

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



KAS İÇİ ANALJEZİK UYGULAMASININ FARELERDE DERİN YUMUŞAK DOKU ENFEKSİYONU GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ

Proje No: TTU-2014-4900

TIPTA UZMANLIK TEZİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü
Doçent Dr. Hayati DEMİRASLAN

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Araştırmacı
Dr. Zeynep Türe

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamızın her aşamasında büyük desteğini esirgemeyen ve benimle tecrübelerini paylaşan, karşılıklı yoğun çalışma ile sonuca ulaştığımız değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Hayati DEMİRASLAN'a,

Tez çalışmamızın fikir aşamasından itibaren sonucuna kadar her aşamada beni destekleyen ve bana güvenen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet DOĞANAY' a,

Asistanlık süreci boyunca her konuda bana katkı sağlayan en başta bölüm başkanımız Prof. Dr Emine ALP MEŞE olmak üzere saygıdeğer hocalarıma,

Çalışmamızın patoloji kısmında yardımcı olan Prof. Dr Olgun KONTAŞ hocama ve ELİZA çalışması için yardımcı olan Doç. Dr Mehmet Fatih SÖNMEZ hocama, istatistik çalışması için yardımcı olan Yrd. Doç. Dr Ferhan ELMALI hocama,

Özellikle tez çalışması aşamasında her türlü fikir ve fiziksel desteğini esirgeyemeyen asistan arkadaşlarım Dr. Esmâ Eren, Dr Tuğba Tok, Dr Şerife Cingöz, Dr Kübra Yüce Atamulu, Emin Kaymak ve diğer asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmasını yürütmemde her türlü fiziksel olanakları sağlayan ve güler yüzlü çalışanları ile yardımlarını eksik etmeyen DEKAM yönetimi ve çalışanlarına,

Çalışmamın proje bölümünü destekleyen ERÜ BAP birimine,

Hayatımın her alanında sonsuz ve koşulsuz destekçim olan, benim için kendilerinden ödün veren ve her şeyden değerli olan annem Havize, babam Hüseyin ve biricik kardeşim Meryem TÜRE' ye sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Zeynep TÜRE
Aralık 2015, KAYSERİ

**TTU-2014-4900 Proje Kodlu ‘Kas İçi Analjezik
Uygulamasının Farelerde Derin Yumuşak Doku Enfeksiyonu
Gelişimindeki Rolü’ Başlıklı Tez alışması Erciyes
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından
desteklenmiştir. Sonsuz Teřekkürlerimi Sunarım.**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	3
İÇİNDEKİLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET.....	7
ABSTRACT	9
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	11
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. Deri Yumuşak Doku Enfeksiyonları	13
2.2. Nekrotizan Fasiit	14
2.2.1. Epidemiyoloji	14
2.2.2. Klinik sınıflandırma	15
2.2.3. Etken mikroorganizmalar	15
2.2.4. Patofizyoloji	17
2.2.5. Risk faktörleri.....	17
2.2.6. Klinik.....	18
2.2.7. Laboratuvar Bulguları	19
2.2.8. Tedavi.....	20
2.3. Grup A Streptokoklar	22
2.3.1 Biyokimyasal Reaksiyonları.....	22
2.3.2. Yapısı	22
2.3.3. Spesifik antijenleri.....	23
2.3.4. Salgıladıkları toksin ve enzimler.....	25
2.4. Akut Enflamasyon ve Enflamatuvar Mediyatörler.....	27
2.4.1 Akut enflamasyonda vasküler değişiklikler	28
2.4.2 Enflamasyonun kimyasal mediyatörleri ve düzenleyicileri.....	29
2.4.2.a. Hücrelerden kaynaklanan mediyatörler	29
2.4.2.b. Plazma proteininden kaynaklanan mediyatörler.....	33
2.5. Non Steroid Anti-Enflamatuvar İlaçlar	35
2.5.1. Etki Mekanizmaları	35

2.5.2. Sınıflandırılması	36
2.5.2.a. Diklofenak Sodyum	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1.Hastalar.....	38
3.2. Deneysel Çalışma	38
3.3. Deney Hayvanı	38
3.4. Bakteriyel Tür.....	38
3.5. Bakterinin Hazırlanması.....	38
3.6. İlaçlar.....	39
3.7. İn vitro çalışma (kill-time)	39
3.8. Enfeksiyon Dozunun (inokulum dozu) Belirlenmesi	39
3.9. Mikrobiyolojik Çalışma	41
3.10. Histolojik Çalışma.....	41
3.11. Sitokin Çalışması	42
3.12. İstatistiksel Değerlendirme	43
4. BULGULAR	44
4.1 Hastalar.....	44
4.2. İn Vitro Çalışma	48
4.2.1. İn vitro Çalışma (kill-time) Sonuçları	48
4.3 İn vivo Çalışma	50
4.3.1 Deneyin Yapılışı.....	50
5.TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	66
KAYNAKLAR.....	68

KAS İÇİ ANALJEZİK UYGULAMASININ FARELERDE DERİN YUMUŞAK DOKU ENFEKSİYONU GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ

ÖZET

Giriş ve Amaç: Uygun şartlarda yapılmayan kas içi enjeksiyonlar esnasında inoküle olan mikroorganizmalardan salınan uyarılar sonucu enflamatuvar süreç başlamaktadır. Enflamatuvar cevabı geciktiren etkenler derin yumuşak doku enfeksiyonu, apse veya sepsis gibi komplikasyonlara neden olmaktadır. Non steroid anti enflamatuvar (NSAE) ilaç enjeksiyonu sonrası bu tür komplikasyonlar görülebilmektedir. Bu çalışmanın amacı deneysel fare yumuşak doku enfeksiyonu modelinde kas içi NSAE enjeksiyonu ile derin yumuşak doku enfeksiyonu ve sepsis şiddetinde değişiklik olup olmadığını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada Balb-C dişi fareler kullanıldı. NSAE olarak diklofenak sodyum (DS) 20 mg/kg dozunda, bakteri olarak grup A streptokok (GAS) M3 suşu 10^6 kob/0.1 ml inokulum dozunda kullanıldı. İn vitro olarak DS'nin 0,4 ve 40mg/L konsantrasyonda bakteri üzerine etkisi olup olmadığı kill-time ile belirlendi.

Denekler, DS grubu, GAS grubu, DS sonrası GAS grubu (DS+GASM3), GAS sonrası DS grubu (GASM3+DS) ve kontrol grubu olmak üzere beş gruba ayrıldı. Çalışma sonunda gruplar arasında mikrobiyolojik olarak sepsis gelişimi, kas dokusundaki histopatolojik değişiklikler, kas dokularında gram başına bakteri yükü, serum TNF alfa ve interlökin-6 düzeyleri karşılaştırıldı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (karar no:13/127).

Bulgular: Yüksek konsantrasyonda (40 mg/L) DS, in vitro ortamda ikinci saatten sonra bakteri üremesini inhibe etti. DS ile birlikte GASM3 enjeksiyonu yapılan gruplarda sepsis gelişti. Bacakların histopatolojik incelemesinde en yüksek enflamasyon skoru GASM3+DS grubunda izlendi. DS+GASM3 grubunda da enflamasyon skoru DS, GASM3 ve negatif kontrol grubundan yüksekti. Ama bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Negatif kontrolle yapılan karşılaştırmada bütün gruplar istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek enflamasyon skoruna sahiptiler ($p=0,001$).

Mikrobiyolojik incelemede ise DS+GASM3 enjeksiyonu yapılan grupta kas dokusunda gram başına üreyen koloni sayısı GASM3 enjeksiyonu yapılan gruba göre daha az ($p=0,001$) olduğu saptandı.

Sitokin düzeylerinin değerlendirilmesinde serum TNF alfa düzeyi en yüksek olan grup negatif kontrol grubuydu. DS+GASM3 enjeksiyonu yapılan grupta serum TNF alfa ortalaması GASM3 enjeksiyonu yapılan gruptan daha yüksekti. Benzer şekilde DS+GASM3 enjeksiyonu yapılan grupta serum İL-6 ortalaması en yüksekti. Gruplar arasında serum sitokin düzeyleri ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Sonuç: Kas içi DS enjeksiyonu kas dokusunda daha fazla enflamasyon ve nekroza neden olmaktadır. Bakteri inokülasyonundan önce veya sonra DS verilmesi 96. saatte kas dokusundaki koloni sayısını azaltmakla birlikte bakterinin sistemik yayılımında ve sepsis gelişmesinde artışa neden olmaktadır. Bakteri enjeksiyonu öncesi DS uygulaması serum sitokin düzeyinde artışa neden olmaktadır.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir (proje No: TTU-2014-4900).

Anahtar kelimeler: Derin yumuşak doku enfeksiyonu; diklofenak; Streptococcus pyogenes; non steroid anti enflamatuvar ilaç; TNF alfa; interlökin 6

THE ROLE OF INTRAMUSCULAR ANALGESIC ADMINISTRATION IN THE DEVELOPMENT OF DEEP SOFT TISSUE INFECTIONS IN MICE

ABSTRACT

Introduction and Aim: Inflammatory process begins after the stimuli from microorganisms that were inoculated by intramuscular injections carried out unsuitable conditions. The factors which delay the inflammatory response cause complications such as deep soft tissue infections, abscess or sepsis. These kind of complications may be seen after the injection of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The aim of this study is investigating whether alteration of the severity of soft tissue infections and sepsis after intramuscular injection of NSAIDs in an experimental mouse model.

Material and Methods: Balb-C female mice were used in this study. Diclofenac sodium (DS) was used 20 mg/kg as NSAID, Group A streptococcus (GAS) subtype M3 was used as bacteria with the doses of 10^6 cfu /0.1 ml inoculum. The effect of DS concentration of 0.4 and 40mg/L on GAS was determined by in vitro kill time study. The subjects were divided into five groups which contain DS group, GAS group, GAS after the DS group (DS + GASM3), DS after GAS group (GASM3 + DS) and the control group.

Developing sepsis, histopathological changes in the muscle tissue, bacterial load per gram in the muscle tissue, the serum levels of TNF-alpha and interleukin-6 were compared between the all groups at the end of the study. The study was approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments of Erciyes University (Aproval No. 13/127).

Results: High concentration (40 mg / L) DS was inhibited the bacterial growth, two hours after the in vitro study. Sepsis was observed with GAS M3 and DS injected groups. GASM3+DS injected group had the highest inflammation score on histopathological

examination. The inflammation score of DS+GASM3 group was higher than the other groups. The inflammation score of DS group was higher than the GASM3 group. All other groups were statistically significant higher inflammation score than negative control ($p = 0.001$).

Isolated colonies per gram of muscle tissue were observed with group of DS+ GASM3 were less than the group of GAS M3 in the microbiological examination ($p= 0.001$).

Negative control group had the highest level of in the assessment of TNF alpha cytokine levels. The mean level of TNF alpha in the group of DS+GASM3 was higher than those in GASM3. Likewise TNF alpha, DS+GASM3 group had the highest serum level of interleukin 6. But, there was no statistically significant difference in terms of the mean serum cytokine levels between the all groups.

Conclusion: Intramuscular injection of DS causes the higher level inflammation and necrosis in the muscle tissue. DS injection, before/after the inoculation of bacteria leads to reduce the number of the colonies in the muscle tissues at 96th hours. However, systemic spreading of bacteria and sepsis developing increases in these groups. Before the inoculation of bacteria, DS injection leads higher level cytokine levels.

This study was supported by Erciyes University Scientific Research Unit (Project No: TTU-2014-4900).

Key words: deep soft tissue infections; diclofenac; *Streptococcus pyogenes*; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; TNF alpha; interleukin 6

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hastalara ilaçlar; oral, intramusküler(im), intravenöz(iv) ve subkütan (sc) yollar ile verilmektedir. Kas içi enjeksiyonlar en sık kullanılan yöntemlerdendir. Oral yolla uygulanamayan veya hızlı etki beklenen uygulamalarda im yol tercih edilmektedir.

Kas içi enjeksiyonlar uygun şartlarda uygulanmadığı takdirde komplikasyonlara yol açabilmektedir. Görülen komplikasyonlar arasında kanama, hematoma oluşumu, damar içine enjeksiyon, sinir hasarı, ağrı, doku nekrozu, skar oluşumu, eklem kontraktürü ve tümör gelişimi yer almaktadır. Ayrıca deri florasında bulunan mikroorganizmalar enjeksiyon sırasında deri altına ve kas içine inoküle olabilmektedir. İnoküle olan mikroorganizmalardan salınan uyarılar sonucu enflamatuvar süreç başlamaktadır. Bu süreç sonrası gelişen lokal enflamasyon sonucunda tam rezolüsyon gelişebilmektedir. Enflamatuvar cevabın başlamasını geciktirecek etkenler bu süreci geciktirerek tam rezolüsyon yerine derin yumuşak doku enfeksiyonu ve apse gelişimi gibi lokal enfeksiyon görülebileceği gibi, sepsise kadar giden ağır sistemik komplikasyonlarda gelişebilmektedir.

Günlük klinik pratiğimizde Ocak 2013- Aralık 2013 tarihleri arasında hastanemizde kas içi NSAİ ilaç enjeksiyon sonrası gelişen ağır yumuşak doku enfeksiyonu olguları gözlemlendi. Bu hastalarda deri altında nekroz ve lokal yumuşak doku enfeksiyonundan ağır sepsise kadar değişen klinik tablolar vardı. Bu klinik gözlemler, NSAİ ilaç enjeksiyonun yumuşak doku enfeksiyonu gelişmesi ve enfeksiyonun şiddeti üzerine patogeneze herhangi bir etkisi var mıdır sorusunu akla getirmektedir. Konu ile ilgili yaptığımız literatür araştırmasında yeterli açıklayıcı bir bilgiye ulaşılamadı. Adale içi NSAİ ilaç uygulamasının enjeksiyon yerinde gelişen lokal enfeksiyonun yayılması ve enfeksiyonun şiddetini arttırması yönünde olumsuz

etkilerinin olabileceği ön görümüz nedeni ile, konunun patogenezeine katkı sağlayacağı düşüncei ile bu deneysel çalışma planlandı.

Bu çalışmada amacımız kas içi NSAİ ilaç enjeksiyonunun yumuşak doku enfeksiyonu gelişimi ve yayılması üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını farelerde deneysel olarak araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Deri, vücudumuzun en büyük organı olup insan vücudunu dış ortama karşı koruyan bir bariyer görevi görmektedir. Bu bariyer bütünlüğünün bozulması sonucunda etken mikroorganizmaların cilt ve cilt altı dokulara yerleşmesi ile deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (DYDE) gelişmektedir (1). DYDE, basit sellülitten derin nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonlarına kadar geniş bir yelpazede görülmektedir. DYDE'nin sınıflandırılmasında günümüze kadar çeşitli yöntemler kullanılmıştır. 1998 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından yapılan sınıflandırmada DYDE, komplike ve komplike olmayan olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Komplike olmayan DYDE arasında sellülit, basit abseler, impetigo ve fronkül bulunmaktadır. Komplike DYDE'yi derin doku enfeksiyonları oluşturmaktadır. Komplike olmayan enfeksiyonlarda sadece antibiyotik tedavisi veya basit bir drenaj yetmekte iken komplike DYDE ciddi cerrahi operasyonlar gerektirmektedir (2). DYDE'nin anatomik olarak sınıflandırılması Tablo-1 de gösterilmektedir.

"Infectious Diseases Society of America (IDSA)", DYDE'yi beş kategoride incelemiştir;

1. Yüzeyel, komplike olmamış enfeksiyonlar (impetigo, erizipel, selülit),
2. Nekrotizan enfeksiyonlar,
3. Isırık veya hayvan teması birlikteliği olan enfeksiyonlar,
4. Cerrahi alan enfeksiyonları,
5. İmmünsuprese hastalarda görülen enfeksiyonlar (3).

Tablo 1. Anatomik sınıflandırmaya göre deri yumuşak doku enfeksiyonları

Yüzeyel Deri Enfeksiyonları	Derin Doku Enfeksiyonları
İmpetigo	Nekrotizan Fasiit
Folikülit	Piyomiyozit
Karbonkül	Gazlı Gangren
Erizipel	
Sellülit	

Sistemik bulgulara ve komorbiditeye göre yapılan diğerk bir sınıflamada ise DYDE dört gruba ayrılmıştır.

Sınıf 1: Herhangi bir sistemik toksisite semptom ve bulgusu olmayan, komorbiditesi olmayan hastalar,

Sınıf 2: Hafif sistemik semptom bulgusu olan ancak ko morbiditesi olmayan ya da sistemik semptomu olmayan ancak diyabet obezite gibi ko morbiditesi olan hastalar,

Sınıf 3: Toksik görünümlü ve ateş, taşıkardi, takipne, hipotansiyon gibi sistemik semptomu olan hastalar,

Sınıf 4: Sepsis sendromu ile birlikte hayatı tehdit edici nekrotizan cilt enfeksiyonu olan hastalar (4).

2.2. Nekrotizan Fasiit

Deri ve deri altı dokuda yaygın nekrozlarla seyreden ve hızlı ilerleyen selllittir (5). Nekrotizan fasiitin (NF) ilk modern tanımı 1876 yılında Jones tarafından ‘hastane gangreni’ olarak yapılmıştır (6). Amerikan sivil savaşı sırasında 2600’den fazla vaka bildirilmiştir. Yirminci yüzyılın ortalarında ‘et yiyen bakteri’ tanımı ile hastalık yeniden popüler olmuşur (7). Tıp literatüründe gazlı gangren adı ile de geçmektedir. Nekrotizan fasiit terimi ilk defa 1951 yılında Wilson tarafından tanımlanmıştır (8). Genital organlar ve perine bölgesinde gelişen NF; zel bir isimle ‘Fournier Gangreni’ olarak tanımlamıştır. Ayrıca ağız ve submandibular bölgede gelişen enfeksiyonlara ise ‘Ludwig Anjini’ adı verilmektedir (9).

2.2.1. Epidemiyoloji

Amerika Birleřik Devletleri’nde Centers for Disease Control and Prevention (CDC) verilerine göre Grup A streptokok (GAS)’a bağlı NF insidansı 100 binde 3,5 ve fatalite hızı ise % 13,7 olarak bildirilmiştir (10). Avusturalya’da 2007 yılında bildirilen insidans 100 binde 2,7 ve mortalite hızı %7,8 dir (11). NF insidansı ile ilgili ülkemizden yeterli sayıda veri yoktur. Ülkemizde 2010-2011 yılları arasında 15 merkezin katıldığı epidemiyoloji ve mikrobiyolojik

tiplendirme çalışmasında ülkemizdeki GAS'a bağlı invaziv DYDE sıklığının daha düşük olduğu tespit edilmiştir (12).

2.2.2. Klinik sınıflandırma

NF, bakteriyolojik etken ve klinik tabloya göre iki farklı sınıfta incelenmektedir:

Tip 1 Polimikrobiyal tip: Enfekte fasyal yüzeyde 15 farklı aerobik ve anaerobik mikroorganizma izole edilebilir. Her yarada ortalama beş patojen etkindir. Patojenlerin çoğu bağırsak florasından orijin alır.

Polimikrobiyal NF'nin dört farklı klinik tabloyla birlikteliği mevcuttur (3).

Bunlar;

1. Abdomen veya bağırsak penetran travmalarıyla ilgili cerrahi prosedürler,
2. Dekübit ülseri veya perianal apseler,
3. İntravenöz madde bağımlılarında enjeksiyon bölgesiyle ilişkili enfeksiyonlar,
4. Bartholin apsesi veya minör vulva/vajinal enfeksiyonlardan yayılım (3).

Tip 2 Monomikrobiyal tip: En sık karşılaşılan patojen *S. pyogenes*'tir. *S. aureus* ve anaerobik Streptokoklar da etken olarak karşımıza çıkabilir. Enfeksiyon genellikle toplumdan kazanılmıştır ve sıklıkla alt ekstremitelerde oluşur. Çoğunlukla diyabet, aterosklerotik damar hastalıkları, venöz yetmezlik gibi altta yatan hastalıklar vardır. Kronik vasküler ülser çok hızlı şekilde fasiite ilerleyebilir. Varisella veya önemsiz travmalar sonrası gelişen fasiitlerde etken sıklıkla *S. pyogenes*'tir. Organ yetmezliği ve hipotansiyon gelişen olgularda mortalite %50-70 olarak bildirilmiştir (3) .

2.2.3. Etken mikroorganizmalar

Mikrobiyolojik olarak da tip 1 (polimikrobiyal) ve 2 (monomikrobiyal) olarak sınıflandırılmaktadır. Polimikrobiyal enfeksiyonlar genellikle perine ve gövde kaynaklı enfeksiyonlardır ve tip 2 ye göre daha sık görülmektedir. NF'de etken olan başlıca

mikroorganizmalar: *Peptostreptococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides* cinsidir. Tip 2 enfeksiyonlarda en çok sorumlu etkenler *S. pyogenes* ve *S. aureus*’tur. Yahav ve arkadaşlarının 45 NF’li hastayı derlediği bir çalışmada gram pozitif mikroorganizmalar daha sık (%57) izole edilmiştir. *S. pyogenes* en sık izole edilen gram pozitif mikroorganizma iken *E. coli* ise en sık izole edilen gram negatif mikroorganizma olmuştur. Gram negatif mikroorganizmalarla enfekte olan hastalarda 30 günlük mortalite daha yüksek bulunmuştur (13).

Tablo 2. Nekrotizan fasiit gelişiminde sorumlu mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Sık görülen	Nadir görülen
Gram pozitif	Grup A streptokok A veya G hemolitik streptokok <i>S. aureus</i> Koagülaz negatif stafilokoklar <i>Enterococcus</i> spp <i>Bacillus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> Grup B, C ve G streptokok <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Gram negatif	Enterobacteriaceae <i>Escherichia coli</i> . <i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas</i> spp <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.	Vibriyolar <i>Aeromonas</i> spp <i>Edwardsiella</i> spp <i>Hemophilus</i> spp. <i>Photobacterium</i> <i>damsela</i> <i>Burkholderia</i> <i>pseudomallei</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Eikenella</i> spp
Anaerop	<i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Propionibacterium</i> spp. <i>Veillonella</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Flavobacterium odoratum</i>
Mantar	<i>Candida</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp. Mucormycosis <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Apophysomyces elegans</i> <i>Absidia corymbifera</i>
Aside Dirençli Bakteriler		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

(*16 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır)

Krieg ve arkadaşlarının 64 NF’li hastayı derlediği diğer bir çalışmada ise enfeksiyonların %52’sinde polimikrobiyal etkenler izole edilmişken %10 hastada etken mikroorganizma izole edilememiştir. En sık izole edilen mikroorganizmalar ise sırası ile *S. pyogenes* (%28), *S. aureus* (%21) ve *E. coli* (%20) olarak bildirilmiştir (14). NF gelişiminden sorumlu sık ve nadir görülen mikroorganizmalar Tablo 2’ de gösterilmektedir.

2.2.4. Patofizyoloji

Hastalık patofizyolojisinin anlaşılması ile klinik tablonun ciddiyeti ve erken tanı koymanın önemi anlaşılmıştır. Travma, cerrahi yara ya da derinin kronik enfeksiyonları yolu ile subkutan deri dokusuna mikrobiyal invazyon gerçekleşir. Mikroorganizmaların bu bölgede proliferasyonu olması ve hyalüronidaz benzeri enzim salgılanması sonucu derin fasya dokusu üzerinde horizontal yayılma gerçekleşir. Bu enzimler nedeniyle perforan besleyici damarlarda gelişen tromboz nedeniyle dermis tabakasında iskemi ve likefaksiyon nekrozu gelişir. Nekroz sonrası fasyada şişlik ve donuk gri renk değişikliği olur. İskemi sonrasında subepidermal bölgede büllöz deformasyon, ülserler ve cilt nekrozları gelişir. Geç gelişen lezyonlarda non enflamatuvar intravasküler koagülasyon gelişir. İskemi ve nekroz sonucu başlayan enflamatuvar süreç nedeniyle sistemik enflamatuvar yanıt oluşmaktadır (15,16).

2.2.5. Risk faktörleri

NF gelişiminde genellikle bir predispozan faktör bulunmaktadır. İmmunosupresyon, ileri yaş, periferik vasküler hastalık ya da obezite bunlardan en önemlileridir. Diğer risk faktörleri Tablo 3’de gösterilmektedir.

NSAE kullanımının lenfosit fonksiyon bozukluğu yaparak streptokoksik ağır nekrotizan fasiitten sorumlu olduğu düşünülmektedir (17).

Tablo 3. Nekrotizan fasiit gelişiminden sorumlu risk faktörleri

Diyabetes Mellitus Kronik Hastalıklar İmmunosupresyon yapan ilaçlar (steroid vs.) Malnutrisyon İleri yaş (>60 yaş) Damar içi ilaç kullanımı Periferik vasküler hastalık	Kronik böbrek hastalığı Malignite Obesite Sigara Erkek cinsiyet Alkol kullanımı Travma öyküsü
--	---

*17. Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır

2.2.6. Klinik

Nekrotizan fasiitte erken dönemde sellülit ya da abse benzeri non spesifik semptomlar görülür. Bu nedenle erken dönemde doğru tanı konulmasında güçlükler yaşanabilir. Klinik bulgular mikrobiyolojik patojen, anatomik bölge ve lezyonun derinliğine göre değişir (18). Vital bulgularda en sık görülen anormallik taşikardi ve ateş yüksekliğidir. Hipotansiyon ve takipne ise daha az sıklıkta görülür (19).

Hastalarda görülen semptomlar erken ve ileri evre olmak üzere iki guruba ayrılır. Kızarıklık, enfekte olan bölgede palpasyonla hassasiyet, şişlik ve ısı artışı en sık görülen erken dönem fizik muayene bulgusudur. Fulminan formda ise yaygın doku nekrozu ile birlikte septik şok ve multiple organ yetmezliği bulguları izlenir. Fulminan formda klinik tabloda saatler içinde ilerleme olur (20).

Subakut formda ise klinik bulgular günler veya haftalar içinde gelişir. Başlangıçta folikülit, abse, ekstremitelerde gangren gelişimi, komplike cerrahi yara ile başlar. Takibinde yara kenarında eritem ve ciltte skleroz gelişir. Hastalar genellikle enfekte bölgede ağrı hisseder. Ancak bu his tanı için ayırt edici bir özellik değildir. Ayrıca lokal sinirlerin enfekte olduğu enfeksiyonlarda duyu kaybı da gelişebilir.

Enfeksiyon gelişimi sonrası ağrı hissi daha belirgin hale gelir. Ateş, dehidratasyon, konfüzyon, baş dönmesi, konfüzyon, diyare, bulantı, kusma, halsizlik, güçsüzlük gibi semptomlar görülebilir. Hastaya bu dönemde tanı konulup tedavi edilmez ise klinik tablo giderek ağırlaşır. Başlangıçta seröz vasıfta olan büller hastalık progrese oldukça hemorajik hale gelir. Cilt altında krepitasyon ve gaz formasyonu görülebilir. Bu evrede hasta apatik ve toksik görünümündedir (21). NF gelişim evrelerini kısaca sıralamak gerekirse;

- 1.Bül gelişimi
- 2.Ciltte ekimoz ve sonrasında nekroz gelişimi
- 3.Fizik muayene ya da radyolojik görüntülemelerde dokularda gaz görünümü
4. Kutanöz anestezi

Bu bulgular vakaların %7-44'ünde gelişir. Bu bulguların görülmesi durumunda acil cerrahi müdahale gereklidir (18).

2.2.7. Laboratuvar Bulguları

NF'ye özgül bir laboratuvar bulgusu yoktur. Ancak temel laboratuvar bulgularındaki değişiklikler klinisyenleri nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonlarına yönlendirebilmektedir.

Lökositoz en sık görülen laboratuvar bulgusudur. Beyaz küre sayısının 20 000/µl üzerinde olması klinisyenlere yüksek olasılıkla bu tanıyı düşündürür. Kan üre azotu (BUN) > 18 mg/dL, kreatinin > 1,2 mg/dL olan hastalarda böbrek yetmezliği süreci başlamıştır. Ağır sepsis ve multiorgan yetmezliği gelişen hastalarda serum kreatinin kinaz (CK) seviyesi yükselir (21). Laboratuvar değerlerini baz alan “The Laboratory Risk Indicator for Necrotising Fasciitis” (LRINEC) skoru erken tanı için yardımcı olan, Wong ve arkadaşları tarafından oluşturulan bir tür skarlama sistemidir (22). LRINEC skarlama sistemi Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. Nekrotizan fasiitte LRINEC skarlama sistemi

Değerler	Puan
CRP(mg/L) ≥150	4
Beyaz küre (bin/mm ³) <15 15-25 >25	0 1 2
Hemoglobin (g/dL) >13,5 11-13,5 <11	0 1 2
Sodyum (mmol/L) <135	2
Kreatinin (mg/dl) >1,6	2
Glukoz (mg/dl) <180	1

LRINEC: laboratory risk indicator for necrotizing fasciitis, CRP: C reaktif protein

Bu skarlama sistemine göre beş puan ve altı düşük risk, altı-yedi puan orta risk, sekiz puan ve üzeri yüksek risk grubunda yer alır (22).

Vakaların dörtte birinde direk grafide subkutan dokuda gaz görülebilir. Ancak gaz görülmemesi bu tanıyı ekarte ettirmez. Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) tanı için daha yardımcıdır. NF'nin erken döneminde sellülit benzeri yumuşak doku opasitesi ve kalınlığında artış görülür. BT görüntüleri, patolojik bulgular ve

yumuşak doku enflamasyonu ile korele olarak değişir. Bu doğrultuda dermal kalınlaşma, yumuşak doku atenuasyonunda artış, yüzeysel veya derin fasyada sıvı veya gaz görünümü olabilir. Yumuşak dokuda gaz gölgesi görüntülemeye göre BT daha spesifiktir. Enfeksiyon kaynağının belirlenmesi, kemik komponentlerle bağlantı ve doku nekrozuna bağlı vasküler rüptür gibi komplikasyonları belirlemede BT görüntüleme daha yararlıdır. MRI ile kıyaslanacak olursa hızlı görüntüleme açısından da BT daha avantajlıdır (23). MRI’da T2 hiperintens görüntülemeye derin fasya kalınlığı 3 mm’den fazladır. Yüzeysel fasyada sinyal değişikliği izlenebilir ancak izlenmemesi tanıyı ekarte ettirmez. MRI görüntülemesinde interfasyal sıvı birikimi ve perifasyal hiperemik değişiklikler T1 görüntülemeye hipointens T2 görüntülemeye hiperintens değişiklikler ve değişen derecelerde kontrast tutulumu izlenir (24).Direk grafide görülen gaz gölgesi ve MRI görüntülemeye perifasyal değişiklikler Şekil 1’ de görülmektedir.

Ultrasonografik görüntülemeye derin fasyada kalınlaşma, sıvı birikimi ve bozulma görülebilir. Fasyada 4mm’den geniş kalınlaşmalar NF için belirleyicidir. Kas dokuda hipo/hiperekojenik şişlik, doppler görüntülemeye küçük damarlarda kanlanma artışı veya tromboz görülebilir (15).



Şekil 1. Nekrotizan Fasiitli Hastalarda Direk Grafi ve Manyetik Rezonans Görüntüleri (*15 numaralı kaynaktan alınmıştır)

2.2.8. Tedavi

Nekrotizan fasiit tedavi yönetiminde antibiyotikler tedavinin sadece bir basamağını oluşturur. İskemi ve hipoksi nedeniyle uygulanan antibiyotik enfekte dokuya etkin düzeyde ulaşamaz. Tedavinin en önemli basamağını cerrahi debridman oluşturur (25).

NF şüphesi olan durumlarda acilen geniş spektrumlu bir antibiyotik başlanmalıdır. Nekrotizan fasiitin mikrobiyolojik sınıflamasına göre ampirik tedavi planlanmalıdır. Polimikrobiyal enfeksiyonların tanısı hasta hikâyesi, gram ve kültür sonucuna göre konulur. Başlangıç tedavisinde anaerobik etkinliği de olan tedaviler planlanmalıdır. Yakın dönemde antibiyotik kullanan ve hastanede yatış öyküsü olan hastalarda ampirik tedavide dirençli gram negatif bakterilere de etkili antibiyotikler planlanmalıdır. Tip 2 enfeksiyonlarda *S. pyogenes* ve *S. aureus*'a karşı etkili antibiyotikler kullanılmalıdır. Metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) enfeksiyonlarının tedavisinde birinci veya ikinci kuşak sefalosporinler kullanılabilir. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarında vankomisin kullanılabilir. Vankomisine dirençli suşların tedavisinde ise daptomisin ya da linezolid tedavisi tercih edilebilir. Streptokoksik enfeksiyonlarda beta laktam grubu antibiyotiklere klindamisin eklenmesi bazı klinisyenler tarafından önerilmektedir (21).

Tedavi başlangıcında alınan kan, yara veya doku kültürü sonucuna göre antimikrobiyal tedavi yeniden düzenlenmelidir. Ancak ampirik tedaviye hemodinamik stabilizasyon sağlandıktan 48 saat sonrasına kadar devam edilmelidir. Antibiyotik tedavisine lokal enfeksiyon semptom ve bulguları kaybolduktan 5 gün sonrasına kadar devam edilmelidir (26). Toplam tedavi süresi 4-6 haftaya tamamlanmalıdır (21). Ampirik tedavide kullanılan antibiyotikler ve dozları Tablo 5'te belirtilmiştir.

Tablo 5. Nekrotizan Enfeksiyonlarda Uygulanan Antibiyotik Tedavileri ve Dozları

Enfeksiyonun Türü	Antibiyotik	Dozu
Miks Enfeksiyon	Piperasilin-tazobaktam+ Vankomisin İmipenem Meropenem Ertapenem Sefotaxim + Metronidazol/klindamisin	3.37g 6-8 saatte bir 30 mg/kg/gün bölünmüş 2 doz 1 g 6-8 saatte bir 1g 8 saatte bir 1 g/gün 2 g 6 saatte bir 500 mg 6 saatte bir/600-900 mg 8 saatte bir
Streptokoksik Enfeksiyon	Penisilin +klindamisin	2-4 milyon ünite 4-6 saatte bir + 600-900 mg 8 saatte bir
Stafilokoksik Enfeksiyon	Sefazolin Vankomisin(dirençli suş ise) Klindamisin	1 g 8 saatte bir 30 mg/kg/gün bölünmüş 2 doz 600-900 mg 8 saatte bir
Klostridyal	Klindamisin + Penisilin	600-900 mg 8 saatte bir+ 2-4 milyon ünite 4-6 saatte bir

* 3 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır

2.3. Grup A Streptokoklar

Grup A streptokoklar, gram pozitif boyanma özelliği gösteren, spor oluşturmeyen koklardır. İlk olarak yara enfeksiyonu, erizipel ve puerperal sepsis etkeni olarak gösterilen bakteri 1884'te Rosenbach tarafından *S. pyogenes* olarak adlandırılmıştır (27). Pürülan lezyonlarda ve özellikle sıvı besiyerlerinde kısa-orta uzunlukta zincir oluşturan küre veya ovoid şekilli bakterilerdir. Üreme esnasında tek bir düzlemde bölünmelerinden dolayı zincir oluşturmaktadırlar. Patojen streptokokların oluşturdıkları zincirler, normal floradaki streptokokların oluşturdıklarına göre daha uzun olmaktadır. Zincir oluşturma özellikleri, besiyeri içeriği, ortam ısısı ve besi yerine eklenen antibiyotikler gibi çeşitli etkenlerden etkilenmektedir (28).

S. pyogenes bu grubun temsilcisi olan türdür. Bu mikroorganizma fakültatif aeroptur, optimum üreme ısısı 35-37°C, uygun üreme pH'sı ise 7,4 ile 7,6 arasındır. Serum, kan ve beyin gibi zenginleştirici maddeler eklenmiş besi yerlerinde daha iyi üreme gösterirler. Yüzde 5-7 koyun kanlı agarda 1-2 mm büyüklüğünde şeffaf veya yarı şeffaf S (smooth) tipi koloni ve çevresinde beta hemoliz oluşturur. Bu hemoliz zonu 2-3 mm çapında görülür ve koloninin 2-3 katından daha geniş olabilir. Beta hemolitik özelliği anaerobik ortamdaki inkübasyonda daha belirgin olarak ortaya çıkar. *S. Pyogenes*'in beta hemolitik aktivitesi bakteride bulunan streptolizin S ve O nedeniyle oluşur (28, 29).

2.3.1 Biyokimyasal Reaksiyonları

Katalaz negatiftir ve bu özellikleri ile stafilokoklardan ayrılır. Birçok şekeri fermente ederek asit oluşturur ancak gaz oluşturmaz. Ribozu fermente edemez. Safrada çözünmez. Pirolidon naftilaminde (PYR) hemoliz oluşturur ve 54 °C'de 30 dk kaynatma ile ölür. Basitrasine duyarlıdır, bu özelliği ile diğer hemolitik streptokoklardan ayrılır (30).

2.3.2. Yapısı

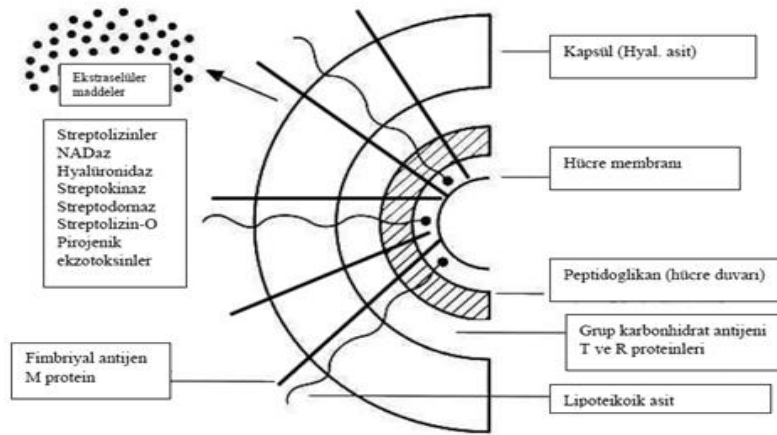
Kompleks bir yapıya sahip olan hücre duvarı üç kısma ayrılır:

1. En iç kısımda peptidoglikan (mukopeptid) tabaka bulunmaktadır, özellikle duvarın sertliğinden sorumludur.

2. Polisakkarit veya gruba özgü karbonhidratların olduğu kısım. Hücre duvarının bu komponenti insan kalp kapaklarındaki glikoprotein ile benzer bir antijenik yapı gösterir.

3. Hücre duvarının en dış kısmında M, T ve R proteinleri bulunur (31).

Hücre duvarı peptidoglikan matriks üzerinde yer almakta olduğundan sağlam bir yapıya sahiptir. Peptidoglikan matrikste GAS gruplandırılmasında kullanılan karbonhidrat antijeni bulunmaktadır. Lipoteikoik asit ve M proteini hücre duvarına bağlı bulunmakta ve dışa doğru pili şeklinde uzanmaktadır. Hücre duvarında T ve R proteinleri de yer almaktadır. Suşların bazılarında hyalüronik asit yapısında kapsül bulunmaktadır (28,29).



Şekil 2. *Streptococcus pyogenes*' in hücre yüzeyi yapısı ve virulans rol oynayan ürünleri (textbookofbacteriology.net/streptococcus adresinden uyarlamıştır. Erişim tarihi 30.10.2015)

2.3.3. Spesifik antijenleri

S. pyogenes'in hücre yüzeyinde bulunan bazı antijenler, insan kalp, düz kas dokusu, iskelet, kalp kapak fibroblastları ve nöronal dokuları ile benzerlik gösterirler. Bu durum konakta immün toleransa veya baskılanmış immün yanıtın oluşmasına yol açar (31).

M proteini: Grup A streptokokların en önemli yüzey antijeni olan M proteini, *emm* geni tarafından kodlanır. M protein antijeni, tripsine duyarlı, asit ve ısıya dirençlidir. Alkolde çözünür ve A'dan D'ye kadar sıralanan 4 sarmaldan oluşur. Prolin ve glisinden zengin ucu bakteri hücre duvarına interkalasyondan sorumludur, hidrofobik uç ise membran zincirini oluşturur (28,32). GAS için 80'den fazla M proteini tanımlanmıştır. Ancak *emm* gen mutasyonları nedeniyle sürekli yeni M proteini oluşmaktadır (33).

M proteini C-terminali ile konak proteinlerine bağlanarak ya da konak proteinlerinin mikroorganizmaya bağlanmasını engelleyerek klasik kompleman yolağını, C3b ile işaretlenmesini önleyerek alternatif yolağı inaktive eder (34). Böylece mikroorganizmanın fagositer hücreler tarafından tanınmasını ve fagosit edilmesini önlemiş olur (31).

M proteininin alt tipi ile gelişen hastalıklar arasında doğrudan bir bağlantı yoktur. Ancak nekrotizan fasiit olgularında etkenin çoğunlukla M1 ve M3 alt tipi olduğu bildirilmiştir (35). M1, M3 ve M6 alt türleri fibronektin gibi ekstrasellüler matriks elementleri ile konak hücre reseptörlerine bağlanarak bakteriyel kolonizasyondan sorumludur (34). Wessel ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada M3 proteinine sahip bakteri ile oluşturulan cilt enfeksiyonlarında yayılım, bakteriyemi ve ölüm görülürken M3 protein defekti olan kapsülsüz mutant suşla yapılan çalışmada sadece lokal abse görülmüştür (36). Bu çalışma sonunda kapsül ve M proteinin nekrotik lezyonların yayılmasında önemli rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır.

T proteini: Isıya ve asite duyarlı, pepsin ve tripsine dayanıklı, alkolde çözünmeyen, virulans arttırıcı etkisi olmayan antijenik bir proteindir. Vücutta kendilerine karşı antikor üretmezler. T protein antijeni M ve R proteinleri ile birlikte hücre yüzeyinde bulunur. T proteinini kodlayan *tee* genleri arasında homoloji olmasına rağmen, *emm* genlerine göre daha çok çeşitliliğe sahiptirler. M proteinlerinin tersine, *tee* geninin en iyi korunmuş ucu amino terminalidir. Bu gözlemlere göre GAS'lar 25 farklı kombinasyonda T proteini türü içerebilmektedir ve T proteinine karşı geliştirilmiş antiserumlarla yapılan aglütinasyon yöntemi ile streptokoklar serolojik olarak tiplendirilebilmektedir (30).

R proteini: R proteini pepsine duyarlı, tripsine dayanıklı, virulansta rol oynadığı düşünülmeyen ve tiplendirmede henüz kullanılmayan bir antijendir. Tipe özgü değildir, R28 ve R3 şeklinde iki tipi belirlenmiştir.

R28: Bu protein ile puerperal sepsis arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Genellikle bu hastalık nedeniyle oluşan salgınlardan izole edilen suşların büyük kısmında bulunduğu belirtilmektedir. Bu tip proteinden yoksun mutant bir bakterinin genital epitel hücrelerine bağlanamadığı gözlenmiştir, bu yüzden R28 proteininin doku tropizmi ve kadın genital sistemine adezyonu sağladığı düşünülmektedir (37).

Serum Opasite Faktörü: GAS'ın çoğunda bulunur. Tür spesifik lipoprotein lipaz yapısındadır. Serum opasite faktörü, hücre yüzeyine bağlanan çift fonksiyonlu bir protein olarak görev yapar. Bu iki aktivite; serumu opaklaştırma ve C-terminal bölgesi ile fibronektin-fibrinojen bağlamadır (36).

Kapsül antijeni: GAS kapsülü, N-asetil glukozamin ve D-glukuronik asit moleküllerinin oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit polimerlerinden meydana gelmektedir (38). Kapsül, *hasA*, *hasB* ve *hasC* denilen üç adet genden oluşan küme tarafından kodlanan enzimlerin bir ürünüdür. Bu 3 gen, sırasıyla hyalüronik asit sentaz, uridin difosfat (UDP)-glukoz dehidrogenaz ve glukoz pirofosfataz enzimlerini kodlar. Bu genler, GAS suşları arasında yüksek derecede korunmuştur ve kapsüler gen ekspresyonu derecesindeki varyasyonlar gen transkripsiyonunun düzenlenmesindeki farklılıkları yansıtmaktadır. Sözü geçen genlerin çokça eksprese olması, mikroorganizmanın koyun kanlı agarda mukoid koloniler halinde üremesine yol açar. Kimyasal olarak, bu kapsüler materyal, bağ dokusunun zemin maddesinden ayırt edilememektedir ve bu durumun enfekte konakta bu maddenin yetersiz immün yanıt oluşturmamasını açıklayabilmektedir. Kapsül, fagositoza direnç için gereklidir. Ayrıca, farinks epitelindeki CD44 reseptörlerine bağlanan önemli bir yapıdır (38,39).

Kapsülün antijenik özelliği fazla olmamakla birlikte virulansı artırıcı özelliği bulunmaktadır (31).

Lipoteikoik asit (LTA): Fibronektine bağlanma özelliğinde olan virulans faktörüdür. Birçok hücre için sitotoksik etkisi bulunmaktadır. Mikroorganizmanın faregeal mukozaya yapışmasının başlamasında merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (38).

Fibronektin bağlayıcı proteinler: LTA'ya ek olarak streptokokal adezinler arasında sayılan, fibronektin bağlayıcı proteinler mikroorganizmanın mukozal ve kutanöz hücre tiplerinin yüzeylerinde bulunan fibronektin molekülünün amino terminaline yapışmasında rol oynamaktadır (38).

2.3.4. Salgıladıkları toksin ve enzimler

Streptolizin O: Streptolizin-O, oksijene duyarlı, ısı ve asitlere dirençlidir ve besiyerindeki derin hemolizden sorumludur. Bu hemolitik etki, ortamda oksijen varlığında geri dönüşümlü, kolesterol varlığında ise geri dönüşümsüz olarak ortadan kalkar. Etkinliği, ultrasantrifügasyon, dondurma-çözme ve liyofilizasyon ile azalmaktadır. Lökosit, monosit ve kültürü yapılan hücreler için toksiktir. Bu proteinin kardiyotoksik özellik göstermesi klinik önem taşımaktadır. Antijenik özelliğe sahiptir. Streptolizin-O'ya karşı konak tarafından oluşturulan antikorlar serolojik tanı için kullanılmaktadır (Antistreptolizin -O antikor - ASO) (28, 31).

Streptolizin S: Streptolizin-S, kanlı agardaki yüzeysel hemolizden sorumlu olan, oksijene dayanıklı lökositidir. Eritrosit, lökosit ve protoplastları eriten bu peptit fagositozu engellemektedir. Hemolitik aktivitesi, lesitin ve beta lipoproteinaz tarafından engellenen bu protein antijenik değildir. Üremenin geç logaritmik fazında ve durağan fazında demir elementi varlığında en yüksek düzeyde üretilmektedir. Streptolizin S'nin membran fosfolipidleriyle etkileşerek toksik etkilerini gösterdiği düşünülmektedir (31).

DNaz: Deoksiribonükleik asidi depolimerize ederek enfeksiyon ortamının akıcılığını sağlayan enzimdir. Bu enzimin A, B, C ve D olmak üzere 4 türü bulunmaktadır. Deri ve boğaz enfeksiyonlarında DNaz' a karşı gelişen antikorlar serolojik tanı için kullanılır (31).

Hyaluronidaz: Hyaluronik asidi enzimatik olarak parçalayarak bağ doku yüzeyinde yayılmayı sağlar (31).

Streptokinaz: Plazminojeni plazmine dönüştürerek fibrinin eritilmesinde rol oynar. Böylece mikroorganizma etrafında oluşan pıhtı eritilerek dokuda yayılım kolaylaştırılmış olur (31).

Streptokokal pirojenik ekzotoksin B: Potent bir proteazdır. Grup A streptokokların toksinleriyle oluşturdukları kızıl gibi klinik tablolardan sorumlu eritrojenik toksin olarak da bilinen protein yapısında toksinlerdir. Günümüzde tanımlanmış 14 türü bulunan ekzotoksinler süperantijen olarak davranmakta ve antijen sunucu hücreler tarafından işlenmesine gerek olmadan doğrudan ve spesifik olmayan yollarla major histocompatibility complex (MHC) sınıf II moleküllerine bağlanarak T hücrelerini uyarmaktadırlar (31,40,41).

C5a Peptidaz: Kemotaksisi önler (40). *S. pyogenes* virulans faktörleri ile ilgili özet Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. *S. pyogenes*'in virulans faktörleri

Kolonizasyon (Aderans) Yüzey Makromolekülleri M-protein, Lipoteikoik asit, Protein F ve fibronektin bağlayıcı proteinler
Dokuya Yayılımı Kolaylaştırıcı Faktörler Hyalüronidaz, Proteazlar, Streptodornazlar Streptokinaz: Fibrini eritir
Fagositozdan Koruyucu Faktörler Kapsül: Hiyalüronik asit yapısında C5a peptidaz: Serin proteza, kemotaksisi önler M proteini Lökosidinler: Streptolizin S, Streptolizin O
Konak İmmün yanıtına karşı savunma faktörleri Antijenik gizlenme ve hyalüronik asit tarafından sağlanan tolerans Antijenik varyasyon
Toksinler: Streptokoksik pirojenik ekzotoksinler
Kan Dolaşımındaki Antikorlar: Konağın bazı dokuları ile çapraz reaksiyon gösteren mikroorganizma antijenlerine karşı konağın oluşturduğu antikorlar

(*<http://www.textbookofbacteriology.net/streptococcus> aderesinden uyarlanmıştır erişim tarihi 30.10.2015)

2.4. Akut Enflamasyon ve Enflamatuvar Mediyatörler

Enflamasyon; konak hücrenin, kan damarlarının, proteinlerin ve diğer mediyatörlerin hücre hasarını başlatma nedeni ve bu neden yüzünden nekroza uğrayan hücre ve dokuları ortadan kaldırmaya çalıştığı ve rejenerasyon sürecini başlattığı koruyucu bir yanıttır.

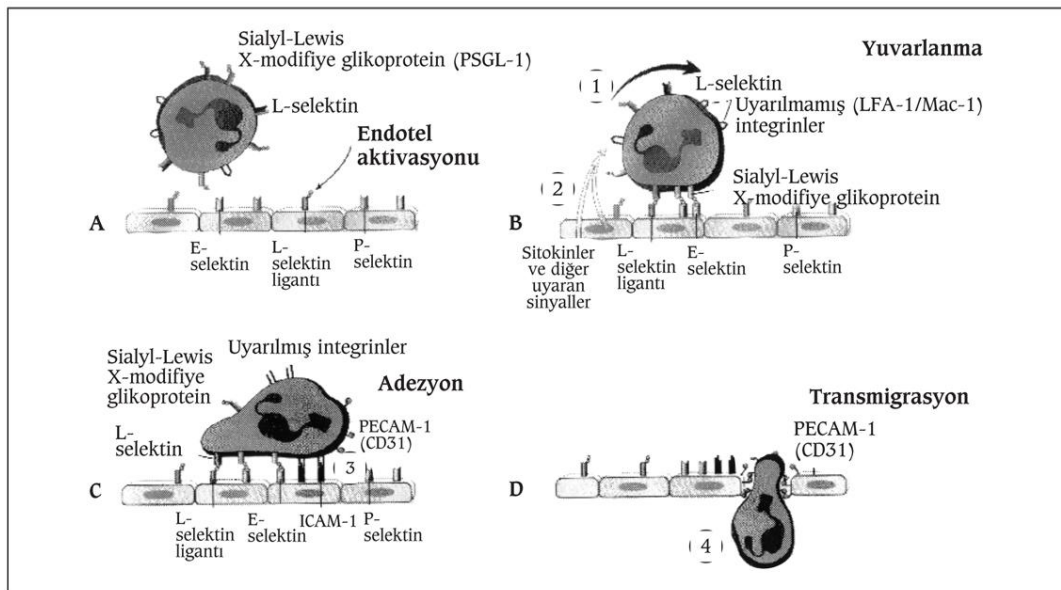
Akut enflamasyonu başlatan olaylar:

- 1- Enfeksiyonlar (bakteriyel, viral, fungal ve paraziter olabilir)
- 2-Travma
- 3-Doku nekrozu
- 4-Yabancı cisimler
- 5-Hipersensitivite reaksiyonları

Vasküler reaksiyon ve hücre yanıtı enflamasyonun başlıca bileşenleridir (42).

2.4.1 Akut enflamasyonda vasküler değişiklikler

Enflamasyon sırasında gelişen arterioller vazodilatasyon sayesinde bu bölgedeki lokalize kan miktarındaki artış nedeniyle konjesyon gelişir. Bu olay sayesinde enflamasyonun dört belirtecinden kızarıklık (kolor) ve ısı artışı (rubor) belirtisi oluşur. Mikrovasküler geçirgenlik artışı ile intravasküler alandan damar dışına proteinden zengin sıvı geçişi olur. Geçiş sonrası enflamasyon bölgesinde arterioller viskozite artar ve kan akımı yavaşlar. Arteriollerden postkapiller venüllere geçiş sırasında eritrositlerden boyutça büyük olan lökositler endotele yakın alana itilir. Yavaşlayan kan akımı sayesinde endotele yapışma şansı artar (**marjinasyon**). Lökosit yüzeyindeki Siyal-Lewis-X glikoproteini ve integrinler endotel yüzeyindeki E ve P selektine tutunarak yuvarlanmaya başlar (**yuvarlanma**). Lökosit yüzeyinde bulunan ve afinitesi düşük olan integrinler enflamasyon sırasında salgılanan TNF alfa ve interlökin 1 (İL-1) gibi mediatörler ile aktive olarak endotel üzerindeki ligandlarına yapışır ve (**adezyon**) gerçekleşir. Adezyon sonrası lökositlerin endotel yüzeyindeki Platelet endothelial cell adhesion molekülü (PECAM)-1, (CD-31) glikoproteinine yapışarak ekstravasküler alana geçmesine (**transmigrasyon**) adı verilir. Bu olayda endotel bazal membranından salınan çeşitli kollajenazlar da görev alır. Ekstravasküler alanda lökositlerin enflamasyon bölgesine göçüne ise (**kemotaksis**) adı verilir (43,44). Akut enflamasyondaki lökosit aktivasyon basamakları Şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Akut enflamasyonda lökosit aktivasyon basamakları

(* 42 nolu kaynaktan alınmıştır)

Lökositler için kemotaktik kabul edilen ajanlar;

-N-formilmethionin terminaline sahip bakteri peptitleri

-Sitokinler

-Kompleman sistemi bileşenleri

-Araşidonik asit metabolizmasında yer alan lökotrien B4 (LTB4)'tür (42).

Akut enflamasyonda ilk 6-24 saatte enflamasyon bölgesinde hâkim olan nötrofiller 24-48 saat sonra yerini monositlere bırakır.

2.4.2 Enflamasyonun kimyasal mediyatörleri ve düzenleyicileri

Mediyatörler lokal olarak enflamasyon yerindeki hücreler tarafından üretilir ya da enflamasyon bölgesinde aktive edilen inaktif prekürsörlerden oluşur.

2.4.2.a. Hücrelerden kaynaklanan mediyatörler

Histamin: Mast hücreleri, trombositler ve bazofiller tarafından üretilir. Tavma, zedelenme, anafilotoksinler ya da çeşitli sitokinler aracılığı ile uyarılan mast hücrelerinin granüllerinden salınır. Arteriolde dilatasyon, venüllerde ise endotel kontraksiyonu ile endotel hücreleri arasında boşluk oluşurarak damar geçirgenliğinde artışa neden olur (45).

Serotonin: Trombosit granüllerinde depo edilir. Vazokonstriktör etkisi vardır (42, 46).

Araşidonik Asit Metabolitleri; Prostaglandinler, Lökotrienler, Lipoksinler Araşidonik asit (AA) metabolitleri enflamasyon ve hemostaz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde etkilidir. Enflamatuvar yanıt oluşumunda sentezleri artar ve bu sentezin inhibitörleri enflamasyonu hafifletir. Lökosit, mast hücreleri, endotel hücreleri ve trombositler enflamasyondaki AA metabolitlerinin önemli kaynaklarıdır (42).

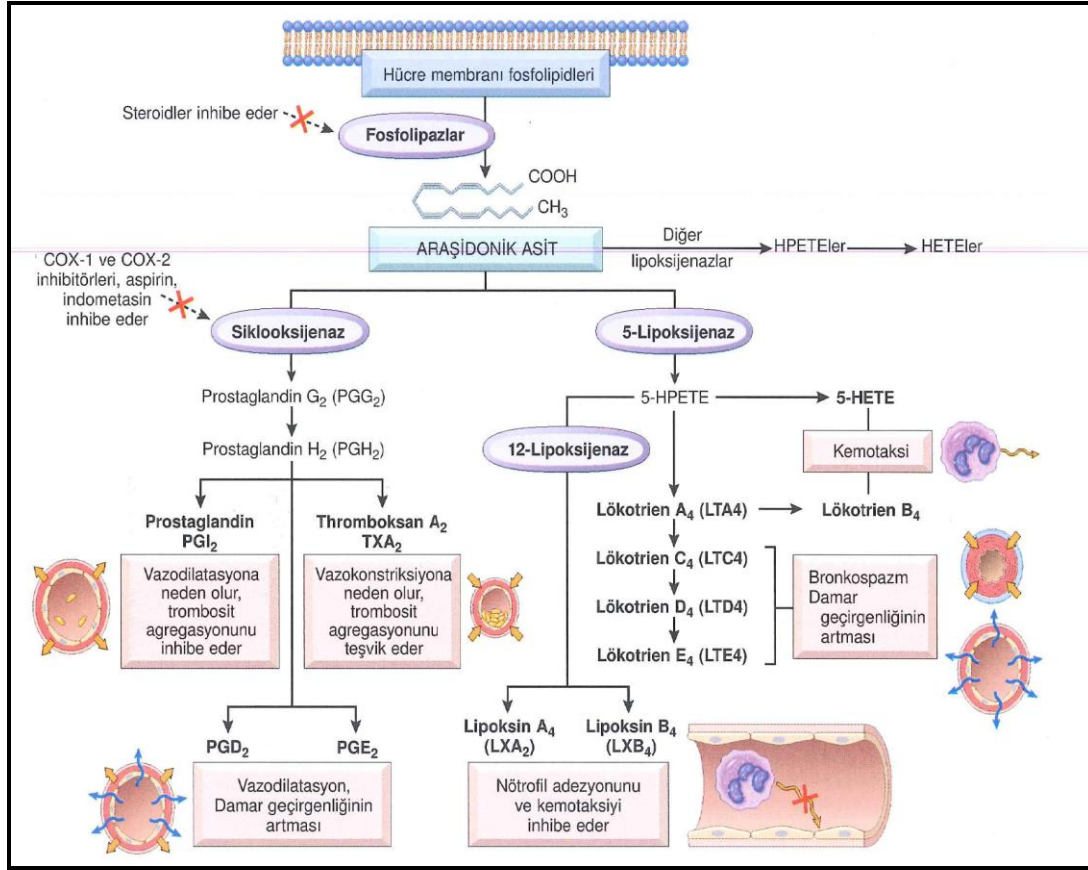
Prostaglandinler ve trombaksanlar: Prostaglandin E2(PGE2), PGD2, F2A ve PGI2 (prostasiklin) ve tromboksan A2 (TXA2) siklooksijenaz yolunun her biri spesifik bir enzimin bir ara ürünü üzerinde etkisi ile meydana gelen ürünleridir. Enflamasyona eşlik eden ağrı ve ateşe katkıda bulunurlar. PGE2 çeşitli uyarılar karşısında ağrı eşiğini düşürür ve sitokinlerle etkileşime girerek ateş yükselmesine neden olur (42).

Lökotrienler: Nötrofillerde AA'yı metabolize eden başlıca enzim olan lipooksijenaz etkisi ile üretilir. Özellikle Lökotrien B₄ (LTB₄)' ün nötrofiller üzerinde güçlü kemotaktik etkisi vardır. LTD₄ ve LTE₄ öncelikle mast hücrelerinde üretilir, bronkokonstrüksiyon ve vasküler permeabilitede artmaya neden olur (42).

Lipoksinler: AA metabolizmasında lipooksijenaz enzimi ile oluşan metabolittir. Nötrofil adezyonunu ve kemotaksisi önleyen endojen antienflamatuvar mediyatörler olarak görev yaparlar. Aktive olan ve lökositlere yapışan trombositler de önemli bir lipoksin kaynağıdır (42).

Trombosit Aktive Edici Faktör: Trombosit agregasyonu ve degranülasyonuna neden olduğu için bu adı alan trombosit aktive edici faktör (PAF) , birçok enflamatuvar etkiye sahip diğer bir fosfolipid türevi mediyatördür. Nötofil, monosit, bazofil, endotel hücreleri ve trombositlerdeki membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A₂ etkisi ile üretilir. Trombosit aktivasyonu yanı sıra bronkokonstrüksiyon, vazodilatasyon ve vasküler permeabilite arttırıcı etkisi vardır ve bu etki histaminden 100-1000 kat daha güçlüdür (42).

AA metabolizması ve yolaktaki inhibitör mekanizmalar Şekil 4' te gösterilmektedir.



COX-1, COX2 siklooksijenaz 1,2; HETE, hidroksieikozatetraenoik asit; HPETE, hidoksiperoxeikozatetraenoik asit.

Şekil 4. Araşidonik asit metabolitlerinin üretilmesi, enflamasyondaki rolleri ve bu yolaktaki inhibitör mekanizmalar (*42 nolu kaynaktan alınmıştır)

Sitokinler: Enflamasyon ve bağışıklık yanıtlarında mediyatör olarak fonksiyon gören birçok hücre türünün polipeptid yapısındaki ürünleridir. Moleküler ağırlıkları genellikle 40 kiloDaltonun (kDa) altındadır. Lökositler arasında iletişimde aracı olması nedeniyle interleokin (İL) olarak adlandırılırlar. İmmün yanıtın aktivasyonu ve farklılaştırılmasında rol oynarlar. Enflamasyonun başlangıcında salınan proenflamatuvar sitokinlerin salınması sonrasında adaptif immün yanıtın sorumlu immunoregülarör ve efektör sitokinler salınır. Akut enflamasyonda sıralı salınan sitokin olayına 'sitokin kaskadı' adı verilir. 1990'lı yıllarda sepsis gelişiminde sadece proenflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımının sonrası oluşan sitokin fırtınasının sorumlu olduğuna inanılmaktaydı. Ancak son çalışmalarda proenflamatuvar sitokinlerle birlikte İL-10, TGF beta, İL-4 gibi anti enflamatuvar sitokinlerin salınımı ile immünolojik dengenin sağlandığı sonucuna verilmiştir. Tümör nekroz faktörü (TNF), İL-1, İL-6 gibi akut enflamasyondan sorumlu proenflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasında bireylerin gen ekspresyonunun farklı olması ve anti-enflamatuvar mekanizmalar nedeniyle tutarlı bir patern yoktur. Enflamatuvar yanıtın başlangıcında konak yanıtında proenflamatuvar

yanıtı takiben antienflamatuvar süreç başlamakta ve oldukça interaktif ve dinamik bir süreç işlemektedir (47-49). Kronik enflamasyonda ise daha önemli olan sitokinler ise interferon gama ve İL-12 dir (42).

TNF alfa: 17 kDa ağırlığında non-glizolile bir proteindir ve 157 amino asitten oluşur. İL-1 ile birlikte aktive makrofajlar, mast hücreleri, endotel hücreleri, kalp, karaciğer ve kemik iliği gibi hücreler tarafından üretilir. İn vitro koşullarda birçok tümör hücresinin sitoliz ve sitotaksisinde önemli rol oynar. İn vivo koşullarda İL-1 ile birlikte endotel değişikliklerinden sorumludur. Enflamatuvar olayın başlangıcı sonrası gen transkripsiyonu ve RNA translasyonu sonrası TNF alfa salınımı süresi 30 dakikadır, bu nedenle immun yanıtın erken düzenleyicisi olarak bilinir (50). TNF alfa ve İL-1'in sepsisteki rolünü araştıran deneysel bir çalışmada bakteriyel endotoksin enjeksiyonundan 60-90 dakika içinde serum TNF alfa ve İL-1 düzeylerinin pik konsantrasyona ulaştığı görülmüştür (51). Sistemik enflamatuvar yanıt sendromunda İL-1 ile birlikte antikoagülan mekanizmaları inhibe ederek dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) gelişiminden sorumludur. Normal insan hücresi diploid fibroblastlarında büyüme faktörü görevi yaparak kollajenaz ve PGE2 sentezine öncülük eder. Makrofajlarda süperoksit dismutaz enzimi sentezini indükleyerek fagositozdan sorumludur. Osteoklast aktivasyonu ile kemik doku rezorbsiyonundan da sorumludur. Adipositlerde lipoprotein lipaz yapımını suprese ederek lipogenetik metabolizmada rol oynar. Sınıf 1 ve 2 HLA ve diferansiyasyon antijeni uyarılması ve İL-1, koloni stimülatör faktör, İFN gama ve arasıdonik asit metabolizmasını indükleyerek lökosit ve lenfositlerin yapımından sorumludur. Endotelyal ve sinovyal hücrelerde kollajenaz yapımından sorumludur. Maligniteli hastalarda kaşeksiden sorumlu temel mediyatördür bu nedenle diğer bir adı ise kaşektindir. Zorunlu ve fakültatif bakteri ve mantar enfeksiyonlarında ise hücrel immun yanıtın sorumludur (52).

İL-6: İnterferon beta 2 ya da B hücre stimulan faktör (BSF-2) olarak da bilinen bu sitokin 26 kDa ağırlığındadır. Pleotropik alfa helikal yapıdadır. TNF alfanın aksine kendi kendine sepsis benzeri durum oluşturmaz. İnflamatuvar yanıt sırasında görülen ateş, lökositoz, CRP salınımı fibrinojen ve ferritin yüksekliğinden sorumludur (47). Akut faz reaksiyonu yanı sıra enflamasyon, hematopoez, kemik metabolizması ve kanser progresyonunda önemli rol oynar. Proenflamatuvar sitokin olmasının yanı sıra İL-6, antienflamatuvar yanıtın tetiklenmesinde de rol oynamaktadır. Bu süreçte TNF alfa ve İL-1 salınımını inhibe eder ayrıca İL-10, TGF-beta, ve kortizol gibi antienflamatuvar mediatörlerin salınmasını artırır (47, 53).

Kemokinler: 8-10 kDa ağırlığında yapısal olarak birbirleri ile ilişkili, öncelikle lökositlerin farklı alt bölümleri üzerinde kemoatraktan olarak etkili bir protein ailesidir. İnflamtuar uyarıya yanıt olarak nötrofil, lenfosit, eozinofil gibi enflamatuvar hücreleri enflamasyon bölgesine toplamak için geçici olarak kemokin kombinasyonları üretilir. Diğer bir görevi ise lökosit integrinlerinin endotel hücrelerine afinitesini artırmaktır (42).

Reaktif Oksijen Türevleri: Lizozomlar içerisinde üretilerek fagosit edilen miokroorganizmaları ve nekrotik dokuları yok ederler. Düşük düzeyde salgılandıklarında kemokin, sitokin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonu artırır (42).

Nitrik Oksit: Enflamasyon sırasında aktif makrofajlarda sitotoksik olarak kullanılır. Ayrıca vazodilatasyon, trombosit aktivasyonunun tüm aşamaları ve lökosit kemotaksisinde görev almaktadır (42).

Nöropeptidler: Enflamasyonun başlangıcında vasküler tonusun düzenlenmesi ve permeabilitenin ayarlanmasında rolü vardır (42).

2.4.2.b. Plazma proteininden kaynaklanan mediyatörler

Kompleman sistemi konak savunmasında ve enflamasyonda önemli rol oynayan plazma proteinlerinden oluşur. Farklı kompleman proteinleri aktive olduğunda opsonizasyon ile mikroorganizmaları fagositoya hazırlarlar. Ayrıca vasküler permeabilite ve lökosit kemotaksisini uyararak enflamatuvar sürece katkıda bulunur.

Alternatif, klasik yol ya da lektin yolu ile aktive olan C3 ve C5 proteini aktive olarak C3a, C3b, C5a ve C5b ye dönüşür. C3a ve C5a akut enflamasyondaki kompleman kökenli faktörlerdir. Enflamasyondaki başlıca etkileri mast hücrelerini uyararak histamin salınımı yolu ile vazodilatasyon yapmak ve vasküler permeabiliteyi artırmaktır. C5a ayrıca nötrofil ve makrofajlarda AA metabolizmasının lipooksijenaz yolunu aktive ederek enflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasını artırır.

C5a ve daha az miktarda C3a ve C4a lökosit adezyonu, nötrofil, monosit, eozinofil ve bazofiller için ise kemotaksisi arttırıcı etkisi vardır (42, 46).

Pıhtılaşma ve kinin sistemleri de akut enflamasyonda çeşitli rollere sahiptir. İntrensek koagülasyon sisteminde faktör 7 olarak da bilinen ve normalde inaktif olan Hageman faktör aktif hale geçtiğinde enflamatuvar yanıtı katkıda bulunan dört sistemi harekete geçirir;

1. Vasküler etkili vazodilatatif kininleri üreten kinin sistemi,
2. Tümü enflamatuvar özelliklere sahip olan trombin, fibrinopeptidler ve faktör 10'un aktivasyonunun yol açan pıhtılaşma sistemi
3. Plazma üretilmesine ve trombin inaktivasyonuna neden olan fibrinolitik sistem
4. Anafilatoksinleri üreten kompleman sistemi (42).

Enflamatuvar mediyatörlerin farklı reaksiyonlardaki rolleri Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. Enflamatuvar mediyatörlerin farklı reaksiyonlardaki rolü

Enflamasyon Bileşeni	Mediyatörler
Vazodilatasyon	Prostaglandinler, Nitrik Oksit, Histamin
Damar Geçirgenliğinde Artma	Histamin ve Serotonin, C3a ve C5a
Bradikinin	Lökotrien C4, D4, E4, Trombosit aktive edici faktör, P maddesi
Lökosit Aktivasyonu ve Kemotaksis	TNF, İL-1, Kemokinler, C3a, C5a, Lökotrien B4, Bakteri Ürünleri
Ateş	İL-1, TNF, Prostaglandinler
Ağrı	Prostaglandinler, Bradikinin
Doku Hasarı	Lökositlerdeki lizozom enzimleri, Reaktif oksijen türevleri, Nitrik oksit

*42 no lu kaynaktan uyarlanmıştır.

IL; interleukin, TNF; Tümör nekroz faktörü

2.5. Non Steroid Anti-Enflamatuvar İlaçlar

Klasik non steroid anti enflamatuvar ilaçlar ağrı, ateş, kızarıklık ve ödemin giderilmesinde etkili oldukları için enflamasyonla seyreden hastalıkların tedavisinde en fazla tercih edilen ilaçlardır (54). Günümüzde enflamasyon, ağrı ve ateşte NSAİ ilaçların öncelikli kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri de narkotik analjezikler gibi bağımlılık yapmaması ve etkilerine karşı tolerans gelişmemesidir (55). Analjezik etki dışında antipiretik etkileri bulunan NSAİ'ler ateşli durumlarda vücut sıcaklığını düşürürler, fakat normal vücut ısını değiştirmezler. Romatizmal eklem iltihapları ve kemik eklem iltihaplarının tedavileri NSAİ'lerin temel klinik uygulamaları arasında bulunur (56).

NSAİ'lerin diğer kullanım alanları, prostaglandin biyogenezini önleme kapasitelerine bağlıdır. Prostaglandinler duktus arteriosusun gelişiminde de yer edinmektedir. Bu nedenle indometazin ve benzeri ajanlar yeni doğanlarda kapanmamış duktusları kapatmak için kullanılmaktadır. Diğer yandan non-selektif NSAİ'lerin hamile kadınlarda kullanımı, intrauterin duktus arteriosusun prematüre kontraksiyonuna sebep olabilir. Fetal hayatta COX-1 ve COX-2 tarafından sentezlenen prostaglandinlerin (vazodilatör PG), duktus arteriosusun açıklığını sürdürülmesinde etkili olduğu gözlenmektedir. Diğer bazı kullanım alanları ise dismenore tedavisi, sistemik mastoidoz tedavisi ve kolon kanserinde protektif etkisidir (56).

2.5.1. Etki Mekanizmaları

NSAİ ilaçların anti-enflamatuvar etki mekanizmaları COX ve lipooksijenaz (LO) ürünlerinin sentezinin inhibisyonu, toksik oksijen radikallerinin ve lizozomal enzim salınımının engellenmesi, nötrofil agregasyonu, adezyon ve kemotaksinin önlenmesi ve oksidatif fosforilizasyonun kenetsizlenmesi şeklinde sıralanabilir. NSAİ'ler siklooksijenaz yolunu inhibe ederek prostaglandin sentezini önlerler. Ancak lipooksijenaz yolunu inhibe edemezler ve lökotrien oluşumunu önleyemezler. Aspirin kovalent bağ yaparak, hem COX-1 hem de COX-2 enzim sentezini inhibe eder (55).

Enflamasyonda aktive olan makrofaj ve fibroblastlardan İL-1'den başka sitokinler de salınmaktadır. İL-6, TNF ve İNF'da enflamasyonda rol oynarlar. NSAİ ilaçların İL-1 ve İL-6

yapımını ve salınımını inhibe ettikleri çeşitli araştırmalarda gösterilmektedir. Enflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal dokuda ve eklem yüzeylerinde polimorfonükleer lökosit sayısı artmakta ve bunlardan diğer mediyatörler gibi proteolitik enzimler de salınmaktadır. Bu enzimler enflamasyonun başlamasına ve aynı zamanda periartiküler kemiğin yıkımına sebep olmaktadır. NSAİ ilaçlar lizozomal membran stabilizasyonu sağlayıp lizozomal enzimlerin salınımını önleyerek de etkilerini göstermektedirler. Aynı zamanda cAMP düzeyini artırarak da lizozomal enzim salınımını inhibe ettikleri ileri sürülmektedir (57). NSAİ ilaçların antienflamatuvar etkilerine katkıda bulunan diğer özellikleri ise sırayla; nötrofil agregasyonu, adezyon ve kemotaksinin önlenmesi, NADPH oksidaz ve fosfolipaz C aktivitesinin antagonizma edilmesi olarak sayılabilir.(58)

2.5.2. Sınıflandırılması

1. Salisilatlar: (Asetil salisilik asit, salisilik asit, metil salisilat ve sodyum salisilat, ve diflunisal)
2. Paraaminofenol türevleri: Asetaminofen, fenasetin
3. Pirazolon türevi ilaçlar: Aminopirin, propifenazon, metamizol sodyum, fenilbutazon, oksifenbutazon
4. Profenler (Fenilpropionik asit türevleri): İbuprofen, naproksen, fenbufen, tiaprofenik asit, ketoprofen, fenoprofen kalsiyum, flurbiprofen, indoprofen, zomepirak.
5. Fenilasetik asit türevleri: Nabumeton, fenklofenak, diklofenak sodyum,
6. İndol asetik asit türevleri: İndometazin, asemetazin, tolmetin, ketorolak, sulindak
7. Fenamik asit türevleri: Mefenamik asit, flufenamik asit, etofenamat
8. Oksikamlar ve diğer ilaçlar: Piroksikam, tenoksikam, prokuazon, azapropazon, metotrimoprazin
9. COX-2 inhibitörleri: Meloksikam, nimesülid, etodolak, selekoksib, rofekoksib (59).

2.5.2.a. Diklofenak Sodyum

Analjezik, antienflamatuvar ve antipiretik etkili bir fenilasetik asid türevidir. Romatoid artrite karşı aspirin ve indometasin kadar ve osteoartrite karşıda indometasin derecesinde etkili olduğu bulunmuştur. Bu gruptaki diğer ilaçlar gibi, mide ve duodenum mukozasını bozucu etkisi diğer NSAİE'lerin çoğuna göre daha zayıftır. Mide-barsak kanalından tam olarak ve çabuk absorbe edilir. Maksimum plazma düzeyine 1,5-2 saatte erişir. Plazma proteinlerine fazla bağlanır. Karaciğerde esas olarak hidroksillenmek ve konjugasyon suretiyle inaktive edilir. Böbreklerden ve kısmen karaciğerden ıtrah edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 1,2-1,8 saat kadardır (55).Erişkinlerde başlangıçta günde 3 kez 25-50 mg dozunda ağızdan verilir; sonra bu miktar azaltılır. Yavaş salan tablet şeklinde günde 1 kez 75-100 mg verilir. Diklofenak sodyum i.m. olarak 75 mg dozunda günde 1-2 kez uygulanabilir. (en fazla 2 gün). Hastane ortamında i.v. olarak da uygulanabilir. Çocuklarda günlük dozu 1-3 mg/kg kadardır (55). Hastaların tedaviyi bırakmasını gerektirecek en sık yan etki gastrointestinal sistem yan etkileridir. Nadir olarak transaminazlarda yükselme yapar. Bu nedenle uzun süreli tedavilerde ilk haftalarda transaminaz takibi yapılmalıdır. Gebelik ve emzirmede önerilmez (56).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Hastalar

Ocak 2013- Aralık 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğine yatan ve yumuşak doku enfeksiyonu tanısı alan hastalar belirlendi. Bu hastalardan kas içi NSAİİ ilaç enjeksiyonu hikayesi olanların dosya bilgilerine ulaşıldı. Hasta ile ilgili alt hastalık, enjeksiyon hikayesi, enfeksiyon bilgileri, laboratuvar bulguları, klinik seyir, tedavi, cerrahi girişim ve prognoz bilgileri kaydedildi.

3.2. Deneysel Çalışma

Çalışma Mart 2014 ile Ekim 2015 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (karar no:13/127).

3.3. Deney Hayvanı

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden sağlanan 8-10 haftalık Balb-c türü beyaz, dişi fareler kullanıldı. Deneye alınacak fareler ayrı kafeslerde tutularak, düzenli ad libitum suya ve yeme ulaşması sağlandı. Deneysel çalışma da aynı merkezde yapıldı.

3.4. Bakteriyel Tür

Özellikle invaziv enfeksiyon gelişiminden sorumlu *Streptococcus pyogenes* alt tip M3 (ATCC BAA-595/MGAS 315) (Sigma Aldrich, Almanya) temin edildi.

3.5. Bakterinin Hazırlanması

Sigma laboratuvarlarından temin edilen bakteri izolatu Brain-Heart infüzyon (BHI) brota pasaj yapıldıktan sonra %5 koyun kanlı agar ekim yapıldı. Hemolizli tek kolonilerden yeniden

pasaj yapıldı. Üreyen koloniler gram boyası ile boyanarak bakteri morfolojisi incelendi ve kontaminasyon açısından kontrol edildi. İkinci pasajdan nefelometre ile 1 McFarland (McF) ($2-4 \times 10^8$ (koloni oluşturan birim) kob/ml) süspansiyon hazırlandı.

3.6. İlaçlar

Çalışmada kullanılacak NSAİD diklofenak sodyum (Voltaren 75 mg, Novartis, Turkey) 20 mg/kg dozda, antienflamatuvar etki gösterecek kan düzeyini sağlayacak (0,4mg/L) konsantrasyonda planlandı (60). Servikal dislokasyon öncesi anestezi olarak Ketamin hidroklorür (Ketalar 500mg flakon, Pfizer) 150mg/kg kullanıldı.

3.7. In vitro çalışma (kill-time)

Diklofenak sodyumun bakteri üzerine etkisini test etmek için broth makrodilüsyon yöntemi kullanıldı. BHI agara 5×10^5 kob/ml bakteri olacak şekilde GAS bakteri süspansiyonu hazırlandı. Diklofenak sodyumdan 0,4 mg/l ve 0,05mg/l arasındaki konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlandı ve *S. pyogenes* alt tip 3 ile CLSI M07-A9 rehberindeki işlem sırasına göre çalışıldı (61). Eşit bölünen bakteri süspansiyonlarından çalışma grubuna diklofenak sodyum, kontrol grubuna eşit miktarda SF eklendi. Her iki grupta $1/10^2$, $1/10^4$, $1/10^6$, $1/10^7$ olacak şekilde dilüsyonlar yapıldı. Her bir solüsyondan 0,1ml alınarak kanlı besi yerine ekim yapıldı. Ekimin 2, 4, 6, 8 ve 24. saatinde benzer şekilde tekrar pasajlar yapıldı. BHI agarda hazırlanan bakteri süspansiyonu 34-36 °C de benmaride 140 rpm/dk'da çalışma boyunca inkübe edildi. Koloni sayımı 24 saat inkübasyon sonunda yapıldı.

3.8. Enfeksiyon Dozunun (inokulum dozu) Belirlenmesi

27 ve 29 gram ağırlığında dişi farelerden birincisine 10^6 kob/0,1 ml, ikincisine 10^4 kob/0,1 ml bakteri enjeksiyonu yapıldı. Çalışmanın 84. saatinde denekler sakrifiye edilerek kalp ve akciğer doku kültürleri yapıldı. Enjeksiyon yapılan uyluk kasları histopatolojik olarak incelendi. 10^6 kob/0,1 ml bakteri enjeksiyonu yapılan farede akciğer dokusunda üreme oldu ve histopatolojik incelemede nötrofil infiltrasyonunun daha belirgin olduğu görüldü. Bu nedenle

çalışmanın 10^6 kob/0,1 ml bakteri dozu ile yapılmasına karar verildi. Çalışmaya alınacak fareler 5 gruba ayrıldı, grupların özellikleri ve çalışma düzeni Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Çalışma için planlanan gruplar ve saatlere göre yapılan enjeksiyonlar

Günler	- 48. saat	-24. saat	0	24. saat	48. saat	72 .saat	96 .saat
Grup 1 (n=10)	DS	DS	DS +GASM3	SF	SF	SF	Sakrifikasyon
Grup 2 (n=10)	SF	SF	DS+ GASM3	DS	DS	DS	Sakrifikasyon
Grup 3 (n=10)	SF	SF	DS	DS	DS	SF	Sakrifikasyon
Grup 4 (n=10)	SF	SF	GASM3	SF	SF	SF	Sakrifikasyon
Grup 5 (n=10)	SF	SF	SF	SF	SF	SF	Sakrifikasyon

DS; diklofenak sodyum, SF; serum fizyolojik, GASM3; Grup A Streptokok M3 suşu

-48. saat: Birinci gruba diklofenak sodyum 0,1ml içinde 20mg/kg üçüncü, dördüncü ve beşinci gruba 0,1 ml serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

-24. saat: Birinci gruba diklofenak sodyum 0,1ml içinde 20mg/kg üçüncü, dördüncü ve beşinci gruba 0,1 ml serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

0. saat: Birinci ve ikinci gruba 20 mg/kg diklofenak sodyum/0,05 ml+ GAS 10^6 kob/0,05 ml aynı enjektör içinde enjeksiyondan hemen önce hazırlanarak enjekte edildi. Üçüncü gruba 20 mg/kg diklofenak sodyum/0,1 ml, dördüncü gruba 10^6 kob/0,1ml, beşinci gruba 0,1 ml SF enjeksiyonu yapıldı.

+24. saat: İkinci ve üçüncü gruba diklofenak sodyum, dördüncü gruba SF enjeksiyonu yapıldı.

+48. saat: İkinci ve üçüncü gruba diklofenak sodyum; birinci, dördüncü ve beşinci gruba SF enjeksiyonu yapıldı.

+72. saat: Hiçbir gruba enjeksiyon yapılmadı

+96. saat: Fareler ketamin ile anesteziye edildikten sonra servikal dislokasyon ile ötenaziye edildi ve 25G iğne ile intrakardiyak kan alındı. Sepsis gelişimini değerlendirmek üzere insizyon sonrası akciğer ve kalp dokusundan alınan örneklerden %5 kanlı Mueller-Hinton agara ekim yapıldı. Enjeksiyon yapılan uyluk kası diseke edildi ve gözlenebilen lezyon mevcut ise çapı ölçülerek kaydedildi. Kas dokusu lezyondan ikiye bölünerek mikrobiyolojik ve histopatolojik çalışma için ayrıldı.

3.9. Mikrobiyolojik Çalışma

Bacağın çıkarılması sonrasında doku, 1ml SF içinde homojenize edildi. Onar kat dilüsyonlar yapılarak %5 kanlı Mueller-Hinton agara ekim yapıldı. Bakteri kolonileri 37 °C de 20-24 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı. Kantitatif kültür sonuçları ise kob/gr olarak kaydedildi.

3.10. Histolojik Çalışma

Alınan kas dokusu %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonu içinde 24 saat tespit edildi. Kas dokuları en geniş yüzeyi görülecek şekilde uzun ekseninde ikiye bölünerek rutin doku takip işlemine alındı ve parafinde bloklandı. Hazırlanan 5 mikronluk kesitler Hematoksilen-Eozin boyası ile boyandı. Dokuların histopatolojik incelemesini yapan patolog, gruplar hakkında bilgilendirilmedi. Çizgili kas dokusunda oluşan değişiklikler aşağıdaki özelliklere göre 0 ile 4 arasında puanlandırıldı. Kas dokularındaki enflamasyon derecelendirme skoru Tablo 9' da gösterilmektedir.

Tablo 9.Histopatolojik olarak kas dokusunda enflamasyon derecelendirme skoru

Derecelendirme skoru	Histopatolojik bulgu
0	Normal çizgili kas dokusu
1	Hafif ödem ve seyrek enflamatuvar hücre gösteren çizgili kas dokusu
2	Belirgin enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yer yer septal infiltrasyon gösteren çizgili kas dokusu
3	Yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu
4	Yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu, kas tipi multinükleer dev hücre oluşumu ve nekrotik değişiklikler gösteren çizgili kas dokusu

3.11. Sitokin Çalışması

Alınan kan EDTA'lı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 1500 devir/dk'da 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazma, çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı. Serum İL-6 ve TNF-alfa düzeyleri Enzyme-linked immunosorbent assay (ELİZA) yöntemi (Boster, Mouse TNF alpha PicoKine™ ELISA Kit EK0527, Mouse IL-6 PicoKine™ ELISA Kit EK0411) ile ticari kit prosedürüne göre Histoloji laboratuvarında çalışıldı. -20 0 C'de saklanan serum örnekleri ve kit içinde bulunan sample dilüent buffer'dan eşit miktarda (100 mikrolitre) alındı. Kit prosedürüne göre verilen konsantrasyonda standart solusyonlar hazırlandı. Kit kuyucuklarına serum örneği ve standart solusyon önerilen miktarda konularak 90 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası prosedürde önerilen sayıda yıkama işlemi yapıldı. Otomatik yıkama cihazında (ayto-RT 3100) sonrasında sırası ile Tris-buffered saline (TBS), Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC), TMP ve stop solusyonları ile prosedür süresince inkübe edildi. Stop solusyonu eklendikten sonra 30 dk içinde 450 nm absorbanslı okuyucuda (Tecan, Sunrise™) okunarak elde edilen değerler pikogram/mililitre (pg/ml) olarak kaydedildi.

3.12. İstatistiksel Değerlendirme

Farelerin gruplara göre kas dokusu kantitatif kültürlerinden elde edilen bakteri sayıları, kan İL-6, TNF-alfa düzeyleri ve doku histolojik sınıflandırmaları karşılaştırıldı. Üremelerde en düşük koloni sayısı 20kob/ml olarak alındı. Kas dokusunda kantitatif kültür sonuçları ve kan İL-6, TNF-alfa düzeyleri gruplarda ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Kantitatif kültür sonuçları gruplar arasındaki fark ($\Delta \log$ = müdahale grubu ortalaması – kontrol grubu ortalaması) hesaplandı. Çalışma ve kontrol grupları arasında fark yok ise işlem etkisiz olarak değerlendirildi. Bakteri koloni sayıları logaritmik olarak düzenlendikten sonra gruplar arasındaki karşılaştırmalar ANOVA ile yapılarak, Kruskal-Wallis One Way Analizi'ne göre anlamlı fark olan gruplarda gruplar arası karşılaştırmada Dunn's Methodu kullanıldı. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hastalar

Ocak 2013- Aralık 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi'nde kas içi enjeksiyon sonrası yumuşak doku enfeksiyonu gelişen yedi hasta bilgisine ulaşıldı. Takip edilen hastaların klinik ve laboratuvar bulguları ve prognozu ile ilgili bilgiler Tablo 10 ve 11' de özetlendi. Hastalar ile ilgili bilgiler kısaca aşağıda verilmektedir;

Tablo 10. Takip edilen hastaların klinik özellikleri ve prognozu

Hastaların Özellikleri		N / Total
Cinsiyet	Bayan/Erkek	3 / 4
Median yaş (yıl)		50
Alt hastalık varlığı		4 / 7
Non-steroid antienflamatuvar	Diklofenak	6 / 7
	Etofenamat	1 / 7
Enfeksiyon bölgesi	Gluteal gölge	4 / 7
	Bilateal gluteal bölge	1 / 7
	Alt ekstremit	2 / 7
Enfeksiyonun şiddeti	Lokal enfeksiyon	3 / 7
	Ağır sepsis	3 / 7
	Septik şok	1 / 7
Tedavi	Antibiyotik ve destek tedavisi	7 / 7
	Debridman	6 / 7
Prognoz	Yaşayan	6 / 7
	Ölen	1 / 7

Hasta 1.

Gelişimsel kalça displazisi tanısı ile takip edilen 43 yaşında bayan hasta kendi kendisine im Flexo (tenoksikam) enjeksiyonundan 10 gün sonra sağ gluteal bölgede şiddetli ağrı ve kızarıklık şikâyeti ile hastaneye başvurmuş. İki gün dış merkezde oral antibiyotik kullanan hastanın kliniğinde bozulma olması nedeniyle acil servise sevk edildi. Acil serviste ateşi 38,6 °C, şuuru konfüze ve uykuya meyilli idi. Sağ gluteal bölgeden başlayıp ayağa kadar uzanan palpasyonla krepitasyon hissedilen hiperemik alan mevcuttu. Selülit bölgesinden aspirasyon yapıldı. Örneğin gram boyamasında nadir polimorf nüveli lökosit (PNL), gram negatif basil ve gram pozitif kok izlendi. Aspirasyon örneğinin kültüründe üreme olmadı. Acil debridman ve

fasyatomi sonrası yoğun bakımda vazopressör desteği ile takip edildi. Acil servise başvurusunun yedinci gününde ekstübe edildi ve 17. gününde taburcu edildi.

Hasta 2.

Çölyak hastalığı tanısı ile takip edilen 43 yaşında bayan hastaya bel ağrısı şikâyeti ile dış merkezde 12 gün im diklofenak sodyum enjeksiyonu yapılmış. Enjeksiyon sonrası sağ kalçada ağrı şikâyeti ile acil servise başvurdu. Başvuru sırasında ateşi 38,8 °C idi. Sağ gluteal bölgede 15x10cm genişliğinde kızarıklık, hassasiyet ve ısı artışı olan alan mevcuttu. Ultrasonografik (US) görüntülemeye abse izlenmedi. Ampirik olarak parenteral ampicilin-sulbaktam (SAM) tedavisi başlandı. Gluteal bölgede pürülan akıntılı büllöz lezyon gelişti ve sellülit tablosu ilerledi. Büllöz lezyondan aspirasyon yapıldı. Aspirasyon örneğinin gramında bol PNL, bol gram pozitif kok izlendi. Kontrol ultrasonografik incelemede sağ gluteal bölgede cilt altı yağlı dokusu artmış ve yağ planları arasında hipoekoik çizgilenmeler izlendi. Hastanın antibiyotik tedavisi yeniden düzenlendi. Acil fasyatomi önerildi. Hasta fasyotomiye reddederek tedavinin 5. gününde kendi isteği ile taburcu oldu.

Hasta 3.

Bel ağrısı şikâyeti ile her iki gluteal bölgeye im diklofenak sodyum enjeksiyonu yaptıran 52 yaşında bayan hasta enjeksiyondan bir hafta sonra sol gluteal bölgede ağrı şikâyeti ile acil servise başvurdu. Başvuru anında ateşi 36,8 °C idi. Sağ gluteal bölgede enjeksiyon skarı mevcuttu. Sol gluteal bölgede 8x10cm çapında nekroz içeren kızarık ve ödemli bölge izlendi. Ampirik olarak SAM tedavisi başlanarak acil fasyotomi ve debridman yapıldı. Operasyon sırasında nekrotik yağ dokusunun, zeminde kemik ve kıkırdak gibi kalsifiye olduğu görüldü. Perioperatif alınan biyopsi sonucunda kronik aktif ülseratif iltihabi olay ve yağ nekrozu saptandı. Vital bulguları stabil olan hasta başvurusunun 4. günü taburcu edildi.

Hasta 4.

Doğumsal kalça çıkığı tanısı olan 49 yaşında erkek hastaya bacak ağrısı şikâyeti ile dış merkezde üç gün diklofenak sordum enjeksiyonu yapılmış. Üçüncü günün sonunda genel durum bozukluğu, oral alım bozukluğu, şuur bulanıklığı olması üzerine hastaneye başvurdu. Başvuruda ateş: 38,6 °C, nabız: 80/dakika, arteriyel kan basıncı: 96/ 45 mm/Hg, genel durum

kötü, şuuru konfüze, uykuya meyilli idi. Sol gluteal bölgeden skrotal bölgeyi de içine alarak ayağa kadar uzanan fasiit bulgusu mevcuttu. Ampirik olarak seftriakson ve metronidazol tedavisi başlandı. Yoğun bakım ünitesinde entübe edilip sürekli hemodiyalize alındı. Başvurunun ikinci gününde fasyatomi yapıldı. Alınan örnekten yapılan gram boyamada PNL ve mikroorganizma izlenmedi ve yara kültüründe üreme olmadı. Biyopsi sonucu kronik aktif iltihabi olay olarak geldi. On iki gün mekanik ventilatörde takip edilen ve nozokomiyal etkenlerle enfekte olan hasta başvurunun 12. günü bakteriyemiye bağlı sepsis nedeniyle exitus oldu.

Hasta 5

İş yerinde dışarıdan tavuk yeme öyküsü olan 44 yaşında erkek hasta karın ağrısı, yan ağrısı, bulantı şikayeti ile dış merkeze başvurmuş. Renal kolik ön tanısı ile 2 gün diklofenak sodyum ve hyosin-N-butil bromür ampul enjeksiyonu yapılan hasta genel durumunda bozulma, karın ağrısında şiddetlenme, enjeksiyon yerlerinde ağrı şikayeti ile dış merkeze başvurusunda karaciğer yetmezliği ön tanısı ve etyolojisi araştırılması amacı ile hastanemize sevk edildi. Başvuru sırasında ateş 38,6 °C nabız: 96/dk ve hipotansifti. Bilinç açık, ancak uykuya meyilli idi. Cilt ve skleralar ikterik, batında defans ve hassasiyet mevcuttu. Bilateral gluteal enjeksiyon yerinde kızarıklık, sağ gluteal bölgede krepitasyon mevcuttu. Yüzeysel US'de sağ kalçada cilt, cilt altı yağlı doku içinde gölgelenme veren gaz dansitesi izlendi. Dokudan aspirasyon yapıldı. Gram boyamada nadir PNL, gram negatif basil, gram pozitif basil izlendi. Ampisilin-sulbaktam tedavisi başlandı. Acil debridman- fasyatomi, eksploratif batın operasyonuna alındı. Karın içerisinde yeşil renkli pürülan mayi mevcuttu. Operasyon sonrası yoğun bakım ünitesinde takip edilen hasta üçüncü gün servise alındı. Aspirasyon materyali ve perioperatif alınan kültürde Salmonella Typhii üremesi oldu ve antibiyotik tedavisi siprofloksasine geçildi. Başvurunun sekizinci gününde kontrol yüzeysel ve batın USG'de abse izlenmeyen hasta başvurusunun 14. gününde taburcu edildi.

Hasta 6.

Bilinen kronik bir hastalığı olmayan 62 yaşında erkek hasta diz ağrısı şikayeti ile altı gün önce im diklofenak sodyum enjeksiyonu sonrası sağ kalçada ağrı ve ateş şikayeti ile başvurdu. Acil serviste yapılan fizik muayenesinde ateş 38,6 °C nabız: 102/dk ölçüldü. Sağ gluteal bölgede sellülit bulgusu izlenen ve palpasyonda fluktuasyon tespit edilen hastanın laboratuvar incelemesinde kreatinin yüksekliği, lökositoz ve aminotransferaz yüksekliği olması nedeniyle ağır sepsis kabul edildi. Acil fasyotomi ve debridman yapılan hastanın perioeratif doku örneklemeğinde gram boyamada nadir PNL, nadir gram negatif basil ve gram pozitif kok görüldü. Ampirik olarak başlanan Ciprofloksasin- Klindamisin tedavisine devam edildi. Postoperatif iki gün yoğunbakım ünitesinde takip edildi. Perioperatif kültürde anaerob gram pozitif zincirli kok üremesi olan hastanın antibiyotik tedavisi 10 güne tamamlanarak taburcu edildi.

Hasta 7.

Diyabetes mellitus tanısı ile takip edilen 63 yaşında bayan hasta, eklem ağrısı şikayeti ile im diklofenak sodyum enjeksiyonu sonrası sol kalçada ağrı şikayeti ile acil servise başvurdu. Başvuru anında yapılan fizik muayenede vital bulguları stabldi. Sol gluteal bölgede 15x20 cm genişliğinde sellülit ile uyumlu lezyon izlendi. Gluteal abse ön tanısı ile yapılan yüzeysel USG' de abse formasyonu izlenmedi. Laboratuvar incelemesinde lökositoz mevcuttu. Ampirik olarak SAM tedavisi başlanarak servise kabul edildi. Antibiyotik tedavisinin beşinci gününde sol gluteal bölgede fluktuasyon tespit edilerek abse drenajı yapıldı. Perioperatif gram boyamasında mikroorganizma izlenmeyen ve kültürde üreme olmayan hastanın ampirik tedavisine devam edildi. Antibiyotik tedavisi tamamlanan hasta hastaneye başvurusundan 20 gün sonra taburcu edildi.

Tablo 11. Hastaların demografik özellikleri, laboratuvar bulguları ve tedavi yanıtı

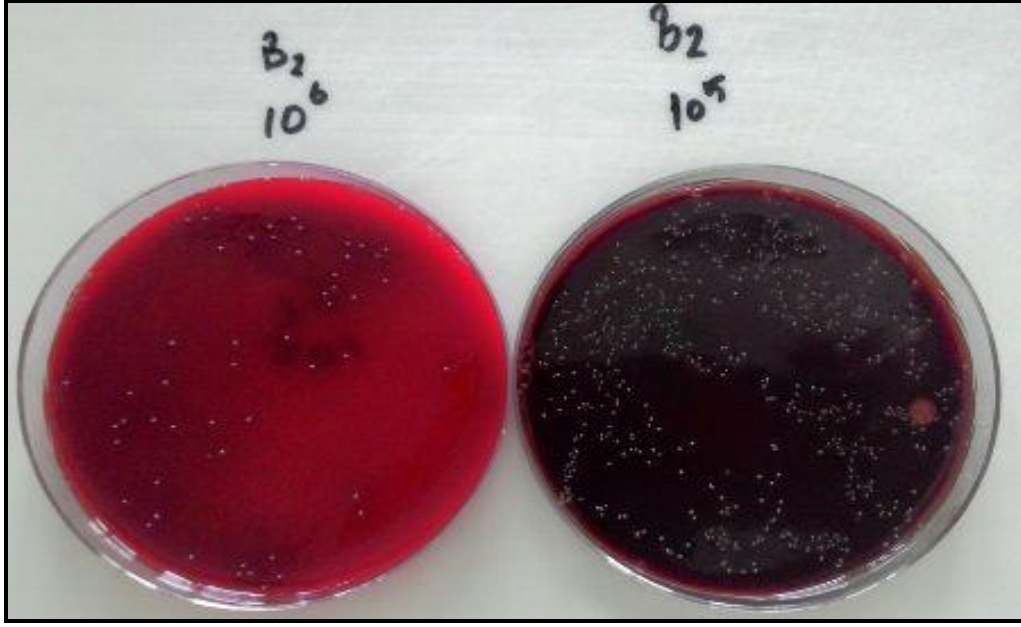
Hasta numarası	Cinsiyet /Yaş	Alt hastalık	Enjeksiyon sonrası (gün)	Kültür	Beyaz küre (x109/L)	Alanin amino transferaz (U/L)	Kreatinin (mg/dL)	LRINEC	Tedavi sonucu
1	K/43	GKD	10	Negatif	11200	58	1,3	Orta	İyileşti
2	E/43	Çölyak hastalığı	7	MSSA	17560	41	0,8	Yüksek	Başka hastaneye sevk
3	K/52	Gut, DM	15	Yok	9590	26	0,7	Hafif	İyileşti
4	E/49	GKD	3	Negatif	4900	76	4,8	Yüksek	Eksitus
5	E/44	DM	3	<i>S.typhii</i>	7750	117	3,9	Yüksek	İyileşti
6	E/62	-	6	Anaerop gram pozitif kok	18660	56	1,67	Yüksek	İyileşti
7	K/63	DM.HT	2	Negatif	13830	31	0,86	Hafif	İyileşti

*K; kadın, E; erkek, LRINEC; laboratory risk indicator for necrotizing fasciitis, GKD; gelişimsel kalça displazisi, DM; diyabets mellitus, HT; hipertansiyon MSSA: metisilin sensitif *Staphylococcus aureus*

4.2. İn Vitro Çalışma

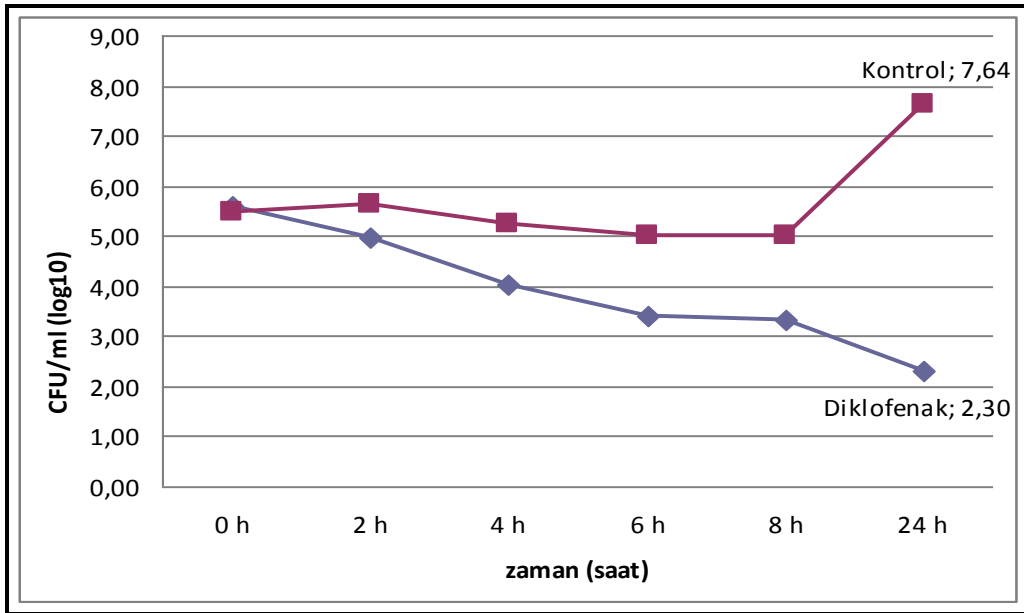
4.2.1. İn vitro Çalışma (kill-time) Sonuçları

Burada Grup A streptokok M3 türü kullanılarak 40 mg/L diklofenak sodyum (DS) (yüksek konsantrasyon) ile kill-time çalışması yapıldı. Çalışmanın 2, 4, 6, 8 ve 24. saat sonunda prosedüre uygun olarak yapılan dilüsyonlar sonrasında kanlı besiyerine ekimler yapıldı. İnkübasyondan 24 saat sonra üreyen koloniler sayıldı (Şekil 5).



Şekil 5. İn-vitro çalışmada konsantrasyona göre kanlı besiyerinde GAS kolonilerinin görünümü

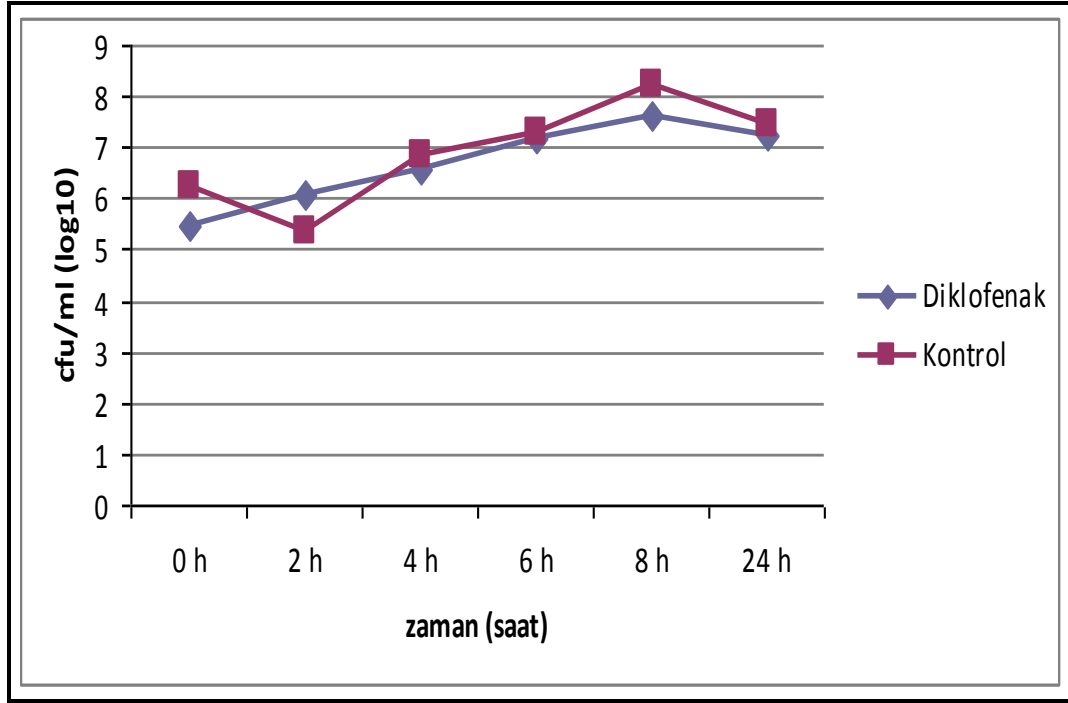
Diklofenak ve kontrol gruplarının koloni sayılarının logaritmik sonuçları Şekil 6’da gösterilmiştir. Buna göre diklofenak eklenen grupta zaman içinde üreyen koloni sayısında azalma izlenirken kontrol grubunda artış izlendi. Yüksek konsantrasyonda diklofenak sodyumun in vitro ortamda bakteri üremesini inhibe ettiği ve bu inhibisyonun 24 saat sonra daha da arttığı izlendi.



Şekil 6. Yüksek konsantrasyonda diklofenak sodyum ve kontrol grubunda zamana göre üreyen koloni sayıları

Aynı çalışmanın 0,4 mg/L konsantrasyonda (düşük konsantrasyon) DS kullanılarak yapılan kill-time çalışmasında üreyen mikroorganizma ve koloni sayıları Şekil 7’de gösterilmektedir.

Buna göre her iki grupta da zaman içinde üreyen mikroorganizma koloni sayılarında artış izlendi. Zaman içinde üreyen mikroorganizma sayısında DS ile bir baskılanma izlenmedi.



Şekil 7. Düşük konsantrasyonda diklofenak sodyum ve kontrol grubunda zamana göre üreyen koloni sayıları

4.3 İn vivo Çalışma

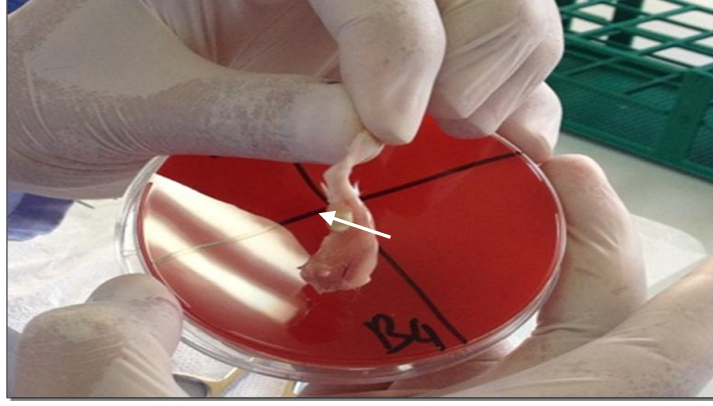
4.3.1 Deneyin Yapılışı

Deney hayvanları grup 1 (diklofenak+GASM3), grup 2 (GASM3+ diklofenak), grup 3 (diklofenak), grup 4 (GASM3) ve grup 5 (sadece SF) olarak ayrıldı. Çalışma düzeni Tablo 8’de özetlenmiştir.

Histopatolojik çalışma

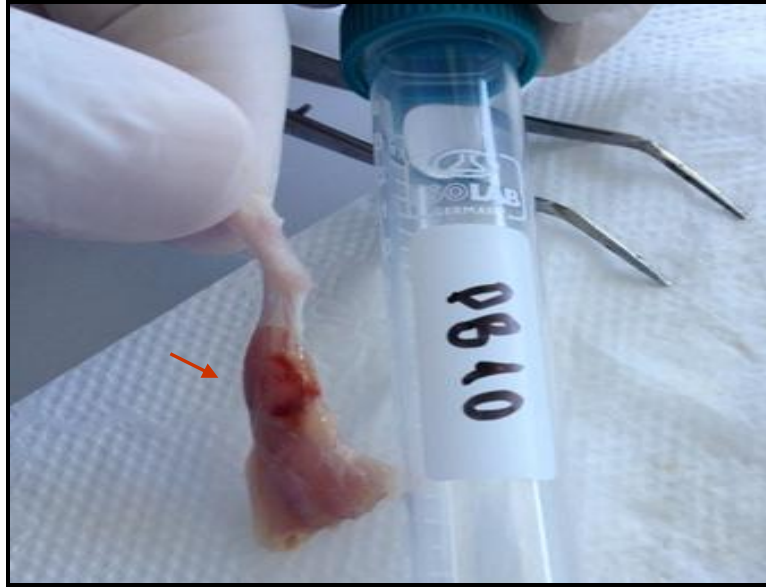
Sakrifikasyon yapıldıktan sonra diseke edilen sağ uyluk kas dokusu, enjeksiyon yapılan bölgeyi ortadan ayıracak şekilde histopatolojik inceleme için %10 formol içeren tüplere alındı.

Özellikle bakteri enjeksiyonu yapılan grupta makroskopik olarak da abse görünümü izlendi (Şekil 8).



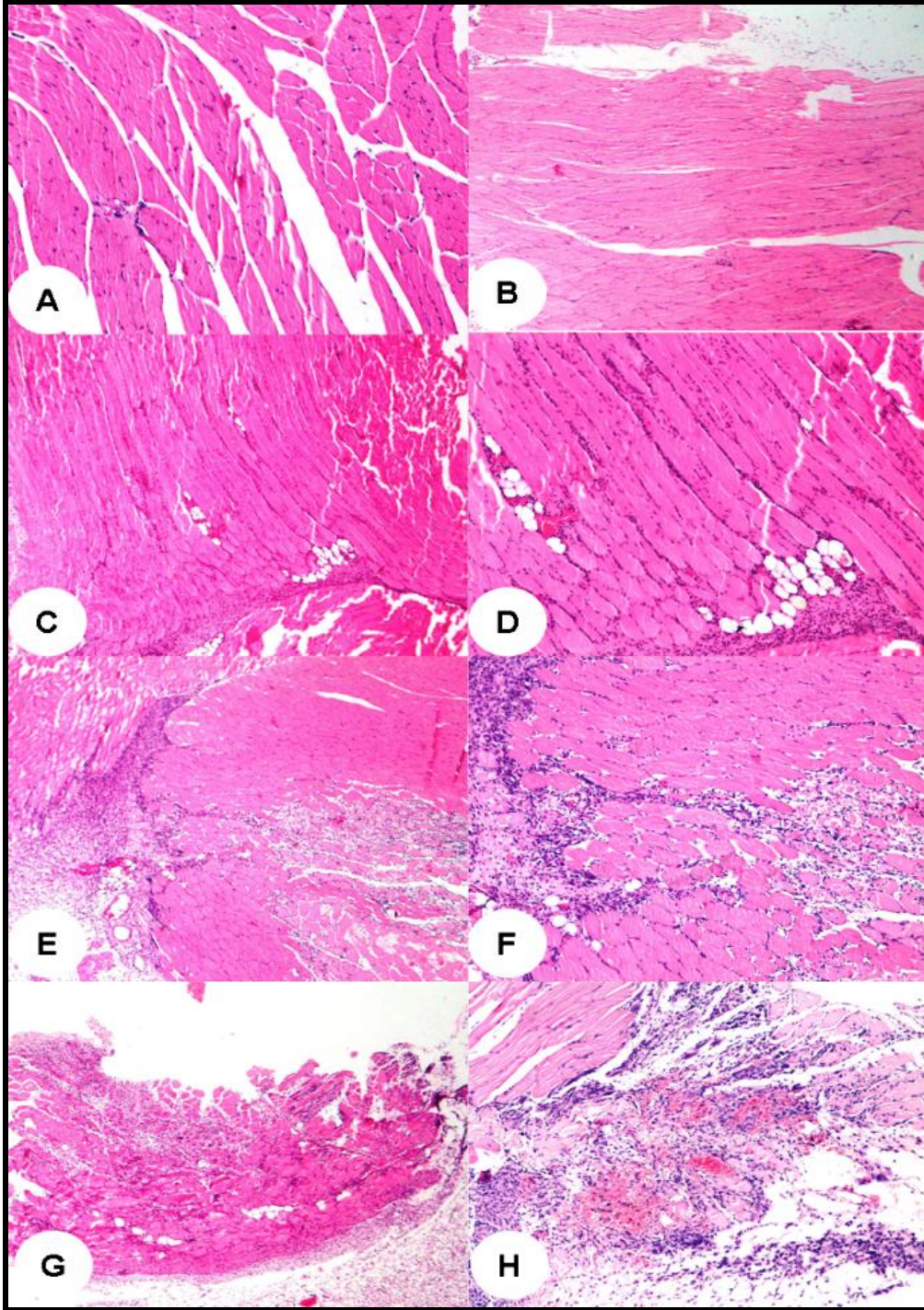
Şekil 8. Diseke edilen kas dokusunda absenin makroskopik görünümü

Diklofenak enjeksiyonu yapılan grupta ise diseksiyon sırasında makroskopik olarak hemorajiler görüldü (Şekil 9).



Şekil 9. Diseksiyon sonrasında enjeksiyon bölgesinde makroskopik olarak hemoraji görünümü

Başlangıçta Seal Kingston sınıflamasına göre değerlendirilmesi planlanan doku örneklerinin, kas dokusu örneği olmasından dolayı enflamasyonun şiddeti ve nekroz varlığına göre derecelendirme yapılmıştır. Buna göre normal çizgili kas dokusu sıfır olarak değerlendirilmiş ayrıca yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu, kas tipi multinükleer dev hücre oluşumu ve nekrotik değişiklikler gösteren çizgili kas dokusu ise 4 olarak değerlendirilmiştir. Bu sınıflamadaki derecelendirmeler Tablo 9'da ve mikroskopik görüntüleri ise Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. Histopatolojik inceleme sonuçlarından görüntüler.

Normal çizgili kas dokusu, değerlendirme skoru: 0 (A: H-E, x100); hafif ödem ve seyrek enflamatuar hücre gösteren çizgili kas dokusu, değerlendirme skoru: 1 (B: H-E, x40); belirgin enflamatuar hücre infiltrasyonu ve yer yer septal infiltrasyon gösteren çizgili kas dokusu, değerlendirme skoru: 2 (C: H-E, x40, D: H-E, x100); yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu, değerlendirme skoru: 3 (E: H-E, x40, F: H-E, x100); yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu, kas tipi multinükleer dev hücre oluşumu ve nekrotik değişiklikler gösteren çizgili kas dokusu, değerlendirme skoru: 4 (G: H-E, x40, H: H-E, x100).

Çalışmaya alınan birinci grupta (diklofenak+GASM3) dokuz biyopsi örneği histopatolojik olarak incelendi. İnceleme sonucunda histopatolojik evrelemeye göre median değeri 4, (%25-75; 2-4), ortalama değeri ise $3,1 \pm 1,5$ olarak hesaplandı. İkinci grupta (GASM3+diklofenak) 10 biyopsi örneği incelendi. Median değeri 4, (%25-%75; 4), ortalama değeri ise $3,6 \pm 0,9$ olarak hesaplandı. Üçüncü grupta (diklofenak) 10 biyopsi örneği histopatolojik olarak incelendi. Median evre 3,5 (%25-%75;3-4); ortalama evre ise $3,5 \pm 0,8$ olarak hesaplandı. GASM3 enjeksiyonu yapılan grupta 10 biyopsi örneği incelendi. Histopatolojik evrelemeye göre median değeri 4 (%25-%75;3-4), ortalama değeri $3,3 \pm 1,1$ olarak hesaplandı. Beşinci grupta (negatif kontrol grubu) 7 biyopsi örneği histopatolojik olarak incelendi median evre 0 (%25-%75; 0- 0,75); ortalama evre $1,0 \pm 1,6$ olarak hesaplandı.

Deney gruplarında enflamasyonun histopatolojik derecelendirme sonuçlarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 12’de gösterilmektedir.

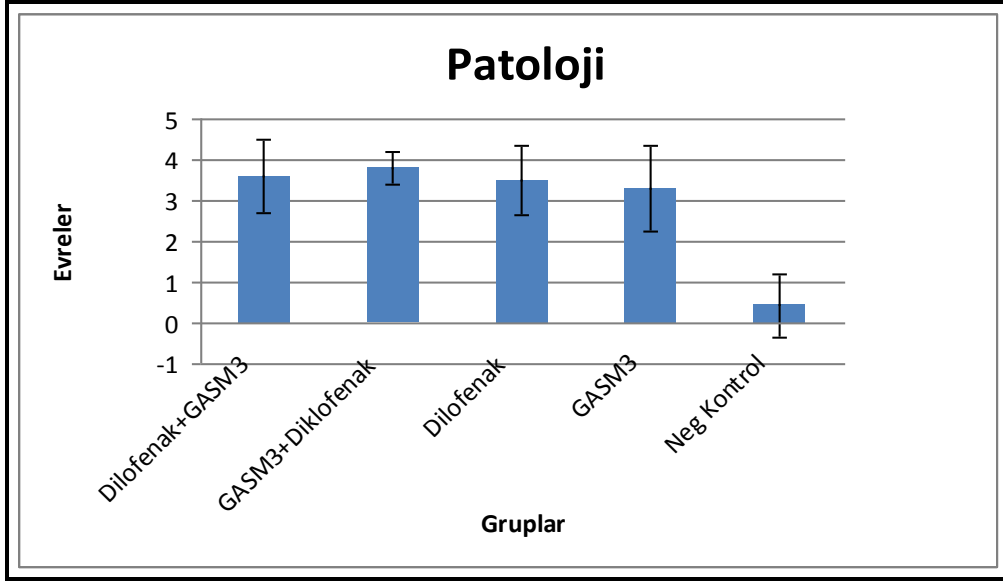
Tablo 12. Deneklerin histopatolojik evreleme sonuçları

Gruplar	Ortalama $\pm$ standart sapma (evre)
Diklofenak+GASM3	$3,60 \pm 0,89$
GASM3+diklofenak	$3,80 \pm 0,42$
Diklofenak	$3,50 \pm 0,83$
GASM3	$3,30 \pm 1,05$
Negatif Kontrol	$0,42 \pm 0,78$

Buna göre en yüksek skor GAS M3 + diklofenak grubunda izlendi. Diklofenak + GASM3 grubunda da enflamasyon evresi diklofenak, GAS M3 ve negatif kontrol grubundan yüksekti. Sadece diklofenak enjeksiyonu ise sadece bakteri verilmesinden daha fazla bir enflamasyona neden olmaktaydı. Ama bu farklar istatistiksel olarak bir fark oluşturmadı. Sadece diklofenak veya GASM3 verilmesi ile oluşan enflamasyon ikisinin birden verilmesi ile oluşan ortalama enflamasyon skorundan daha azdı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu da bize bakteri inokulasyonu öncesinde veya sonrasında diklofenak kullanımının daha fazla doku inflamasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir.

Ancak tüm gruplar değerlendirildiğinde Kruskal-Wallis One Way analizi ile yapılan istatistiksel karşılaştırmada gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p < 0,001$).

Dunn's methodu ile yapılan alt analizde ise grupların ikili karşılaştırmasında bütün grupların negatif kontrol ile karşılaştırılmasında enflamasyon derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,001$). Ancak negatif kontrol dışında grupların kendi arasında karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 11).



Şekil 11. Grupların histopatolojik evreleme ortalama ve standart sapma değerleri

Mikrobiyolojik çalışma

Sepsis gelişimi

Sepsis gelişimi açısından kalp ve karaciğer dokusundan yapılan kültürlerde; inkübasyon süresi sonrası diklofenak, negatif kontrol ve GASM3 enjeksiyonu yapılan gruplarda üreme görülmedi (Tablo 13). Diklofenak+GASM3 grubunda dört denekte (%36) sepsis gelişimi izlenirken GASM3+diklofenak grubunda bir denekte sepsis gelişimi izlendi (%10). Gruplar arasında görülen bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sadece bakteri verilmesi ile sepsis gelişmemesine rağmen diklofenak ile bakteri verilen gruplarda sepsis gelişmesi diklofenak enjeksiyonunun bakteriyemi olasılığını artırdığını düşündürmektedir.

Tablo 13. Gruplarda sepsis gelişimi

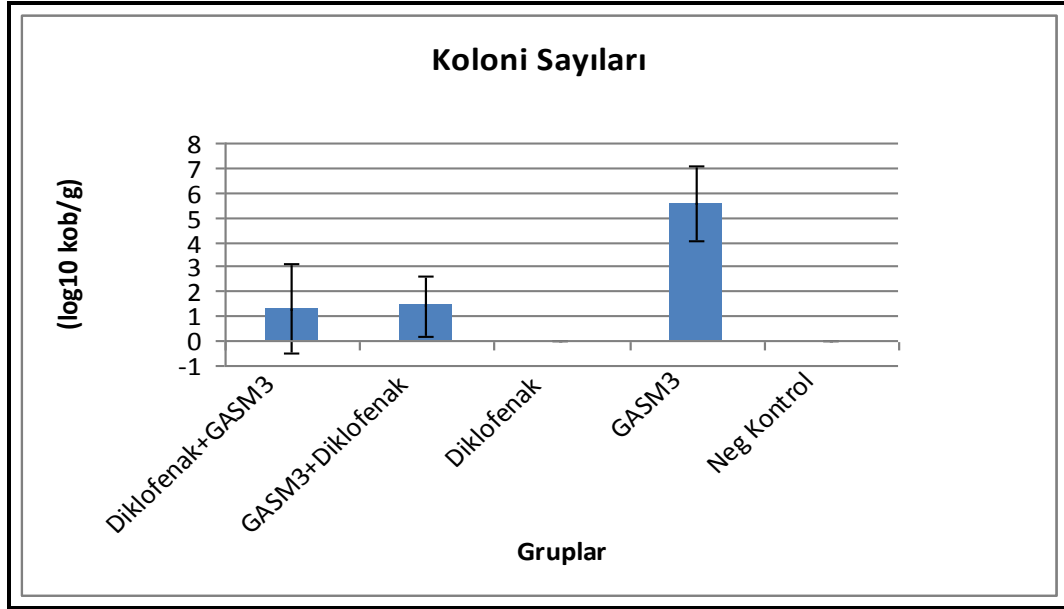
Gruplar	Diklofenak+ GASM3	GASM3+ Diklofenak	Diklofenak	GASM3	Negatif Kontrol
Sepsis gelişimi	Var (%36)	Var (%10)	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok

En çok üreme sadece GASM3 enjeksiyonu yapılan grupta görüldü. Bu grupta üreyen bakterilerin ortalama değerleri hesaplandığında median değer $5,56 \log_{10}$ kob/g olarak tespit edildi. Diklofenak+GASM3 grubunun koloni sayısı ortalaması $1,40 \log_{10}$ kob/g, GASM3+Diklofenak grubunun koloni sayısını ortalaması $1,28 \log_{10}$ kob/g, olarak hesaplandı (Tablo 14).

Tablo 14. Deneklerin bacak dokusunda gram doku başına üreyen koloni sayısı ortalaması

Gruplar	Ortalama $\pm$ standart sapma ($\log_{10}$ kob/g)
Diklofenak+GASM3	$1,28 \pm 1,80$
GASM3+Diklofenak	$1,40 \pm 1,21$
Diklofenak	0
GASM3	$5,56 \pm 1,53$
Negatif Kontrol	0

Grupların koloni sayıları ortalamalarına göre bakteri enjeksiyonu yapılan GASM3 grubunda ortalama koloni sayısının istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,001$). Diklofenak ile birlikte bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda üreyen ortalama koloni sayıları sadece bakteri enjeksiyonu yapılan gruba göre daha azdı (Şekil 12). Diklofenak enjeksiyonunun kas dokusundaki gram başına mikroorganizma sayısını azalttığını düşündürmüştür.



Şekil 12. Deneklerin uyluk kasının gram dokusu başına düşen koloni sayısı ortalamaları

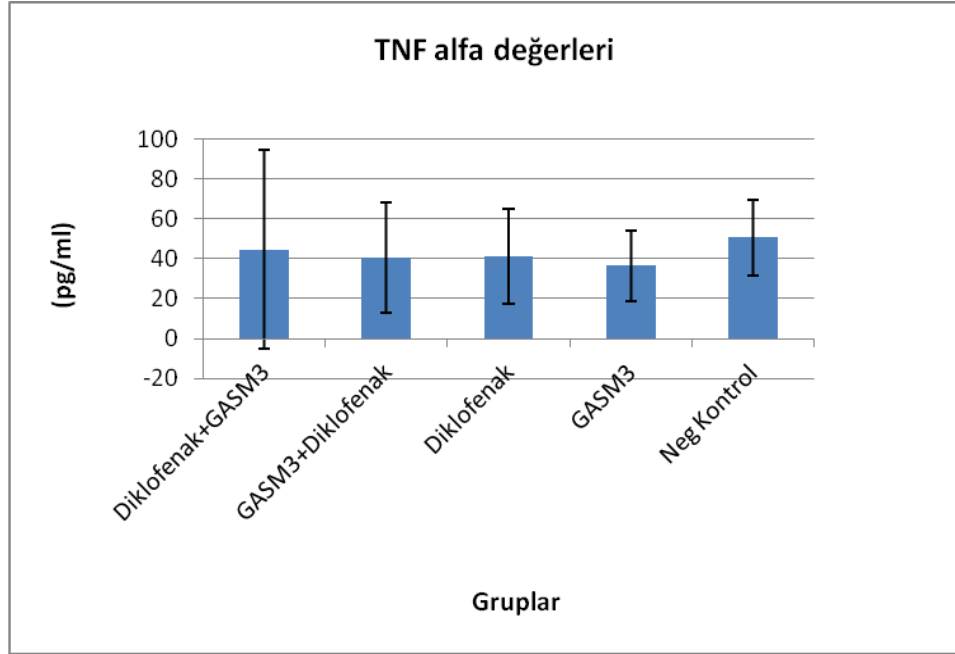
Sitokin Çalışması: TNF alfa düzeyi için yapılan değerlendirmeye göre diklofenak+GASM3 grubunun ortalaması 44,70 pg/ml olarak hesaplandı. GASM3+diklofenak grubunun ortalaması ise 40,40 pg/ml olarak hesaplandı. Diklofenak ve GASM3 gruplarının ortalamaları sırası ile 41,27 ve 36,51 pg/ml olarak hesaplandı. Negatif kontrol grubuna sitokin düzeyi ortalaması 50,59 pg/ml olarak hesaplandı (Tablo 15).

Tablo 15. Grupların serum TNF alfa düzeyi ortalamaları

Gruplar	Ortalama ±standart sapma (pg/ml)
Diklofenak+GASM3	44,70±50,13
GASM3+diklofenak	40,40±27,81
Diklofenak	41,27±23,71
GASM3	36,51±17,69
Negatif Kontrol	50,59±17,57

Bu sonuçlara göre serum TNF alfa düzeyi ortalaması en yüksek olan grup negatif kontrol grubu idi. Bakteri öncesinde ve sonrasında DS enjeksiyonu yapılan gruplarda serum TNF alfa düzeyi ortalaması bakteri enjeksiyonu yapılan gruba daha yüksek tespit edildi. Sadece

diklofenak enjeksiyonu yapılan grupta serum TNF alfa düzeyi ortalaması sadece bakteri enjeksiyonu yapılan gruba göre daha yüksek hesaplandı. Gruplar arası ikili karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (Şekil 13).



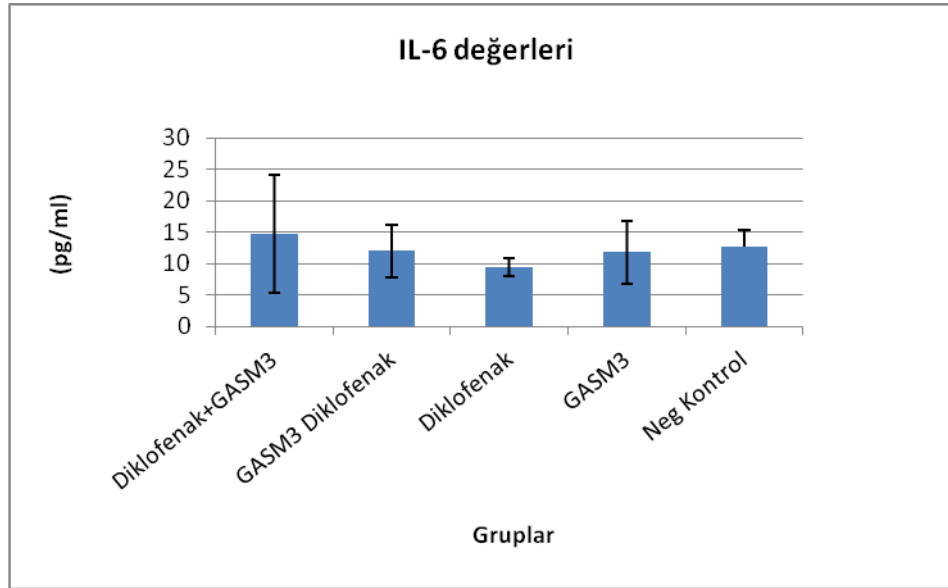
Şekil 13. Grupların serum TNF alfa sitokin düzeyi ortalamaları

İnterlökin 6 düzeyi için yapılan değerlendirmeye göre diklofenak+GASM3 grubunun sitokin düzeyi ortalaması 12,02 pg/ml; GASM3+diklofenak grubunun ortalaması ise 14,72 pg/ml olarak hesaplandı. Diklofenak ve GASM3 gruplarının sitokin düzeyleri ortalamaları sırası ile 9,34 ve 11,78 pg/ml olarak saptandı. Negatif kontrol grubunun ortalaması 12,61 pg/ml hesaplandı (Tablo 16).

Tablo 16. Grupların serum İL- 6 sitokin düzeyi ortalamaları

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart sapma (pg/ml)
Diklofenak+GASM3	14,72 $\pm$ 9,42
GASM3+Diklofenak	12,02 $\pm$ 4,22
Diklofenak	9,34 $\pm$ 1,43
GASM3	11,78 $\pm$ 5,01
Negatif Kontrol	12,61 $\pm$ 2,67

Bu sonuçlara göre serum İL-6 düzeyi ortalaması en düşük olan grubun diklofenak grubu idi. Diklofenak+GASM3 grubunda ortalama serum İL-6 düzeyi yalnızca GASM3 enjeksiyonu yapılan gruptan daha yüksek tespit edildi.



Şekil 14. Grupların serum İL-6 düzeyi ortalamaları

Grupların kendi aralarında İL-6 ortalamasına göre karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

5.TARTIŞMA

Nekrotizan fasiit, deri, deri altı doku ve yüzeyel fasiyayı tutan, hızla invazyon sonucu sistemik toksisiteye neden olabilen, mortalitesi yüksek bir enfeksiyon hastalığıdır (62).

NF gelişiminde immunsupresif hastalık ve ilaçların risk faktörleri olabildiğini bildiren birçok çalışma mevcuttur (17, 63- 65). Tanımlanmış birçok risk faktörü olmasına karşın Dufel ve arkadaşlarının NF'li hastaları değerlendirdiği bir çalışmada olguların yaklaşık yarısının sağlıklı bireyler olduğu rapor edilmiştir (66). Bu nedenle ko-morbid hastalıklar dışında NF gelişiminde başka faktörlerin de rol oynayabileceği düşünülmektedir. Hastanemizde takip ettiğimiz hastalardan üç tanesinde herhangi bir ko-morbid hastalık bulunmaması da bu hipotezi desteklemektedir.

Bunun yanında Forbes ve arkadaşlarının 2001 yılında 24 NF hastası ve risk faktörlerini değerlendirdiği çalışmada obezite ve ko-morbid hastalıkların yanı sıra beş hastada NSAİ ilaç kullanım öyküsü bildirilmiştir (67). NF'li hastalarda komorbid durum olmamasına rağmen NSAİ ilaç uygulaması gibi enfeksiyona neden olabilecek bazı uygulamalar eşlik edebilir. Bu durumda enfeksiyona enjeksiyon işleminin mi yoksa NSAİ ilacın enflamasyonu baskılaması mı etkili olduğu bilinmemektedir. Ancak bu durumu aydınlatmaya yönelik çeşitli çalışmalar vardır.

Bunlardan bir tanesi Lesko ve arkadaşlarının primer varisella enfeksiyonu sonrası GAS'a bağlı invaziv cilt enfeksiyonu gelişen 52 çocuk ve komplikasyon gelişmeyen 172 kontrol grubunu karşılaştırdığı çok merkezli prospektif çalışmadır. Buna göre antipiretik olarak ibuprofen kullanımının NF gelişme riskini, kullanmayan gruba göre dört kat arttırdığı raporlanmıştır (68). Benzer şekilde 2006 yılında primer varisella enfeksiyonu sırasında antipiretik amaçlı NSAİ kullanımı sonrası GAS'a bağlı iki NF vakası bildirilmiştir (69). Souyri ve arkadaşlarının 2000–2004 yılları arasında yaptığı retrospektif bir çalışmada ise NF gelişen hastalar risk faktörleri açısından kontrol grubu ile karşılaştırılmış, karşılaştırılan 38 hasta ve 228 kontrol grubunda NSAİ kullanımının NF gelişme riskini 31 kat arttırdığı raporlanmıştır (70). İki bin oniki yılında 247 invaziv DYDE tanılı hastanın değerlendirildiği bir çalışmada hastaların %23'ünde NSAİ kullanım öyküsü bildirilmiştir. Bu çalışmalarda NSAİ kullanımının enflamatuvar yanıtı baskılaması nedeniyle enfeksiyonların daha invaziv

gelişebileceği görüşü bildirilmiştir. Ancak fizyopatolojiyi açıklayacak bir yanıt bulunamamıştır (70,71). Literatürde NSAE ilaçların oral ve topikal kullanımı dışında im uygulanması sonrası da NF gelişen vakalar bildirilmiştir (72-74). Bu nedenle invaziv DYDE gelişiminde im uygulanan NSAE'lerin histopatolojik, mikrobiyolojik ve proenflamatuar sitokin üretimi üzerine etkisini deneysel fare modelinde incelemek için bu çalışma planlanmıştır.

NF, mikroorganizmanın inokulasyon yerine göre vücudun farklı bölgelerinde görülebilmektedir. Kalaivani ve arkadaşlarının çalışmasında NF gelişen hastalarda %56 alt ekstremitte, %25 perine tutulmuştur (75). Turhan ve arkadaşları da NF gelişim bölgesini %31 oranında alt ekstremitte olarak tespit etmiştir (76). Shi Nae Yu ve arkadaşlarının NF gelişen 83 hastayı değerlendirdiği çalışmasında enfeksiyon bölgesinin %50 oranda alt ekstremitte, %20 gövde ve %14 oranda gluteal bölge olduğu tespit edilmiştir. Sağ kalan ve ölen hastaların enfeksiyon bölgesine göre karşılaştırıldığı bir çalışmada ölen hastalarda alt ekstremitte tutulum yüzdesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (77). NF in en sık alt ekstremitte görülmesi ve bazı çalışmalarda mortalite üzerine etkisi bulunması nedeniyle deneysel çalışmada enjeksiyon bölgesi alt ekstremitte olarak belirlendi.

Bu çalışmada 40 mg/L DS konsantrasyonunda GAS M3 türüne karşı 24. Saatte 3 log' dan fazla düşüş sağlamamıza rağmen 0,4 mg/L konsantrasyonda (bu değer farelerde antienflamatuvar etkinin sağlanmadığı düzeydir) (60) kill-time yöntemi ile bakteri üremesini inhibe etmediği gösterildi. DS'nin antibakteriyel etkisinin olduğuna dair yapılan çalışmalarda *Mycobacterium* türleri, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *E. Coli*, *Enterococcus spp* ve *S. Aureus*' a karşı 50-100 mg/L konsantrasyonda bu etki tespit edilmiştir. Bu antibakteriyel etkinin DNA sentez inhibisyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (78- 80) .

Bu çalışmada kas dokusunda meydana gelen değişiklikler değerlendirildiği için Seal Kingston sınıflaması kullanılmadı. Bunun yerine enflamasyonun derecesini gösteren parametreler kullanıldı. Buna göre gruplar arasında ortalama histopatolojik evreleri karşılaştırdığımızda en fazla enflamatuvar hücre ve nekrozun diklofenakla birlikte bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda olduğu görüldü. Sadece diklofenak enjeksiyonu yapılan grupta bakteri enjeksiyonu yapılan gruba göre enflamatuvar hücre sayısı ve nekrozun **daha fazla** olduğu tespit edildi. Enjeksiyon sonrası iskemik nekroza bağlı cilt, yumuşak doku ve kas dokusunun etkilendiği hastalığa 'Nicolau Sendromu' adı verilmektedir (81). Fizyopatolojisinde çeşitli faktörler

tanımlanmıştır. Enjeksiyonun intra/periarteioler enjeksiyonuna bağlı arterioler vazospazm veya okluzyon tanımlanan bir risk faktörüdür. NSAİ'lerin prostaglandin sentezi inhibisyonu etkisi ile gelişen vazospazm tanımlanan diğer bir risk faktörüdür. NSAİ'lerin sitotoksik reaksiyonuna bağlı perivasküler enflamasyon oluşmaktadır. Bu enflamasyona bağlı gelişen arterioler rüptür de başka bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (82). Bizim çalışmamızda da DS enjeksiyonu yapılan grupta enflamatuvar hücrelerin ve nekrozun fazla bulunması bu hipotezleri destekler niteliktedir.

Guibal ve arkadaşlarının bu konuda 1998 yılında yaptığı deneysel çalışmada 16 tavşan kullanılmıştır. Deneklerden 8 tanesine NSAİ enjeksiyonu uygulanmış ve bakteri olarak GAS ve stafilokoksik alfa toksin kullanılmıştır. Çalışma sonucunda postmortem cilt biyopsileri Seal-Kingston metoduna göre evrelenmiştir. Bu evrelemeye göre alınan doku örneklerinde dermonekroz, miyonekroz, hemoraji, enflamatuvar hücreler, püy varlığı, tromboze damar varlığı ve streptokokal değişiklikler bizim çalışmamıza benzer şekilde 5 evrede sınıflandırılmıştır (80). Bu çalışma sonucunda NSAİ enjeksiyonu yapılan grupta kontrol grubuna göre dermonekroz, püy, tromboze damar ve bakteriyel değişiklik evreleri **daha düşük** bulunmuştur (83). Eter ve arkadaşlarının yaptığı deneysel rat NF modelinde ise 40 denekte tükürük ve peptostreptokok enjeksiyonu yapılarak tip 1 ve 2 NF modeli oluşturulması amaçlanmıştır. NSAİ olarak DS kullanılmış ve histopatolojik evreleme için Seal-Kingston yöntemi kullanılmıştır. Her iki grubun histopatolojik karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Alınan biyopsi örneklerinin hiçbirinde tromboze damar yapısının bulunmaması ve bu nedenle NF oluşturulamaması; biyopsi alınma gününün literatürle uyumlu olmamasına bağlanmıştır (84).

Weng ve arkadaşlarının yaptığı deneysel fare modelinde toplam 26 farenin 14 tanesine GAS enjeksiyonu sonrası 7 gün boyunca oral ibuprofen uygulanmıştır. Yedinci gün sonunda enjeksiyon bölgesinden alınan cilt biyopsileri incelendiğinde NSAİ ve bakteri uygulanan grupta dermis tabakası ve fasyada komplet yıkılma, PNL infiltrasyonu ve bakteriyel debris görünümü yaygın olarak izlenmiştir. Kontrol grubunda bu görünümünün minimal olduğu gözlenmiştir (85).

Bizim çalışmamızın her üç deneysel çalışmadan farkı hem DS öncesinde ve sonrasında GAS enjeksiyonu yapılan hem de sadece DS enjeksiyonu yapılan bir gruba sahip olmasıdır. Bu sayede klinik olgularda da tanımlanan NSAİ uygulamasının enflamasyon ve nekroza neden

olduğu ve NSAE ile birlikte bakteri enjeksiyonunun da bu enflamatuvar değişiklikleri arttırdığı sonucuna varılmıştır. Enflamatuvar derecelendirme açısından bakteri inokulasyonundan önce veya sonra DS verilmesi arasında ise belirgin farklılık bulunmamaktadır.

Sepsis gelişimi açısından değerlendirildiğinde yaptığımız mikrobiyolojik çalışma sonucunda NSAE ile birlikte GASM3 enjekte edilen gruplarda sepsis gelişti. Önceden 48 saat NSAE ilaç uygulanması daha fazla oranda sepsise (%36) neden olurken GAS M3 enjeksiyonu sonrası NSAE uygulananlarda sepsis oranı daha düşük (%10) idi. Sadece GAS M3 enjeksiyonu yapılan deneklerde sepsis gözlenmedi. Guibal ve arkadaşlarının deneysel tavşan modeli çalışmasının devamında çalışma ve kontrol grubundan çalışmanın 1, 4, 7 ve 10. günlerinde alınan kan kültürlerinde üreme olmadığı görüldü (83). NSAE kullanımı ile ilişkili NF vakalarının derlendiği bir çalışmada olgu sunumu olarak rapor edilen 8 vaka değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda 5 vakada septik şok bulgusunun izlendiği raporlanmıştır (86). NSAE ejeksiyonu sonrası pnömokoksik NF vakalarının bildirildiği olgu sunumunda da bildirilen her iki vakanın kan ve doku kültüründe bakteri üremesi görülmüştür (72). Hastanemizde takip edilen vakalardan beşinci vakada da benzer şekilde doku kültürü dışında intraabdominal mayi kültüründe de bakteri üremesi görülmüştür. Bu sonuçlar NSAE enjeksiyonunun lokal enfeksiyonlarla birlikte sistemik enfeksiyonlara da neden olabileceği hipotezini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda dokulardan yapılan bakteriyolojik incelemede NSAE ile birlikte bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda sadece bakteri enjeksiyonu yapılan gruba göre koloni üremesi daha az izlendi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Birçok ilaçta gösterilen antimikrobiyal etki NSAE ilaçlarda da izlenebilmektedir. DS'nin in-vivo şatlarda 1,5-3 mg/kg konsantrasyonda *S. Typhimurium*' a karşı antimikrobiyal etkisi gösterilmiştir(78). Ratlarda kas dokusunda bakteriyel dansite ölçümü yapılan benzer bir deneysel çalışma modelinde yedinci gün sonunda NSAE enjeksiyonu yapılan grupta yapılmayan gruba göre bakteri yoğunluğu daha fazla ölçülmüştür. Bu sonuca göre NSAE ilaçların bakteri proliferasyonunu direk etkilediği yorumu yapılmıştır (84). Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada bakteri türü olarak miks bakteri ve anaerobik peptostreptokok türünün kullanılması ve bu bakterilerin proliferasyon koşullarının GAS'tan farklı olması nedeniyle karşılaştırma yapmak uygun olmayabilir. Ayrıca bu çalışmada DS yapılan gruplarda dokudaki bakteri yükü yalnızca GAS

verilenlere göre daha düşüktü. Bu sonuç DS enjeksiyonu yapılmasının bakteri üremesini inhibe etmesine bağlı olabilir.

Guibal ve arkadaşlarının deneysel tavşan modelinde lezyonun merkezinden ve kenarından örnek alınarak mikrobiyolojik inceleme yapılmış ancak bu çalışmada da gruplar arası anlamlı fark bulunamamıştır (83). Tavşanların GAS'a bağlı invaziv enfeksiyonlara dirençli olması nedeniyle stafilokoksik alfa toksin de kullanılmıştır. İn vitro çalışmamızda da yüksek konsantrasyonda diklofenak sodyum uygulamasının bakteri proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. İn-vitro, iç organ ve kas dokusu kültür sonuçları birlikte değerlendirildiğinde yüksek konsantrasyonda DS'nin GAS proliferasyonunu baskılayabildiği fakat yüksek konsantrasyonda bakteri inokulasyonunda sistemik enfeksiyon gelişimine katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. DS ticari ampullerinin üç ml'lik distile suyla sulandırılması sonucunda 25mg/ml'lik bir solüsyon elde edilir. İn vitro çalışmada 40mg/L konsantrasyonda bakteri üremesini inhibe etmesinden dolayı 25mg/ml konsantrasyonda DS'nin GAS üremesini inhibe ettiğini söyleyebiliriz. Bundan dolayı GAS'ın ilaçla taşınması olası değil gibi görünmekle birlikte mikroorganizmalar sonraki enjeksiyonlarda deriden iğne ile inokule ediliyor olabilir. Ayrıca 48 saat NSAİ ilaç enjeksiyonunun dokudaki enflamasyon ve nekrozu artırmasına bağlı olarak enfeksiyona meyil artıyor olabilir.

Grupların TNF alfa düzeyi karşılaştırılmasında negatif kontrol grubunda serum TNF alfa düzeyinin en yüksek olduğu, bakteri enjeksiyonu öncesi ve sonrasında diklofenak enjeksiyonu yapılan gruplarda serum TNF alfa düzeyinin sadece bakteri enjeksiyonu yapılan gruba göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Teglund ve arkadaşlarının GAS'a bağlı ağır ve ağır olmayan hastalarda enflamatuar yanıtı karşılaştırdığı bir çalışmada enfeksiyonun akut faz döneminde ağır GAS enfeksiyonu geçiren grupta İL-2, İL-6 ve TNF alfa düzeyi diğer gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (87). Ağır enfeksiyon geçiren grupta hastalar kendi arasında kategorize edildiğinde iki veya daha fazla organ yetmezliği olan grupta bu sitokin düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre DS ile birlikte bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda sepsis gelişen denek oranının daha fazla olması (%36 ve %10) sitokin seviyelerinin neden daha yüksek olduğunu açıklayabilir. Fakat kontrol grubunda diğer gruplara göre TNF alfa seviyesinin yüksek olması açıklanamamıştır.

TNF alfanın enflamasyondaki bir diğer rolü de enflamasyon bölgesine PNL ve makrofajların infiltrasyonunun düzenlenmesi olduğu bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda enflamatuvar yanıtın başlangıcında GAS'ın PNL ile etkileşim basamağında inhibisyonu nedeniyle fagositoz, intrasellüler ve extrasellüler tuzak basamaklarında defekt geliştiği bildirilmiştir. Bu virülans faktörü sayesinde GAS'ın lokal enfeksiyonundan sistemik enfeksiyona yayılmasında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (88-91). Mishalian ve arkadaşları transgenik ve vahşi tip farelerde GAS'a bağlı NF modeli oluşturmuş ve gruplar arasındaki enflamatuvar sitokin düzeyi farklılıklarını incelemiştir. Transgenik fare türü olarak TNF alfa reseptörü duyarsızlaştırılan farelerin kullanıldığı bu çalışmada gruplara 1×10^8 kob/100 mikrolitre subkutan GAS enjeksiyonu sonrası mortalite, 48 ve 72. saat serumdaki bakteri konsantrasyonu karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda vahşi tip farelerde mortalite anlamlı olarak daha düşük bulunmuş ve transgenik farenin serumdaki bakteri konsantrasyon düzeyi vahşi tipe göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca 72. saatteki serum TNF alfa düzeyleri 48. saate göre daha yüksek bulunmuştur. Lezyondan alınan örneklerdeki doku TNF alfa düzeyi değerlendirildiğinde vahşi tip farede enjeksiyonun altıncı saatinde maksimum değere ulaştığı 12. saatte maksimum değer yarısına düştüğü ve yeniden yükselme eğilimine girdiği izlenmiştir (90). Bu sonuçlar ışığında TNF alfa defisiti olan durumlarda enflamasyon bölgesine PNL ve makrofaj translokasyonunda kısıtlanma ve bu nedenle bakterinin enflamasyon bölgesine sınırlandırılmasında problem olabileceği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda DS enjeksiyonu yapılan gruplarda serum TNF alfa düzeyinin bakteri enjeksiyonu yapılan gruptan yüksek olması DS'nin dokuda yaptığı nekroza bağlı oluşan enflamatuvar yanıtla ilgili bir çalışma yapılmadı. Mishalian ve arkadaşlarının çalışmasında da gösterildiği üzere enflamasyon sırasında serum TNF alfa düzeyi erken dönemde pik yapmakta ve sonrasında düşmektedir. Gruplardaki TNF alfa seviyelerinin yükselme ve düşme zamanlarını tesbit etmek için periyodik serum TNF alfa düzeyi ölçümünün yapılması daha uygun olabilirdi.

Doğan ve arkadaşlarının diklofenak ve başka bir NSAİ ilacın ateş yanıtı üzerine ratlarda yaptığı deneysel çalışmada da farklı konsantrasyonda diklofenak uygulaması ve serum TNF alfa düzeyi ölçümü yapılmıştır. Çalışma sonucunda DS'nin başlıca yüksek konsantrasyonda olmak üzere bütün konsantrasyonlarda TNF alfa düzeyini suprese ettiği tespit edilmiştir (91).

Bu sonuçlar eşliğinde enflamatuvar yanıt sürecinde serum TNF alfa düzeyinin akut dönemde hızlı bir yükseliş gösterdiği, günler içinde ise siklik bir seyir gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle sitokin düzeyi değerlendirilmesi için tek bir ölçümünün yeterli olmayacağını destekler.

Grupların serum İL-6 düzeyleri karşılaştırmasında en yüksek düzeyin diklofenak+GASM3 grubunda, en düşük düzeyin ise diklofenak grubunda olduğu görüldü. Çalışmamızın sonucu ile benzer şeklide Teglund ve arkadaşları ağır GAS enfeksiyonu geçiren hastalarda serum İL-6 düzeyini daha yüksek bulmuştur (87). Weng ve arkadaşlarının 2×10^9 kob/ml GAS enjeksiyonu ile yaptığı ve NSAE olarak ibuprofen kullanılan deneysel NF modelinde serum ve doku İL-6 düzeyleri karşılaştırılmıştır. GAS enjeksiyonun 1, 3, 5 ve 7. gününde doku ve serum İL-6 düzeyleri ölçülmüştür. NSAE uygulanan grupta kontrol grubuna göre serum ve doku İL-6 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Çalışmanın üçüncü gününde NSAE uygulanan grupta serum ve doku İL-6 konsantrasyonunun pik yaptığı görülmüştür. Kontrol grubunda serum İL-6 düzeyi üçüncü gününde negatifleşmiştir (85). Bizim çalışmamızda serum İL-6 düzeyi ölçümü çalışmanın 4. gününe rastlamıştır. Weng ve arkadaşlarının çalışmasına göre NSAE ilaç enjeksiyonu yapılan gruptaki serum İL-6 düzeyinin üçüncü günden sonra düşme eğilimine girmesi ve beşinci günde minimum seviyede olması nedeniyle dördüncü gün serum İL-6 düzeyi ölçümünün yetersiz kaldığı düşünüldü. Bu nedenle çalışmamızda da gruplar arasındaki fark anlamlı çıkmamış olabilir.

6. SONUÇLAR

1. GAS ve yüksek konsantrasyonda DS, *in vitro* ortamda birlikte inkübe edildiğinde ikinci saatten itibaren bakteri proliferasyonunda inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir.

2. Deneklerin uyluk kasına diklofenakla veya diklofenaksız bakteri verilmesi arasında histopatolojik olarak dokuda oluşturdıkları enflamasyon açısından istatistiksel fark olmamasına rağmen en fazla enflamasyon bakteri inokulasyonu sonrasında diklofenak enjekte edilmesinde gözlenirken bunu 48 saat diklofenak sonrası bakteri enjeksiyonu izledi.

Sadece diklofenak veya GASM3 verilmesi ile oluşan enflamasyon ikisinin birden verilmesi ile oluşan ortalama enflamasyon skorundan daha azdı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu da bize bakteri inokulasyonu öncesinde veya sonrasında diklofenak kullanımının daha fazla doku inflamasyonuna neden olduğunu düşündürmüştür.

3. DS, DS+bakteri ve sadece bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek enflamasyon cevabı izlendi.

4. Sepsis gelişiminin mikrobiyolojik olarak incelenmesinde DS ile birlikte bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda iç organ kültürlerinde üreme görülürken sadece bakteri enjekte edilen grupta hiçbir denekte üreme olmadı. Sadece bakteri verilmesi ile sepsis gelişmemesine rağmen diklofenak ile bakteri verilen gruplarda sepsis gelişmesi diklofenak enjeksiyonunun bakteriyemi gelişmesine katkısı olabileceğini düşündürmüştür.

5. Diklofenak kullanılan gruplardaki deneklerin uyluk kasından üreyen bakteri koloni sayıları anlamlı olarak tek başına GAS enjekte edilenlerden istatistiksel olarak anlamlı olarak daha azdı. Bu da diklofenak enjeksiyonunun kas dokusundaki gram başına mikroorganizma sayısını azalttığını düşündürmüştür. Ancak bakteri enjeksiyonu öncesinde diklofenak enjeksiyonu sepsis gelişme oranını artırmıştır (%36).

6. Serum TNF alfa düzeyleri bakteri enjeksiyonu öncesi ve sonrasında DS uygulanan gruplarda yalnızca bakteri enjeksiyonu yapılan gruba göre daha yüksekti.

7. İL-6 düzeyleri ise DS ile birlikte bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda daha yüksekti ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

8. Diklofenak sodyumun kasa enjekte edilmesi yalnız başına bakteri enjeksiyonundan daha fazla hasara neden olmaktadır. Diklofenak ile kombine bakteri enjeksiyonu yapılan gruplarda ortalama kas dokusundaki bakteri sayılarının daha az olmasına karşın dokudaki histopatolojik hasarın ve sepsis gelişiminin daha fazla olması diklofenak sodyumun enfeksiyon gelişimine katkısının olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca diklofenak sodyumla birlikte bakteri enjeksiyonunun TNF alfa ve İL-6 salınımını arttırdığı göstermiştir. Ancak serum sitokin düzeyleri diklofenak ve bakteri enjeksiyonu yapılan günlere ve ölçümün yapıldığı güne göre değişebilmektedir. Bunun netleştirilebilmesi için daha geniş çalışmalar gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Karaoğlu İ. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonlarının Sınıflandırılması ve Etyolojisi. Yoğun Bakım Dergisi 2012; 10(3):109-19.
2. Sartelli M, Malangoni MA, May AK, et al. World Society of Emergency Surgery (WSES) guidelines for management of skin and soft tissue infections. World J Emerg Surg 2014; 9:57.
3. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, et al. Practice Guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infection. Clin Infect Dis 2005; 41:1373-406.
4. Eron LJ, Lipsky BA, Low DE, et al. Managing skin and soft tissue infections: expert panel recommendations on key decision points. J Antimicrob Chemother 2003; 52(Suppl 1):S137.
5. Doğanay M, Yıldız O. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (edler), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, (3. Baskı) Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2008, pp. 1278-344.
6. Jones J. Infection with Flesh Eating Bacteria. J Emergency Med.1996; 14, 6:747-59.
7. Kaafarani HM, King DR. Necrotizing skin and soft tissue infections. Surg Clin North Am. 2014; 94(1):155-63.
8. Tavioglu K, Yanar, H. Necrotizing fasciitis: strategies for diagnosis and management. World J Emerg Surg.. 2007; 2, 19.
9. Pasternack MS, Swards MN. Skin and soft tissue infections. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R (eds.) Principles and Practice of Infectious Diseases. (8th edition) Saunders Elsevier Philadelphia 2015, pp 1194-216.
10. O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, et al. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. Clin Infect Dis 2007;45(7):853-62.
11. O'Grady KA, Kelpie L, Andrews RM, et al. The epidemiology of invasive group A streptococcal disease in Victoria, Australia. Med J Aust. 2007; 186(11): 565-9.

12. Topkaya AE, Balıkcı A, Aydın F ve ark. Epidemiology, Clinical and Microbiological Characteristics of Invasive Streptococcal Infections in Turkey, 2010-2011. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 1-13.
13. Yahav D, Duskin-Bitan H, Eliakim-Raz N et al. Monomicrobial necrotizing fasciitis in a single center: the emergence of Gram-negative bacteria as a common pathogen. Int J Infect Dis. 2014 ;28:13-6.
14. Krieg A, Dizdar L, Verde PE, Knoefel WT. Predictors of mortality for necrotizing soft-tissue infections: a retrospective analysis of 64 cases. Langenbecks Arch Surg. 2014; 399:333–41.
15. Maya SP, Beltrán PD, Lemercier P, Salinas CL. Necrotizing fasciitis: an urgent diagnosis. Skeletal Radiol 2014; 43: 577–89.
16. Young MH, Aronoff DM, Engleberg NC. Necrotizing fasciitis: Pathogenesis and treatment. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2005; 3(2).
17. Puvanendran R, Huey JC, Pasupathy S. Necrotizing fasciitis. Can Fam Physician. 2009; 55(10): 981-7.
18. Hakkarainen, Timo W, Pham TN, et al. Necrotizing soft tissue infections: Review and current concepts in treatment, systems of care, and outcomes. Curr Probl Surg 2014; 51. 8; 344-62.
19. Shimizu T, Tokuda Y. Necrotizing fasciitis. Intern Med 2010; 49: 1051–7.
20. Frazee BW, Fee C, Lynn J, et al. Communityacquired necrotizing soft tissue infections: a review of 122 cases presenting to a single emergency department over 12 years. J Emerg Med 2008; 34:139–46.
21. Misiakos EP, Bagias G, Patapis P, et al. Current concepts in the management of necrotizing fasciitis. Front Surg 2014; 1.
22. Wong CH, Khin LW, Heng KS, Tan KC, Low CO. The LRINEC (laboratory risk indicator for necrotizing fasciitis) score: a tool for distinguishing necrotizing fasciitis from other soft tissue infections. Crit Care Med 2004; 32:1535–41.
23. Wakhlu A, Chaudhary A, Tandon RK, Wakhlu AK. Conservative management of necrotizing fascitis in children. J Pediatr Surg 2006; 41(6), 1144-1148.

24. Ali SZ, Srinivasan S, Peh WC. MRI in necrotizing fasciitis of the extremities. Br J Radiol 2014; 87,1033.
25. Marron CD. Superficial sepsis, cutaneous abscess and necrotizing fasciitis. In: Brooks A, Mahoney PF, Cotton BA, Tai N, (eds). Emergency Surgery. Oxford, UK: Blackwell Publishing 2010; p. 115–23.
26. Naqvi GA, Malik SA, Jan W. Necrotizing fasciitis of the lower extremity: a case report and current concept of diagnoses and management. Scand J Trauma Resusc Emerg Med 2009; 17: 28.
27. Söyletir G, Hasdemir U. Beta hemolitik streptokoklar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (edler), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, (3. Baskı) Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2008, pp.2030.
28. Spellerberg B, Brandt C: Streptococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH, (eds). Manuel of Clinical Microbiology. 9th Edition. ASM Press, Washington DC, 2007. pp.412-30,
29. Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology and Immunology. 6th Edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, USA, 2000; pp. 85-95.
30. Parija SC. Textbook of Microbiology and Immunology. 2th Edition, Elsevier, Hayrana, India, 2012; pp.183-4.
31. Stewens DL. *Streptococcus pyogenes*. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R (eds.) Principles and Practice of Infectious Diseases. (8th edition) Saunders Elsevier Philadelphia 2015, pp 2286-99.
32. Hynes WL. Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression. Front Biosci 2004; 9:3399-3433.
33. Dennis LS, Brynat A. Group A streptococcus: Virulence factors and pathogenic mechanisms. <http://www.uptodate.com/contents/group/a/streptococcus>. Erişim tarihi 15.03.2015
34. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group a Streptococcus. Clin Microbiol Rev 2014; 27(2), 264-301.

35. Vlamincx BJ, Mascini EM, Schellekens JF. Invasive Lancefield group A streptococcal infections in the Netherlands. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2007; 151(30):1669-73.
36. Cunningham, Madeleine W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(3): 470-511.
37. Areschough T, Carlsson F, Stalhammer-Carlemalm M, Lindahl G. Host pathogen interactions in *Streptococcus pyogenes* infections with special reference to puerperal fever and A Comment on Vaccine Development. *Vaccine* 2004; 22:9-14.
38. Gram Positive Cocci: Part 2: Streptococci, Enterococci and the "Streptococcus-Like" Bacteria. In: Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P (eds). *Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006, pp.305-91.
39. Steer A C, Lamagni T, Curtis N, Carapetis J R. Invasive group A streptococcal disease. *Drugs* 2012; 72: 9: 1213-1227.
40. Darenberg J, Luca-Harari B, Jasir A et al. Molecular and Clinical Characteristics of Invasive group A streptococcal infection in sweden. *Clin Infect Dis* 2007; 45:450-8.
41. Schmitz FJ, Beyer A, Charpentier E, et al. Toxin-Gene Profile Heterogeneity among Endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J Infect Dis* 2003; 188:1578-86,
42. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. İnflamasyon ve Onarım In: Robins, Kumar (edler). *Robins Temel Patoloji*. Nobel Tıp, İstanbul, 2013. 9.baskı s: 29-75.
43. Sessle BJ. New insights into peripheral chemical mediators of pain and inflammation. *J Orofac Pain* 2001;15:1-5.
44. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochemistry* 1993;215:213-9.
45. MacGlashan D. Histamine: a mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(4),53-59.
46. Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuvar mediatörlere toplu bakış. *Genel Tıp Derg* 2006;16(3):143- 152.

47. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:165974.
48. Hack C E, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol.* 1997;66:101-95.
49. Van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13(2):413-26.
50. Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, et al. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(7):2830-4.
51. Cannon JG , Tompkins RG, Gelfand JA, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis.* 1990 ;161(1):79-84.
52. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=TNF-alpha>. erişim tarihi 2015-10-11
53. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285(2):E433-7
54. Amadio P, Cummings DM, Amadio P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Tailoring therapy to achieve results and avoid toxicity. *Postgrad Med.* 1993;93:73-6, 9-81.
55. Melli M, Kayaalp SO. Non-steroidal antiinflatuar ilaçlar. In: Kayaalp SO, editor. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 11. Baskı, Ankara, Hacettepe-Taş, 2005. p. 837-70.
56. Analgesic-Antipyretic and Anti-inflammatory Agents; Pharmacotherapy of Gout. In Brunton L, Parker KL (eds.) *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. (11th edition). 2008. p.430- 64.
57. Shinde UA, Phadke AS, Nair AM, et al. Membrane stabilizing activity - a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia.* 1999;70:251-7.

58. Brooks PM, Day RO. Drug-Therapy - Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs - Differences and Similarities. *New Engl J Med*. 1991;324:1716-25.
59. Kawai S, Kojima F, Kusunoki N. Recent Advances in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Allergol Int* 2005;54:209-15.
60. Gutting BW, Updyke LW, Amacher DE. BALB/c mice orally pretreated with diclofenac have augmented and accelerated PLNA responses to diclofenac. *Toxicology* 2002; 172(3):217-30.
61. Miyatake S, Ichiyama H, Kondo E, Yasuda K. Randomized clinical comparisons of diclofenac concentration in the soft tissues and blood plasma between topical and oral applications. *Br J Clin Pharmacol*. 2009; 67(1):125-9.
62. Wong CH, Yam AK, Tan AB, Song C. Approach to debridement in necrotizing fasciitis. *Am J Surg* 2008; 196: 19–24.
63. Wang J M, Lim HK. Necrotizing fasciitis: eight-year experience and literature review. *Braz J Infect Dis*. 2014 ;18(2):137-43.
64. Taviloğlu K, Cabioğlu N, Cagatay A, et al. Idiopathic necrotizing fasciitis: risk factors and strategies for management. *Am Surg*. 2005 ;71(4):315-20.
65. Vayvada H, Demirdöver C, Menderes A, Karaca C. Necrotizing fasciitis: diagnosis, treatment and review of the literature. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2012 ;18(6):507-13.
66. Dufel S, Martino M. Simple cellulitis or a more serious infection? *J Fam Pract* 2006;55:396-400.
67. Forbes N, Rankin AP. Necrotizing fasciitis and non steroidal anti-inflammatory drugs: a case series and review of the literature. *N Z Med J* 2001;114(1124):3-6.
68. Lesko SM, O'Brien KL, Schwartz B, Vezina R, Mitchell AA. Invasive group A streptococcal infection and nonsteroidal antiinflammatory drug use among children with primary varicella. *Pediatrics*. 2001;107(5):1108-15.
69. Louis ML, Launay F, Guillaume JM, et al. Necrotizing cellulitis complicating varicella in two children given nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 2006; 92(5):504-7.

70. Souyri C, Olivier P, Grolleau S, Lapeyre-Mestre M. Severe necrotizing soft tissue infections and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Exp Dermatol* 2008 ;33(3):249-55.
71. Choo PW, Donahue JG, Platt R. Ibuprofen and skin and soft tissue superinfections in children with varicella. *Ann Epidemiol* 1997; 7: 440–5.
72. Frick S, Cerny A. Necrotizing fasciitis due to *Streptococcus pneumoniae* after intramuscular injection of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: report of 2 cases and review. *Clin Infect Dis.* 2001;33(5):740-4.
73. Verfaillie G, Knape S, Corne L. A case of fatal necrotizing fasciitis after intramuscular administration of diclofenac. *Eur J Emerg Med.* 2002 ;9(3):270-3.
74. Orlando A, Marrone CR, Nicoli N et al. Fatal necrotising fasciitis associated with intramuscular injection of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after uncomplicated endoscopic polypectomy. *J Infect* 2007;54(3):e145-8
75. Kalaivani V, Hiremath BV, Indumathi VA. Necrotising Soft Tissue Infection–Risk Factors for Mortality. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(8):1662-5
76. Turhan O, Büyüktuna SA, İnan D, Saba R, Yalçın AN. Clinical evaluation of forty-four patients with necrotizing fasciitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2011 Jan;17(1):29-32.
77. Yu SN, Kim TH, Lee E, et al. Necrotizing fasciitis in three university hospitals in Korea: a change in causative microorganisms and risk factors of mortality during the last decade. *Infect Chemother.* 2013 Dec;45(4):387-93
78. Dastidar SG, Ganguly K, Chaudhuri K, Chakrabarty AN. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14(3):249-51.
79. Dutta NK, Mazumdar K, Seok SH, Park JH. The anti-inflammatory drug Diclofenac retains anti-listerial activity in vivo. *Lett Appl Microbiol.* 2008 Aug;47(2):106-11
80. Mazumdar K, Dastidar SG, Park JH, Dutta NK. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: an antibacterial drug target. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 ;28(8):881-91.

81. Kim SK, Kim TH, Lee KC. Nicolau syndrome after intramuscular injection: 3 cases. *Arch Plast Surg*. 2012;39(3):249-52.
82. Luton K, Garcia C, Poletti E, Koester G. Nicolau Syndrome: three cases and review. *Int J Dermatol*. 2006 Nov;45(11):1326-8.
83. Guibal F, Muffat-Joly M, Terris B, Garry L, Morel P, Carbon C. Effects of diclofenac on experimental streptococcal necrotizing fasciitis (NF) in rabbit. *Arch Dermatol Res*. 1998 Nov;290(11):628-33.
84. Eter EG, Khazzaka A, Mneimneh W, Karam - Sarkis D, Haddad A, Sarkis R. Does diclofenac increase the risk of cervical necrotizing fasciitis in a rat model? *Int J Exp Pathol*. 2009;90(1):58-65.
85. Weng TC, Chen CC, Toh HS, Tang HJ. Ibuprofen worsens *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in mice. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011;44(6):418-23.
86. Aronoff DM, Bloch KC. Assessing the relationship between the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and necrotizing fasciitis caused by group A streptococcus. *Medicine* 2003; 82(4), 225-235.
87. Norrby-Teglund A, Chatellier S, Low DE, McGeer A, Green K, Kotb M. Host variation in cytokine responses to superantigens determine the severity of invasive group A streptococcal infection. *Eur J Immunol*. 2000; 30(11):3247-55.
88. Nizet V. Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol* 2007 120: 13–22.
89. Olsen RJ, Musser JM. Molecular pathogenesis of necrotizing fasciitis. *Ann Rev Pathol* 2010; 5: 1–31.
90. Mishalian I, Ordan M, Peled A, et al. Recruited macrophages control dissemination of group A *Streptococcus* from infected soft tissues. *J Immunol*. 2011 Dec 1;187(11):6022-31.
91. Dogan DM, Ataoglu H, Akarsu ES. Nimesulide and diclofenac inhibit lipopolysaccharide - induced hypothermia and tumour necrosis factor - α elevation in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2002 Aug;16(4):303-9.