif asit sıvısı kültür sonucu daha yüksek intraperitoneal bakteriyel enfeksiyon ve daha komplike bir hastalık gidişatı demektir. NOD2 risk allellerinin SBP'yle olan kanıtlanmış ilişkisi dekompanse sirozu olan hastaların %10-20'sini oluşturan genetik risk kohortunda bakteri translokasyonunun primer antibiyotik profilaksisi konusunda yapılacak bir çalışma için zemin oluşturmaktadır(116).

#### 4. TÜMÖR NEKROSİS FAKTÖR

1975 yılında Carswel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada BCG ile enfekte edilmiş ve endotoksin (bakteriyel lipopolisakkarid) enjekte edilmiş farelerin serumlarında, duyarlı fare sarkomlarının hemorajik nekrozuna ve bazı sarkomların da tamamen gerilemesine neden olan bir faktör saptamış ve buna tümör nekrosis faktör (TNF) adını vermişlerdir(117). Bunu takiben Aggarwel ve arkadaşları promiyelositik lösemi hücre dizisi doku kültür süpernatantlarında TNF'yi izole etmiş ve bunun 157 aminoasitten meydana gelen, 17000 dalton molekül ağırlığında bir polipeptit olduğunu saptamışlardır (118). Pennica ve arkadaşlarının TNF geninin DNA dizilişini saptayıp, E.coli üzerinde klonlayarak rekombinant insan TNF'sini elde etmeyi başararak bu konudaki çalışmalarda çığır açılmıştır(119). Yine aynı çalışmada 1984 yılında, TNF'ye benzer biyolojik aktivitesi olan lenfotoksin ile TNF'nin aminoasit düzeyinde %30 homolog oldukları saptanmış ve bu iki protein arasındaki yakın ilişki açığa çıkmıştır. Aynı zamanda kronik hastalıklardaki kaşeksinin etiyolojisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda, LPS enjekte edilen farelerin makrofajlarından, farelerde lipoprotein lipaz eksikliği, hipertrigliseridemi ve kaşeksi yapan bir faktör izole edilmiş, kaşektin adı verilen bu faktörün TNF ile benzer olduğu saptanmıştır (120). Bu bilgiler ışığında, yapısal ve fonksiyonel olarak birbirine benzer iki proteinden makrofaj-monosit ürünü olan TNF/kaşektine TNF-alfa, lenfosit ürünü olan lenfotoksine ise TNF-beta adı verilmiştir. Aktiviteleri birbirine benzeyen ancak idantik olmayan TNF-alfa ve TNF-beta salınımını düzenleyen genlerin ekspresyonu ve bu sitokinleri salgılayan hücrelerin çalışma sistemleri birbirinden farklı olarak düzenlenmektedir(118). TNF-alfa ve TNF-beta tek kopya genler olup insanlarda 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yer almaktadır (121). Burası aynı zamanda majör histokompatibilite (MHC) ve HLA-B loksn kodlayan bölgedir. TNF-alfa ve TNF-beta'nın benzer yapısal özellikleri bunları eksprese eden genlerin, ortak eksik bir genin duplikasyonu sonucu ortaya çıkan türevler olduğu grlmektedir (126).Çeşitli patolojik durumlarda artan TNF uyarılması ile TNF reseptör (TNF-R)düzeyi yükselmektedir. Özellikle enfeksiyöz durumlardan meningokoksemi, enfeksiyöz purpura, septik şok, bakteriyel menenjit gibi durumlarda TNF düzeyi artmaktadır. TNF'nin yükselmesinde Gram(-) bakterilerden açığa çıkan endotoksinlerin rolü çok büyüktür(122). Kronik karaciğer hastalığının seyrinde görülen ve prognozu oldukça kötü yönde etkileyen SBP'nin yaklaşık %70'i Gram(-) bakteriler

oluşturmakta ve bunun yarıya yakınında da etken E.coli'dir. Erken teşhis edilmesi çoğu zaman zor olan SBP'de TNF ve IL dőzeylerinin yőkselmesi beklenen bir durumdur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TNF'nin karaciğer fonksiyonları, hepatositler ve kolestaz őszerine patolojik etkileri ortaya çıkarılmıştır. TNF etkisi ile serum albumin konsantrasyonu ve karaciğer ilaç metabolizması ile ilgili sitokrom p450 aktivitesi dőřerken; CRP, fibrinojen gibi akut faz proteinleri, kompleman 3 , hepatic lipojenezis artmaktadır.

Farelere enjekte edilen TNF karaciğer hősrelerinde nekroza neden olmaktadır. Aynı zamanda galaktozaminin letal hepatotoksik etkisini arttırmaktadır (123). Akut ve kronik alkolik hepatit, akut ve kronik viral hepatit, akut fulminant hepatit gibi durumlarda plazma TNF-alfa dőzeylerinin yőseldięi çeşitli çalışmalarla gőssterilmiřtir(124,125). Hasta monosit kősksrleri ile yapılan çalışmalarda alkolik ve viral hepatitlerde monositlerde bulunan TNF-R sayısının arttığı gőskslmősksr. Reseptör sayısının artması plazma TNF-alfa konsantrasyonunun artması ile orantılı olarak seyretmektedir(123,24).

## 5. İNTERLÖKİN-6

İnterlökin-6 (IL-6) molekül ağırlığı 21,5—28 kDa arasındadır. Çeşitli biyolojik etkileri olan immun sistem medyatörlerindedir. B hücre uyarıcı faktör, hibridoma büyüme faktörü, hepatosit uyarıcı faktör, T lenfosit için sitolitik farklılaşma faktörü olarak da bilinir (22,111). IL-6; mononükleer hücreler, lenfositler, fibroblastlar ve hepatositlerde İnterlökin -1, interferon, İnterlökin-2 ve TNF-alfa'nin uyarıcı etkisi ile salınır.. Geni 7. Kromozomda bulunur. Akut faz reaktanların en önemli indükleyicisi olup pireksi yapar. En önemli biyolojik etkilerinden birisi B lenfosit maturasyonunun son kademelerini uyarmasıdır. B lenfositleri plazma hücrelerine dönüşür ve immünglobulin salgılanır. T hücre aktivasyonu, büyümesi ve differansiasyonuna neden olur. IL-6, TNF ve IL-1'in yaptığı kaşeksiyi artırmaktadır. Nötrofilleri aktive edilir ve diğer sitokinlerle sinerjik etki göstererek kemik iliği stem hücresinin maturasyonunu destekler. Hepatosit sitümüle eden faktör olarak da bilinen IL-6, CRP, fibrinojen, C3 gibi akut faz proteinlerinin sentezini sağlar. Sepsis, otoimmun hastalıklar, lenfoma, AIDS, alkolik karaciğer hastalığı, organ ve graft rejeksiyonları ile çeşitli infeksiyon hastalıklarında serum IL-6 seviyeleri artmaktadır.

## 6. MATERYAL VE METOD

Ekim 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında Turgut Özal Tıp Merkezi Gastroenteroloji ve Hepatoloji kliniğine başvuran karaciğer sirozu ve asitli hastalar etyoloji ayırt edilmeksizin çalışmaya dahil edildi. Sirozlar, karaciğer biyopsisi yapılarak histolojik kriterlerle ya da klinik biyokimyasal ve görüntülemenin kombinasyonu ile tanımlandı. 2004 AASLD uygulama rehberine göre(21), diagnostik parasetez, hastanedeki asitli kabul edilen hastalara ve enfeksiyonu akla getiren belirti, semptom ya da laboratuvar anormallik gösteren hastalara (örneğin: abdominal ağrı/rahatsızlık, ateş, ensefalopati, böbrek yetmezliği, asidoz ya da lökositoz) ve karaciğer transplantasyonu için değerlendirilip hastanede takip edilen hastalara uygulandı. SBP cerrahi olarak tedavi edilebilir aşikar bir enfeksiyon kaynağı olmayanlarda, asit sıvısında bakteri üremesi olan ve asitik sıvı nötrofil sayımı 250/ ml üstü, asit lökosit sayısı 500/ml ve üstü olarak tanımlandı. Sekonder peritonit, akut pankreatit, peritoneal karsinomatozis ya da eşlik eden sekonder malignitesi olan hastalar ve bakteriyel kültürü asitik sıvıdan alınmayan hastalar çıkarıldı. Çalışmamızda 82 hastada SBP mevcutken, 89 hastada ise SBP yoktu. Tüm hastalar bilgilendirilmiş onam alındı.

Hastalar prospektif olarak karakterize edildi. Cinsiyet, yaş, siroz etyolojisi, Child-Pugh sınıflaması (1) ve MELD skoru (23) temel alındı.

### 6.1.Klinik Örneklerin Toplanması

Total asit sıvı sayımı 2.7 ml EDTA'lı numunelerde otomatize kan hücre sayımı kullanılarak tanımlandı. Asit sıvılarındaki protein ve albumin konsantrasyonu rutin laboratuvar analizleri ile tanımlandı. Bakteri kültürü için, aerobik ve anaerobik kültürü şişelerine 10'ar ml, yatak başında alındı. Asit sıvısında bakteriyel translokasyon ürünleri tespiti için 5 ml asit sıvısı sterilite koşullarına dikkat edilerek alındı. NOD2 gen analizi için, venöz tam kan 9 ml EDTA içeren numunelere alındı. Elisa kitlerinin çalışılması için alınan kan 3500rpm'de 10 dk santrifüje edildi. Oluşan süpernatant 1.5 ml'lik numuneler şeklinde ependev tüplere aktarılıp çalışma gününe kadar -70 °C'de derin dondurucuda saklandı. Total bilirubin, kreatinin, sodyum ve albuminin serum seviyeleri, beyaz kan hücresi sayımı ve INR rutin laboratuvar analizleri ile belirlendi.

## **6.2.Moleküler Yöntemler**

### **6.2.1.Örneklerde Bakteriyel DNA'nın Tespiti**

#### **6.2.1.1.DNA izolasyonu:**

Tüm örnekler çalışılncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Örneklerden DNA izolasyonu için otomatik nükleik asit izolasyon cihazı üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı(QIASymphony, Qiagen, Hilden, Germany).

#### **6.2.1.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile 16S rRNA'nın Çoğaltılması:**

Birçok çalışmada kullanılan broad-range primerler ile (127,128) (p8FPL 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve p806R 5'GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') 16SrRNA gen bölgesi çoğaltıldı. Elli mikrolitrelik amplifikasyon karışımına; 25 µl OneTaq 2X Master Mix (New England Biolabs,Ipswich, MA),her bir primerden 2 µl (10 pmol/µl) ve 5µl ekstraksiyon ürünü eklenerek termal döngü cihazında (Sensoquest Labcycler, Hannah, Germany) amplifikasyon yapıldı. Amplifikasyon koşulları; 94°C'de 30 saniyelik ilk denatürasyonun ardından, 30 siklus olarak 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma ve 68°C'de 1 dakika uzama olarak uygulandı.

## **6.3. Real-Time PCR ile NOD2 Gen Mutasyonlarının Tespiti**

Örneklerden NOD2 gen varyasyonlarının tespiti için Appenrodt ve arkadaşlarının(94) geliştirdikleri Real-Time PCR yöntemi, küçük modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Bu yöntem ile en sık görülen NOD2 varyantlarından p.R702W, p.G908R ve c.3020insC araştırıldı. Bu amaçla kullanılan primer/probların(tablo1) NOD2 geni üzerindeki pozisyonları ve hedefledikleri mutasyon bölgeleri şekil 2-4'de verilmiştir.Real-Time PCR reaksiyonu için QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı.Reaksiyona her bir primerden 0.4 µM ve problardan 0.2 µM eklendi. Rotor-Gene QReal-Time PCR cihazında (Qiagen, Hilden, Germany) amplikasyon koşulları; 95°C'de 15 dakika ilk denatürasyonun ardından, 40 siklus olarak 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma (floresans ölçümü) olarak

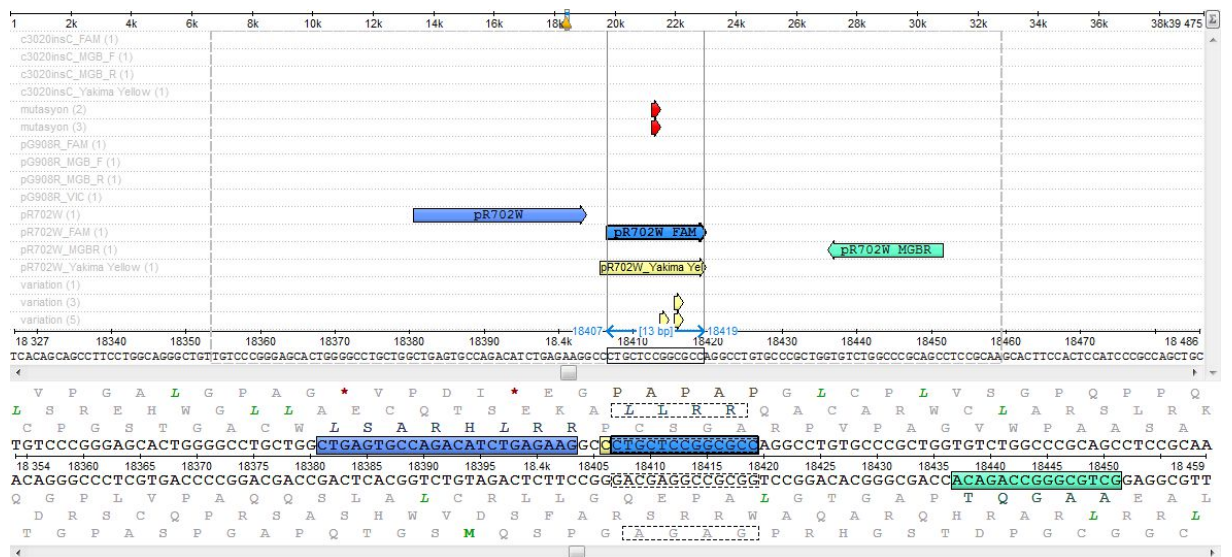
iki basamak olarak uygulandı.NOD2 varyantlarının saptandığı örneklerde, DNA dizi analizi yapılarak mutasyonlar doğrulandı.

#### 6.4.Baz dizi analizi

Mutasyon bölgelerini hedefleyen primerler ile amplifikasyon sonucu oluşan ürünler, jelden DNA saflaştırma kiti ile baz dizi analizine hazırlandı. BigDye terminator 3.1 (Applied Biosystems) kiti ve ABI PRISIM 310 (Applied Biosystems) otomatik baz dizi analizi cihazı kullanılarak, PZR ile çoğaltılan gen bölgelerinin dizi analizi yapılarak mutasyonlar doğrulandı.

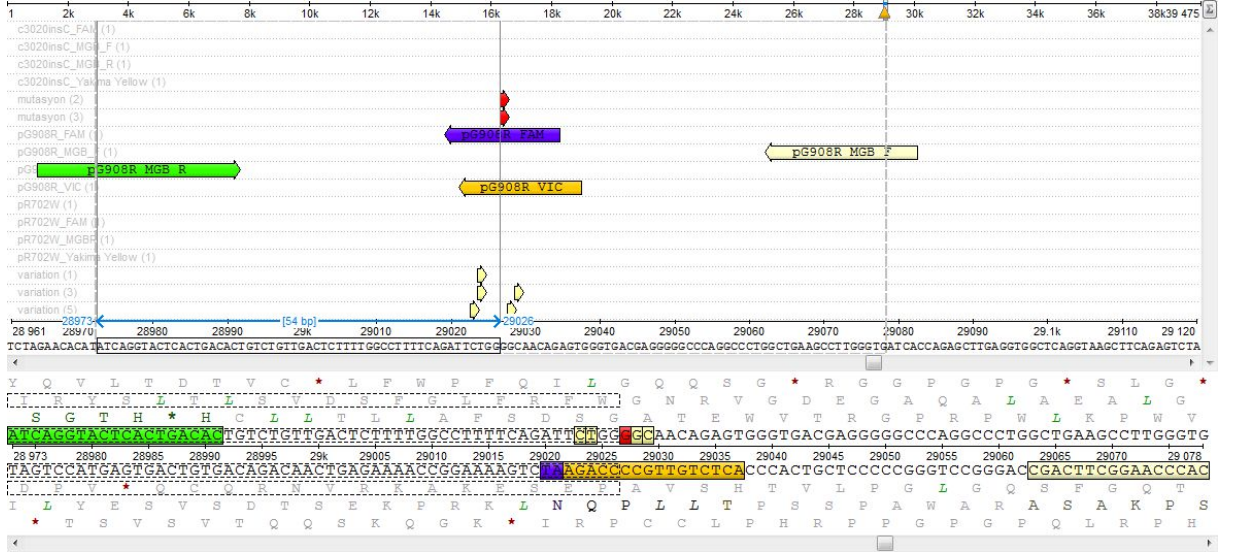
**Tablo 1.** Mutasyon tespiti için kullanılan primer ve probalar

Mutasyon	Primerler	Problar
<i>p.R702W</i>	MGB_F 5'- CTGAGTGCCAGACATCTGAGAAG-3' MGB_R 5'-GCTGCGGGCCAGACA-3'	VIC-CCTGCTCTGGCGCC Yakima Yellow-CTGCTCCGGCGCC
<i>p.G908R</i>	MGB_F 5'-TGATCACCCAAGGCTTCAGC-3' MGB_R 5'- GAACACATATCAGGTACTCACTGACAC-3'	VIC-ACTCTGTTGCGCCAGA Yakima Yellow- CTGTTGCCCCAGAAT
<i>c.3020insC</i>	MGB_F CCAGGTTGTCCAATAACTGCATC; MGB_RCCTTACCAGACTTCCAGGATGGT	VICT-GCAGGCCCTTG Yakima Yellow-CTGCAGGCCCTTG

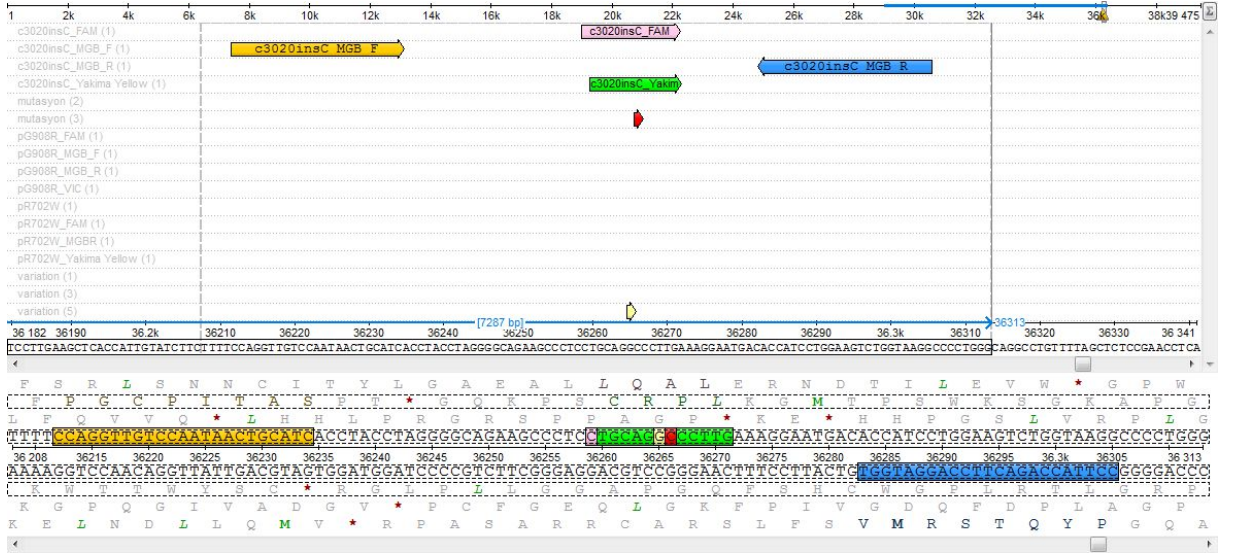




Şekil 2. p.R.702W Gen Mutasyonu



Şekil 3. p.G908R Mutasyonu



Şekil 4. c.3020insC Mutasyonu

## 6.5. Elisa Kitlerinin Çalışılması

LPB düzeyleri (Hangzhou Cat. No.: CK-E10799 and CK-E10110; Hangzhou Eastbiopharm Co. Ltd.) sensitivitesi 0.12 ng/ml normal aralığı 0.2–60 ng/ml ELISA kiti ile, IL-6 düzeyleri (Catalog Number EK0410, Boster Immunoleader, Wuhan,

China) sensitivitesi <0.3 pg/ml, normal aralığı 4.69–300 pg/ml ELISA kiti , TNF-R düzeyleri (Bender Medsystems GmbH , Campus Vienna Biocenter 2, 1030 Vienna Austria) sensitivitesi 0.05 ng/ml , normal aralığı 0.08–2.5 ng/ml ELISA kiti ile çalışıldı.

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

### **6.6. İstatistik**

Yapılan istatistiksel değerlendirmede kolmogorov-simironov testi kullanılmış olup verilerin normal dağılıma uygun olmadığı görüldü(p>0.05). Grupların karşılaştırılmasında Fisher's Exact test, Ki-kare testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

## 7. BULGULAR

Çalışmaya SBP'si olan 82 hasta ve SBP'si olmayan 89 hasta dahil edildi. Hastalarımız etyolojik açıdan değerlendirildi; 78 hasta (%45.1) HBV, 41 hasta (%23.7) kriptojenik, 25 hasta (%14.5) HCV, 10 hasta (%5.8) alkolik, 6 hasta (%3.5) Budd-Chiari sendromu, 4 hasta (%2.3) otoimmün hepatit, 2 hasta Wilson(%1.2), kalan 5 hasta ise (%3) diğer olduğu görüldü.

Yaptığımız çalışmada SBP'si olan 82 hastada NOD2 gen mutasyonlarından 4 hastada (%4.9) p.G908R saptanmış olup, c.3020insC ve p.R702W gen mutasyonlarına rastlanmamıştır. SBP'si olmayan 89 hastada ise NOD2 mutasyonuna rastlanmamıştır. SBP olan hastalar ile SBP olmayan hastalar arasında NOD2 gen aleli sıklığı açısından anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 1).

**Tablo 2:** NOD2 Gen Aleli ve SBP arasındaki ilişki

SBP	NOD2			P
	Mutasyon yok	p.G908R	Total	
YOK	89 (%100)	0 (%0)	89 (%100)	0.051
VAR	78 (%95.1)	4 (%4.9)	82 (%100)	

NOD2 gen varyant sıklığı ile asit sıvısında bakteriyal DNA, varis kanaması öyküsü ve SBP atak öyküsü arasındaki ilişki değerlendirilmiş olup sonuçları sırasıyla Tablo2 ve Tablo 3'de gösterilmiştir. Yapılan analizde NOD2 gen varyant sıklığı ile asit sıvısında bakteriyal DNA pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanırken ( $p=0.021$ ), daha önce geçirilmiş varis kanama ve SBP atak öyküsü açısından anlamlı ilişki saptanmadı (her ikisi de  $p>0.05$ ).

**Tablo 3.** NOD 2 Gen varyant sıklıkları ile asit sıvısında bakteriyel DNA sıklığı arasındaki ilişki.

NOD2 GEN	ASİT SIVISINDA BAKTERİYEL DNA			
	Yok	Var	Total	p
Mut. Yok	158 (%94.6)	9 (%5.4)	167 (%100)	0.021
p.G908 R	2 (%50)	2 (%50)	4 (%100)	

**Tablo 4.** NOD 2 Gen varyant sıklıkları daha önce geçirilmiş varis kanama ve SBP atak öyküsü arasındaki ilişki.

NOD2 GEN	VARİS KANAMASI ÖYKÜSÜ				SBP ATAK ÖYKÜSÜ			
	Yok	Var	Total	p	Yok	Var	Total	p
Mut. Yok	140 (%83.8)	27 (%16.2)	167 (%100)	0.134	115 (%68.9)	52 (%31.1)	167 (%100)	0.098
p.G908R	2 (%50)	2 (%50)	4 (%100)		1 (%25)	3 (%75)	4 (%100)	

NOD2 gen varyant sıklığı ile Child ve MELD skorları ve serumda IL-6,LBP ve TNF-R düzeyleri arasındaki ilişki Tablo 4’de gösterilmiştir. Yapılan analizde NOD2 gen varyant sıklığı ile bu parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı (hepsi  $p>0.05$ ).

**Tablo 5.** NOD 2 Gen varyant sıklıkları ile CHİLD,MELD,IL-6,LBP ve TNFR arasındaki ilişki.

	NOD2 GEN		p
	MUTASYON YOK (n=167)	p.G908R (n=4)	
CHİLD	11 (6-15)	13 .5 (9-15)	0.132
MELD	19 (7-44)	29.5(15-40)	0.066
IL-6 (4.69-300 pg/ml)	35.3 (12.6-3000)	54.85(80.6-30)	0.498
LBP (0.2–60 ng/ml)	6.9 (0-54.51)	5.46 (1.53-14.56)	0.627
TNF-R (0.08–2.5 ng/ml)	1.70 (0.30-31.5)	2.50 (1.80- 9.70)	0.164

NOD2 gen varyant sıklığı ile parasentez mayi kültürü arasındaki ilişki tablo 5’de gösterilmiştir. Yapılan analizde NOD2 gen varyant sıklığı ile asit kültürü pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptandı ( $p=0.021$ ). Çalışmamızda 11 hastada asit kültür pozitifliği saptanmış olup bu hastaların 4’ünde *E.coli* (%36.36) , 1 tanesinde *Enterobacter* (%9.09), 1 tanesinde *Acinetobacter*(%9.09), 2’sinde *Streptococ spp.* (%18.18), 2’sinde *MRSA* (18.18),1 tanesinde ise *Candida spp.*(%9.09) üremiştir.

**Tablo 6.** NOD 2 Gen varyant sıklığı ile asit kültür pozitifliği arasındaki ilişki

ASİT KÜLTÜR	NOD2 GEN			p
	Mutasyon Yok	p.G908R	Total	
Üreme Var	9 (%81.8)	2 (%18.2)	11 (%100)	0.021
Üreme Yok	158 (%98.8)	2 (%1.2)	160 (%100)	

SBP varlığı ile Child, MELD, IL-6, TNF-R ve LBP arasındaki ilişki Tablo 6'de gösterilmiştir. Yapılan karşılaştırmada SBP varlığına göre Child ve MELD skorları ve serum TNF-R düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmazken serum IL-6 ve LBP düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptandı (her ikisi de  $p<0.01$ ).

**Tablo 7.** SBP varlığı ile Child, MELD skorları ve serum IL-6, TNF-R ve LBP düzeyleri arasındaki ilişki.

	SBP		P
	Yok	Var	
CHILD	11 (7-15)	11 (6-15)	0.383
MELD	18 (9-39)	20 (4-44)	0.151
IL-6 (4.69-300 pg/ml)	30.0 (12.6-2217.2)	37.4 (16.9-3000)	0.005
TNFR (0.08-2.5ng/ml)	1.5 (0.4-9.7)	1.9 (0.3-31.5)	0.063
LBP (0.2-60 ng/ml)	8.74(0.0-37.83)	5.53 (0.07-54.51)	0.002

SBP varlığı ile asit sıvısında bakteriyel DNA varlığı ve daha önce geçirilmiş SBP ve varis kanaması öyküsü arasındaki ilişki Tablo 7 ve 8'de gösterilmiştir. Yapılan analizde SBP varlığı ile asit sıvısında bakteriyel DNA sıklığı arasında anlamlı ilişki

saptandı(p=0.027). SBP varlığı ile daha önce geçirilmiş SBP atak öyküsü arasında anlamlı ilişki saptanırken (p<0.001), varis kanama öyküsü açısından anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0.05).

**Tablo 8.** SBP varlığı ile asit sıvısında bakteriyel DNA varlığı arasındaki ilişki

SBP	ASİT SIVISINDA BAKTERİYEL DNA			
	Yok	Var	Total	p
Yok	87 (%97.8)	2 (%2.2)	89 (%100)	0.027
Var	73 (%89)	9 (%11)	82 (%100)	

**Tablo 9.** SBP varlığı ile daha önce geçirilmiş SBP ve varis kanama öyküsü arasındaki ilişki.

SBP	SBP ATAK ÖYKÜSÜ				VARİS KANAMA ÖYKÜSÜ			
	Yok	Var	Total	p	Yok	Var	Total	p
Yok	85 (%95.5)	4 (%4.5)	89 (%100)	<0.001	72 (%80.9)	17 (%19.1)	89 (%100)	0.542
Var	31 (%37.8)	51 (%62.2)	82 (%100)		70 (%85.4)	12 (%14.6)	82 (%100)	

## 8. TARTIŞMA

Çalışmamızda SBP olan ve olmayan hastalar arasında NOD2 gen aleli açısından anlamlı ilişki saptanmadı( $p=0.051$ ). Yapılan analizde NOD2 gen varyant sıklığı ile asit kültürü pozitifliği ve asit sıvısında bakteriyel DNA sıklığı arasında anlamlı ilişki saptandı(her ikisi de  $p=0.021$ ).

NOD2 geni bakteriyel hücre duvarı komponenti MDP'yi tanıyan ve konak defansının doğal yolunu aktifleyen sitozolik bir protein kodlar(116). NOD2 eksik farelerde bozulmuş epitelyal konak defansı, artmış bakteri yükü ve mukozal inflamasyondan dolayı Paneth hücrelerinin ve enterositlerin MDP'e yanıtı körelmiştir(106). Appendrodt ve arkadaşları yaptıkları prospektif ve kombine retro-prospektif analizlerinden sonra, NOD2 varyantı taşıyan sirozlu ve asitli hastalarda nötroitik asit riskinin 3 kat arttığını raporladılar(94). Ancak bu çalışma modeli poliklinikteki sirozlu SBP hastalarının kaydedilmemesi, tanı almaması ve asemptomatik süreçte olmasından dolayı yanılmaya müsaitti(113). Biz çalışmamızda prospektif olarak hastanede yatarken diagnostik parasentez yapılmış, karaciğer transplantasyonu nedeniyle operasyon hazırlığı yapılan ve hastanede kalışında SBP'den dolayı izlenmiş hastaları dahil ettik. Bruns ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 32 hastada (%18.3) NOD2'nin tekil nükleotid polimorfizmi tespit edildi (116). Kültür negatif non-nötroitik asitli deneklerde p.R720W, p.G908R ve L1007fs allel sıklığı sırasıyla, %3.2, %2.5, %2.5 iken SBP (n=29) olan hastalarda bu oranlar sırasıyla %3.4 ( $p=0.926$ ), %6.9 ( $p=0.081$ ) ve %8.6( $p=0.031$ ) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 10 hasta kültür pozitif SBP, 19 hasta kültür negatif SBP ve 6 hasta bakterisit olarak belirtilmişti. SBP hastaları [odds ratio(OR):2,7 ;  $P=0.036$ ], kültür pozitif SBP hastaları [odds ratio(OR):6.0 ;  $P=0.012$ ] ve bakterisitliler [odds ratio(OR):6.0 ;  $P=0.050$ ], steril nonnötroitik asitlilere göre daha fazla NOD2 varyasyonu taşıyıcılarıydı. 1007fs ve G908R mutasyonları, kültür pozitif SBP ile ( $p\leq 0.005$ ) ve R702W mutasyonları bakterisit ( $p= 0.014$ ) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Burns ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada kültür negatif SBP'liler ile NOD2 varyasyonu arasında anlamlı bir ilişki yoktu(OR 1.6;  $P = 0.493$ )(116). Bizim çalışmada SBP'si olan 82 hastada NOD2 gen mutasyonlarından p.G908R 4 hastada (%4.9) saptanmış olup, c.3020insC ve p.R702W gen mutasyonlarına rastlanmamıştır. SBP'si olmayan 89 hastada ise NOD2 aleline rastlanmamıştır. Bruns ve arkadaşları bu çift merkezli prospektif çalışmalarında,



sirozlularda, NOD2 geninin yaygın risk varyantı ile kültür pozitif SBP ve monomikrobiyal bakterasitliler arasında bağımsız bir ilişki bulunduğunu bildirdi. SBP'de pozitif asit kültürünün prognostik önem taşıdığına dair kanıtlar mevcuttur. Pozitif asidik bakteriyel kültür, NOD2 varyantlı deneklerde [8/32 (25.0%)], wild tip'li [8/143 (5.6%)] (p = 0.002) deneklere kıyasla daha fazla olarak saptanmış olup NOD2 mutasyonlu hastalarda tanımlanan mikroorganizmalar, E.coli (n= 2), Klebsiella oxytoca, Enterococcus faecium, Staphylococcus spp. (n= 2), Micrococcus spp. and Lactococcus lactis. idi (116). Bizim yaptığımız çalışmada da bu çalışmaya benzer bir şekilde NOD2 gen varyant sıklığı ile kültür pozitif SBP arasında anlamlı ilişki saptandı(p=0.021). Asit kültürü pozitif bulunan hastaların %18.2 sinde p.G908R mutasyonu bulunurken, asit kültür negatif hastalarda bu mutasyonun saptanma oranı sadece %1.2 idi. Bizim yaptığımız çalışmada asit kültür pozitifliği 11 hastada saptanmış olup bu hastaların 4'ünde E.coli (%36.36), 1 tanesinde Enterobacter(%9.09), 1 tanesinde Acinetobacter(%9.09), 2'sinde Streptococ spp(%18.18), 2'sinde MRSA (18.18),1 tanesinde ise Candida spp.(%9.09) üredi.

NOD2 gen varyasyonunun birkaç mekanizma ile bakteriyel translokasyonu desteklediğini gösteren kanıtlar mevcuttur(106). Yapılan genetik çalışmalar NOD2 varyant taşıyıcılarının lokal immün sisteminin barsaklardaki BT'u sınırlamada aciz olabileceğini göstermiştir. NOD2; bağırsak epitelyal ve mononükleer hücrelerde hücre içi bir pattern recognition receptor (model tanıma reseptörü) olarak ifade edilir ve bakteriyel hücre duvarı potansiyel bileşeni olan MDP'yi algılayarak proinflamatuvar NF-KB pathway (sinyal yolunu) aktiveleştirir (13,114). NOD2 eksik farelerde bozulmuş epitelyal konak defansı, artmış bakteri yükü ve mukozal inflamasyondan dolayı Paneth hücrelerinin ve enterositlerin MDP'e yanıtı körelmiştir (106). NOD2 1007fs varyasyonu homozigot olan farelerin MDP'e maruz kaldıklarında, intestinal bütünlüğü bozan bakterinin indüklediği intestinal inflamasyondan dolayı artmış NF-KB aktivasyonu gösterdikleri belirlenmiştir (107). Ayrıca NOD2 varyantlı hastalarda bozulmuş monosit/makrofaj cevabının yanında(114) NOD2 değişikliğinin inflamatuvar stimuluslara nötrofil aktivasyonu ve migrasyonu bozduğuna dair bazı kanıtlar mevcuttur(115). Bu nedenle NOD2 varyasyonu mevcut olan hastalarda, nötrofil migrasyonu ve asit sıvısının mikroorganizmalardan temizlenmesi bozulmuş olabilir(116). Geçen 10 yılda PCR bazlı bakteriyel DNA tespitinin gelişmesiyle BT'nin

tespitinde iyi bir markır olabileceği düşünöldü, çünkü sirozu olup da költürü (-) olan hastaların yaklaşık üçte birinde kanda bakteriyal DNA tespit edilebildi(91,92). Buna benzer sonuçlar insan çalışmalarda da elde edilmiştir(52). Deneysel olarak siroz ve asit oluşturulmuş hayvan modellerinde MLN költür pozitif yada negatif olsa da asit sıvılarında bakteriyel DNA tespit edilmesi, MLN'da bakteriyel translokasyon ürünlerinin varlığı ile eş zamanlılık gösterir (93). Bu veriler ileri sirozlu hastaların biyolojik sıvılarında bakteriyal DNA tespitinin BT'nin tanısında geçerlidir ve bakteriyal DNA'nın BT tanısında markır olabileceği hipotezini desteklemektedir. Fakat bakteriyal ürünün tespit edilmesi bakterinin canlılığını koruyup korumadığını belirtmez ama bununla birlikte bunların varlığının klinik sonuçları canlı bakteri varlığı ile karşılaştırıldığında farklılık olabilir.(94,95,96). Bizim yaptığımız çalışmada SBP olan ve olmayan hastalarda asit sıvısında bakteriyal DNA taradık. NOD2 gen aleli olan hastalarda asit sıvısında bakteriyel DNA [2/4(%50)] sıklığı NOD2 gen aleli olmayan hastalara göre [9/158(%5.4)] istiksel olarak anlamlı farklı saptandı(p=0.021). Ayrıca SBP olan hastalarda asit sıvısında bakteriyel DNA [9/73(%11)] sıklığı SBP olmayan hastalara [2/87(%2.2)] göre istiksel olarak anlamlı şekilde farklı saptandı(p=0.027). Geçirilmiş SBP atağı yeni SBP atağı riskini artırmakta olup istiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.001). SBP varlığı ile varis kanaması öyküsü arasında anlamlı fark yoktu (p=0.542). NOD2 gen aleli varlığı ile varis kanaması(p=0.134) ve SBP atak öyküsü(p=0.098) arasında anlamlı fark saptanmadı. Bu konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda daha önce geçirilen bir SBP epizodu yeni SBP atağı riskini artırdığı görölmüş olup yine aynı çalışmada varis kanaması ile SBP arasında anlamlı fark saptanmamıştır(116).

Çalışmamızda SBP olan ve SBP olmayan hastaların Child, MELD, IL-6, LBP ve TNF-R değerleri kaydedilerek karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede her iki grup arasında Child (p=0.383), MELD(0.151) ve TNF-R(p=0.063) açısından anlamlı fark saptanmazken IL-6(p=0.005)ve LPB(p=0.002) arasında anlamlı fark saptandı. Yine NOD2 gen varyantı olan hastalar ile olmayan hastalar Child, MELD, IL-6, LBP ve TNF-R değerleri istatistiksel olarak değerlendirildi ve NOD2 gen varyantı ile Child, MELD, IL-6, LBP ve TNF-R arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bruns ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yüksek MELD skoru SBP ile ilişkili bulunmuş olup SBP ile Child skorlaması arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Yine Apprendot ve

arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek MELD ( $p=0.029$ ) skoru ile SBP gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur(94).

Karaciğerden bakteriyemi veya endotoksemi halinde sentezlenerek salınan ve rölatif olarak uzun yarılanma ömrüne sahip LPB ölçümü BT'ü gösteren bir marker olarak önerilmiştir. Hastalarda yükselmiş LPB düzeyleri hastanın proinflamatuvar durumda olduğunu ve hemodinamisinin bozulmuş olduğunu göstermekte ve norfloksasin ile barsaktaki kontaminasyon düzeltildiğinde LPB düzeyleri normale gelmektedir (87). LPS-LPB Gram (-) sepsis patogenezinde konsantrasyon bağımlı ikili bir role sahiptir: LBP'nin düşük konsantrasyonları LPS ile indüklenen mononükleer hücreleri geliştirir, oysaki LPS konsantrasyonundaki akut faz artışı LPS ile indüklenen hücresel uyarıyı inhibe eder. Gutschmann ve arkadaşları yaptıkları çalışmada LBP'nin serumdan bağımsız koşullar altında bile mononükleer hücrelerdeki LPS ile indüklenen sitokinlerde artışa aracılık ettiğini raporladılar. Bu LPS'nin nötralizasyonu ile sonuçlanır, bundan dolayı mononükleer hücre kaynaklı TNF azalması ile sonuçlanır. Gutschmann ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile LBP'nin sadece serumda çözünür bir protein olarak bulunmadığını aynı zamanda mononükleer hücrelerin sitoplazmik membranında bulunan bir transmembran proteini olarak bulunduğunu ve membran ile ilişkili LBP'nin LPS ile etkileşiminin mononükleer hücre aktivasyonu aracılığıyla LBP'de önemli bir basamak olabileceğini oysa serumdaki LBP-LPS kompleksinin LPS nötralizasyonuna yol açabileceğini önermektedir(8). Enterasan olarak siroz ve asiti olup enfeksiyonu olmayan hastalarda yapılan prospektif bir çalışmada LPB düzeyi artmış olan hastalarda bakteriyel enfeksiyon gelişme riskinin normal LPB düzeyleri olan hastalara göre 4 kat arttığını göstermiştir (88). Buna karşın LPB yalnızca Gram (-) bakteriyel translokasyonu yansıtmakta, Gram (+) translokasyona karşı gösterge olmamakta, bu da yöntemin en önemli eksikliğidir(89). Gr(+) bakterilerin hücre duvarını oluşturan şeker ve aminoasit içeren bir polimer olan serum peptidoglikan varlığı BT de bir markır olarak hemorajik şok modeli olan yalnızca bir deneysel çalışmada denenmiştir (90). Reiberger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ağır portal hipertansiyonu olan hastalarda BT ile LBP arasında anlamlı fark saptanmış olup  $p=0.002$  olarak bulunmuştur(105). Çalışmamızda SBP olan ve SBP olmayan hastalarda LBP düzeyleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı farklı

bulunmuştur(p=0.002). Bu sonuç BT belirteci olarak LBP kullanılabileceğini göstermekte ve literatürü desteklemektedir.

Çeşitli patolojik durumlarda artan TNF uyarılması ile TNF-R düzeyi yükselmektedir. Özellikle enfeksiyöz durumlardan meningokoksemi, enfeksiyöz purpura, septik şok, bakteriyel menenjit gibi durumlarda TNF düzeyi artmaktadır. TNF'nin yükselmesinde Gram (-) bakterilerden açığa çıkan endotoksinlerin rolü çok büyüktür(122). Kronik karaciğer hastalığının seyrinde görülen ve prognozu oldukça kötü yönde etkileyen SBP'nin yaklaşık %70'ini Gram(-) bakteriler oluşturmakta ve bunun yarıya yakınında da etken E.coli'dir. Erken teşhis edilmesi çoğu zaman zor olan SBP'de TNF ve IL düzeylerinin yükselmesi beklenen bir durumdur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TNF'nin karaciğer fonksiyonları, hepatositler ve kolestaz üzerine patolojik etkileri ortaya çıkarılmıştır. TNF etkisi ile serum albumin konsantrasyonu ve karaciğer ilaç metabolizması ile ilgili sitokrom p450 aktivitesi düşerken; CRP, fibrinojen gibi akut faz proteinleri, kompleman 3, hepatik lipojenezis artmaktadır. Farelere enjekte edilen TNF karaciğer hücrelerinde nekroza neden olmaktadır. Aynı zamanda galaktozaminin letal hepatotoksik etkisini artırmaktadır (123). Akut ve kronik alkolik hepatit, akut ve kronik viral hepatit, akut fulminant hepatit gibi durumlarda plazma TNF-alfa düzeylerinin yükseldiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir(124,125). Hasta monosit kültürleri ile yapılan çalışmalarda alkolik ve viral hepatitlerde monositlerde bulunan TNF-R sayısının arttığı görülmüştür. Reseptör sayısının artması plazma TNF-alfa konsantrasyonunun artması ile orantılı olarak seyrederek (123,24). IL-6 çeşitli biyolojik etkileri olan immun sistem medyatörlerindedir. B hücre uyarıcı faktör, hibridoma büyüme faktörü, hepatosit uyarıcı faktör, T lenfosit için sitolitik farklılaşma faktörü olarak da bilinir (22,111). IL-6; mononükleer hücreler, lenfositler, fibroblastlar ve hepatositlerde İnterlökin -1, interferon, İnterlökin-2 ve TNF-alfa'nin uyarıcı etkisi ile salınır. Akut faz reaktanların en önemli indükleyicisi olup pireksi yapar Hepatosit sitümüle eden faktör olarak da bilinen IL-6, CRP, fibrinojen, C3 gibi akut faz proteinlerinin sentezini sağlar. Sepsis, otoimmün hastalıklar, lenfoma, AIDS, alkolik karaciğer hastalığı, organ ve graft rejeksiyonları ile çeşitli infeksiyon hastalıklarında serum IL-6 seviyeleri artmaktadır. Reiberger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ağır portal hipertansiyonu olan hastalarda BT ile IL-6 arasında anlamlı fark saptanmış olup p=0.025 olarak bulunmuştur (105). Suliman ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada asitli sirotik SBP'li hastalarda serum TNF-alfa ve IL-6 düzeylerinin steril asiti olan hastalara göre daha yüksek olduğu sonucuna varmış olup TNF-alfa ve IL-6'nın SBP'nin patogenezinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir(31). Zeni ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; 14 alkolik sirozlu ve SBP'si olan hasta ile 16 alkolik sirozlu ve SBP'si olmayan hastada asit ve serumda IL-6 ve TNF-alfa düzeyleri bakılmış, TNF-alfa düzeyi plazma ve asit mayide SBP'li grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur( $p<0.001$ ). Aynı zamanda IL-6, SBP grubunda yüksek bulunmuştur. SBP'li hasta grubunda TNF-alfa ve IL-6 düzeyleri antibiyotik tedavisinden 48 saat sonra düşme eğilimine girmiştir. Bu çalışma ile TNF-alfa ve IL-6'nın SBP'nin tanısında ve tedavisinin monitorizasyonunda yararlı bir markır olarak kullanılabileceği bildirilmiştir(37). Rodriquez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, alkolik sirozlu ve SBP'si olan hastalar ve steril asitli hastalarda IL-1, IL-6, TNF-a ve anti inflamatuvar sitokinlerden IL-10 çalışılmıştır. IL-6 ve TNF-alfa değerlerindeki yükseklik SBP ile ilişkili bulunmuştur (53). Yıldırım ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada malign asitli, siroza bağlı steril asitli ve SBP'li hasta gruplarında asidik TNF-alfa düzeylerine bakılmıştır. Bu çalışmada malign asitli ve SBP'li grupta asidik TNF-alfa düzeyi steril asitli gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (28). Bizim yaptığımız çalışmada SBP olan hastalar ile SBP olmayan hastaların IL-6 ve TNF-R arasında ilişki olup olmadığını inceledik. SBP olan hastalar ile SBP olmayan hastaların IL-6 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p=0.005$ ). Bu sonuç IL-6'nın SBP'nin patogenezinde önemli rol oynadığını göstermekte olup literatür ile uyumludur. Bu da IL-6'nın SBP'nin tanısında yararlı bir markır olduğunu göstermektedir.

## 9. SONUÇ

1.Sonuç olarak bu çalışmada SBP olan ve olmayan hastalar arasında NOD2 gen aleli açısından anlamlı ilişki saptanmadı. Genetik mutasyonlarda etnik kökenlerin rol oynadığı düşünüldüğünde literatürdeki mevcut çalışmaların yapıldığı toplumlar ile bizim toplumumuzun farklılık gösterebileceği ve bizim toplumumuzun NOD2 gen mutasyonu frekansının değerlendirileceği daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğu ortaya çıkmaktadır.

2.Çalışmada elde ettiğimiz bulgular sirozlu hastalarda asit kültürü ve bakterial DNA pozitifliği ile NOD2 gen mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu düşündürmektedir.

3.Sirozlu hastalarda IL-6 düzeylerinin spontan bakteriyel peritonitli hastalarda anlamlı şekilde yüksek bulunması bu testin bakteriyel translokasyon için bir marker olabileceğini düşündürmektedir.

4.SBP olan ve SBP olmayan hastalarda LBP düzeyleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur. Bu sonuç BT belirteci olarak LBP ölçümünün kullanılabilceğini göstermekte ve literatürü desteklemektedir.

5.Bizim çalışmamızda SBP olan ve SBP olmayan hastalarda TNF-R düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı. Bu sonuç literatür ile uyumlu olmayıp bu konuyla ilgili olarak daha geniş ve çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, et al. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *International Ascites Club. J Hepatol* 2000; 32:142-153.
2. Conn HO. Spontaneous peritonitis and bacteremia in Laennec's cirrhosis caused by enteric organisms. A relatively common but rarely recognized syndrome. *Ann Intern Med* 1964;60:568-580.
3. Reuben A. Landmarks in hepatology. Au Contraire, professeur Pasteur *Hepatology* 2004;40:1478-1482.
4. Riordan SM, Williams R. The intestinal flora and bacterial infection in cirrhosis. *J Hepatol* 2006;45:744-757.
5. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792-796.
6. Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infection, sepsis and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008;28:26-42.
7. Liovet JM, Bartoli R, March F, et al. Translocated intestinal bacterial cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998;28(2):307-13.
8. Gutschmann T, Müller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells, *Infect Immun*. 2001 Nov;69(11):6942-50.
9. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 2000;182: 526-33.
10. Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 8:632-5.
11. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
12. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al.

- Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-1928.
13. Chamaillard M, Giardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003;5:581-592.
  14. Brenmoehl J, Herfarth H, Gluck T, Audebert F, Barlage S, Schmitz G, et al. Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med* 2007;33:1541-1548.
  15. Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:889-894.
  16. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003; 124:140-146.
  17. Gines P, Angeli P, Lenz K, et al. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 53: 397-417.
  18. Runyon BA. Monomicrobial nonneutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1990; 12(4 Pt 1):71 0-5.
  19. Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1984;4(6): 1209—11.
  20. Guarner C, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis and management. *Gastroenterologist* 1995;3(4) 311-28.
  21. Runyon BA. Management of adult patients with ascites caused by cirrhosis. *Hepatology* 1998;27(1 ):264-72.
  22. Hirano T, Akira S, Taga T, Kismmoto T. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol Today* 1990; 11:443-9.
  23. Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Baeterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993;17(6):1081-5.
  24. Jones A, Selby PJ, Viner, C, et al. Tumour necrosis factor, cholestatic jaundice, and chronic liver disease. *Gut* 1990;31.938-9.



25. Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients. *J Infect Dis* 1983; 147: 1011-7.
26. Mowat C, Stanley AJ. Review article: spontaneous bacterial peritonitis diagnosis, treatment and prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(12): 1851-9
27. Thanopoulou AC, Koskinas JS, Hadziyannis SJ. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP): clinical, laboratory, and prognostic features. A single-center experience. *Eur J Intern Med* 2002;13(3):194-198.
28. Yildirim B, Sari R, Isci N. Patients with spontaneous bacterial peritonitis, and malignant and cirrhotic ascites. *J Natl Med Assoc* 2005 Feb;97(2): 276-80.
29. Runyon BA, Hoefs JC. Ascitic fluid chemical analysis before, during and after spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1985;5(2):257-9.
30. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to Spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986;91(6):1343-6.
31. Suliman MAM, Khalil FMH, Alkindi SSA, Pathare AV, Almadhani AAA, Soliman NAAI, Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2012 October 15; 3(5): 92–98.
32. Runyon BA. Ascites and Spontaneous Bacterial Peritonitis. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, eds. *Gastrointestinal and Liver Disease*. 7 ed: Saunders, 2002: 1517.
33. Bernard B, Cadranet JF, et al. Prognostic significance of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients: a prospective study. *Gastroenterology* 1995;108(6):1828-34.
34. Soreli WR, Quigley EM, Jin G, Johnson TJ, Rikkers LF. Bacterial translocation in the portal-hypertensive rat: studies in basal conditions and on exposure to hemorrhagic shock. *Gastroenterology* 1993;104(6): 1722-6
35. Cadranet JF, Denis J, Pauwels A, et al. Prevalence and risk factors of bacteriuria in cirrhotic patients: a prospective case-control multicenter study in 244 patients. *J Hepatol* 1999;31 (3):464-8.
36. Runyon BA. Early events in spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 2004;53(6):782.

37. Zeni F, Tardy B, Vindimian M, et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the ascitic fluid of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1993 Aug;17(2): 218-23.
38. Almdal TP, Skinhoj P. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. Incidence, diagnosis, and prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1987;22(3):295-300.
39. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998;27(4):669- 74;quiz 675-6.
40. Kline MM, McCallum RW, Guth PH. The clinical value of ascitic fluid culture and leukocyte count studies in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1976;70(3):408-12.
41. Wilson JA, Suguitan EA, Cassidy Characteristics of ascitic fluid in the WA, Parker RH, Chan CH. alcoholic cirrhotic. *Dig Dis Sci* 1979;24(8):645-8.
42. Angeloni S, Nieolini G, et al. Validation of automated blood cell counter for the determination of polymorphonuclear cell count in the ascitic fluid of cirrhotic patients with or without spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98(8): 1844-8.
43. Castellote J, Lopez C, et al. Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. *Hepatology* 2003;37(4):893-6.
44. Wu SS, Lin OS, Chen YY, Hwang KL, Soon MS, Keeffe EB. Ascitic fluid carcinoembryonic antigen and alkaline phosphatase levels for the differentiation of primary from secondary bacterial peritonitis with intestinal perforation. *J Hepatol* 2001;34(2):215-21.
45. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988;8(1 ):27- 31.
46. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35: 140-8.
47. Borzio M, Salerno F, Piantoni L, et al. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001; 33:

41-8.

48. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, *et al.* Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010; 139: 1246-56.
49. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-11.
50. Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 397-425.
51. De ME, Martinez J, Lozano B, *et al.* Detection and identification of bacterial DNA in serum from patients with acute pancreatitis. *Gut* 2005; 54: 1293-7.
52. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, *et al.* Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 32-7.
53. Rodríguez-Ramos C, Galan F, *et al.* Expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci.* 2001 Aug; 46(8): 1668-76
54. Llovet JM, Bartoli R, March F, *et al.* Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998; 28: 307-13.
55. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995; 108: 1835-41.
56. Viggiano TR, Gostout CJ. Portal hypertensive intestinal vasculopathy: a review of the clinical, endoscopic, and histopathologic features. *Am J Gastroenterol* 1992;87(8):944-54.
57. Khoshini R, Dai SC, Lezcano S, Pimentel M. A systematic review of diagnostic tests for small intestinal bacterial overgrowth. *DigDis Sci* 2008; 53: 1443-54.
58. Vanderhoof JA, Young RJ. Etiology and pathogenesis of bacterial overgrowth. Clinical manifestations and diagnosis of bacterial overgrowth. Treatment of bacterial overgrowth. *Uptodate* 2012; 20: 7.
59. Steffen EK, Berg RD. Relationship between cecal population levels of

- indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect Immun* 1983; 39:1252-9.
60. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, *et al.* Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000; 31:43-8.
  61. Casafont MF, De las Heras CG, Martin RL, *et al.* Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *DigDis Sci* 1996; 41: 552-6.
  62. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 28: 1187-90.
  63. Bauer TM, Steinbruckner B, Brinkmann FE, *et al.* Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2962-7.
  64. Such J, Guardiola JV, de JJ, *et al.* Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 371-6.
  65. Astaldi G, Strosselli E. Peroral biopsy of the intestinal mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J DigDis* 1960; 5: 603-12.
  66. 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; 79: 707-15.
  67. Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 652-7.
  68. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver international* 2013;32-37
  69. Bertok L. Bile acids in physico-chemical host defence. *Pathophysiology* 2004; 11: 139-45.
  70. Clements WD, Parks R, Erwin P, *et al.* Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut* 1996; 39: 587-93.
  71. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R, *et al.* Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats.

- Hepatology* 2003; 37: 551-7.
72. Pascual S, Such J, Esteban A, *et al.* Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepato- gastroenterology* 2003; 50: 1482-6.
  73. Campillo B, Pernet P, Bories PN, *et al.* Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:755.9
  74. Ramachandran A, Prabhu R, Thomas S, *et al.* Intestinal mucosal alterations in experimental cirrhosis in the rat: role of oxygen free radicals. *Hepatology* 2002; 35: 622-9.
  75. Guarner C, Soriano G, Tomas A, *et al.* Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18:1139-43.
  76. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, *et al.* Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992; 103: 264-74.
  77. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, *et al.* Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996; 23: 781-7.
  78. Garcia-Gonzalez M, Boixeda D, Herrero D, Burgaleta C. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 105: 527-31.
  79. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986; 6: 252
  80. Such J, Guarner C, Enriquez J, *et al.* Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988; 6: 80-4.
  81. Rimola A, Soto R, Bory F, *et al.* Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984; 4: 53
  82. Inamura T, Miura S, Tsuzuki Y, *et al.* Alteration of intestinal intraepithelial lymphocytes and increased bacterial translocation in a murine model of cirrhosis. *Immunol Lett* 2003; 90: 3-11
  83. Unno N, Wang H, Menconi MJ, *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide

- synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 1246-57
84. Frances R, Chiva M, Sanchez E, *et al.* Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007; 46: 797-803.
  85. Opal SM. The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: a critical analysis. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 473-6.
  86. Stadlbauer V, Davies NA, Wright G, Jalan R. Endotoxin measures in patients' sample: how valid are the results? *J Hepatol* 2007; 47: 726-7.
  87. Albillos A, de la HA, Gonzalez M, *et al.* Increased lipo- polysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003; 37: 208-17.
  88. Albillos A, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Serum lipopoly- saccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004; 363: 1608-10.
  89. Gonzalez-Navajas JM, Bellot P, Frances R, *et al.* Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin. *J Hepatol* 2008; 48: 61-7.
  90. Shimizu T, Tani T, Endo Y, *et al.* Elevation of plasma pep- tidoglycan and peripheral blood neutrophil activation during hemorrhagic shock: plasma peptidoglycan reflects bacterial translocation and may affect neutrophil activation. *Crit Care Med* 2002; 30: 77-82.
  91. Such J, Frances R, Munoz C, *et al.* Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; 36: 135-41.
  92. Frances R, Benlloch S, Zapater P, *et al.* A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology* 2004; 39: 484-91.
  93. Guarner C, Gonzalez-Navajas JM, Sanchez E, *et al.* The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4- induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006; 44: 633-9.
  94. Appenrodt B, Grunhage F, Gentemann MG, *et al.* Nucleotide-binding

- oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 1327-33.
95. Serste T, Bert F, Leflon-Guibout V, *et al.* Detection of bacterial DNA in serum and ascitic fluid of asymptomatic outpatients with cirrhosis and non-neutrocytic ascites. *Liver Int* 2011; 31: 494-8.
  96. Bruns T, Sachse S, Straube E, *et al.* Identification of bacterial DNA in neutrocytic and non-neutrocytic cirrhotic ascites by means of a multiplex polymerase chain reaction. *Liver Int* 2009; 29: 1206-14.
  97. Riordan SM, Skinner N, Nagree A, *et al.* Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37: 1154-64.
  98. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 422-33.
  99. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-60.
  100. Frances R, Munoz C, Zapater P, *et al.* Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004; 53: 860-4.
  101. Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, *et al.* Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008; 47: 978-85.
  102. Wiest R, Cadelina G, Milstien S, *et al.* Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 2003; 38: 1508-15.
  103. Bellot P, Garcia-Pagan JC, Frances R, *et al.* Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2010; 52: 2044-52.
  104. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-6.

105. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer B, A, Mandorfer M, Heinisch B.M, Hayden H, Lammert F, Trauner M, Peck-Radosavljevic M, Vogelsang H, Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2013 vol. 58, 911–921
106. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006; 7: 1250-7.
107. Maeda S, Hsu L, Liu H, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 2005; 307: 734-8.
108. Kosovac K, Brenmoehl J, Holler E, et al. Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1311-2.
109. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1421-32.
110. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JPA. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2393-404.
111. Saito S, Kasahara T, Kato Y, et al. Elevation of amniotic fluid interleukin-6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Cytokine* 1993;5: 81-8.
112. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, et al. The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 2008; 35: 381-4.
113. Evans LT, Kim WR, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2003; 37: 897-901.
114. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. *J Biol Chem* 2003; 278: 5509-12.



115. Ekman A, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* 2010; 130: 55-63.
116. Bruns T, Peter J, Philipp A, Reuken P.A, Grabe D.H, Schuldes S.R, Julia Brenmoehl J, Scholmerich J, Reiner Wiest and Andreas Stallmach A, *NOD2* gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis, *Liver International* 2011 ; 1-11
117. Carswall EA, Old LS, Kassel RS, et al. An endotoxin-induced serum factor that Causes necrosis of tumors. *Proct Natl Acad Sci USA* 1975;72: 3666-70.
118. Aggorwal BB, Kolir WJ, Hass PE, et al. Human tumor necrosis factor: Production, purification and characterization. *J Biol Chem* 1985;260: 2345~54.
119. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, et al. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1994; 312: 724-9.
120. Khoruts A, Stalinke L, McClain CS, et al. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991;13.256—61
121. Ragoussis J, Bloemer K, Weiss EH, et al. Localisation of the genes for TNF and lymphotoxin between the HLA I and III regions by field inversion gel electrophoresis. *immunogenetics* 1988;27: 66-9.
122. Grunfuld C, Palaedino MA. Tumor necrosis factor: Immunologic, antitumor, metabolic and cardiovascular activates. *Adv Intem Med* 1990;35: 4,5-72.
123. Gresser I, Woodrow D, Moss J, et al. Toxic effects on TNF in suckling mice. *Am. J Pathol* 1987;138:4185-91.
124. Kbonitus A, Stalinke L, McClain. C, et al. Circulating TNF, IL-1 and IL-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991; 13.267 -7 6.
125. Lau J, Sheron N, Nouri-Aria K, et al. Increased TNF-a. receptor number in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1991; 14.44-50.
126. Nedospasov SA, Hirt B, Shakhov AN, et al. The genes for tumor necrosis factor and lymphotoxin are temdemly aranged on chromosome 17 of the Mouse *Nucleic Acids Res* 1986;14:7713-25.

127. Van Der Ploeg J. R., Giertsen E, Ludin B., Morgeli C., Zinkernagel A.S., Rudolf Gmür R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis*  $\epsilon$ mA genotypes in dental plaque. *Infection*. 2003 Mar;31(2):86-91
- 128.128.Zinkernagel A.S., Gmür R., Fenner L., Schaffner A., Schoedon G., Schneemann M. Marginal and Subgingival Plaque –A Natural Habitat of *Tropheryma whippelii*? *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Mar 12;232(1):31-7.