

**T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



ANATOMİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL FEKAL PERİTONİT
OLUŞTURULAN SIÇAN BEYİNLERİNDE
APOPTOTİK DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ**

**Dr. Murat UYSAL
Uzmanlık Tezi
Bursa-2008**

**T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



ANATOMİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL FEKAL PERİTONİT
OLUŞTURULAN SIÇAN BEYİNLERİNDE
APOPTOTİK DEĞİŞİKLİKLERİN
İNCELENMESİ**

**Dr. Murat UYSAL
Uzmanlık Tezi
Bursa-2008**

Danışman: Doç. Dr. M. Ayberk KURT

İÇİNDEKİLER

1.	İçindekiler	i
2.	Kısaltmalar	iii
3.	Türkçe Özet	vi
4.	İngilizce Özet	viii
5.	GİRİŞ	1
5-1.	Sepsis Terminolojisi	3
5-2.	Sepsis Epidemiyolojisi	6
5-2-1.	Sepsis İnsidansı	6
5-2-3.	Sepsiste Mortalite Oranları	9
5-2-4.	Predispozan faktörler	10
5-3.	Sepsise Neden Olan Mikroorganizmalar	13
5-4.	Sepsis Patofizyolojisi	18
5-5.	DeneySEL Sepsis Modelleri	25
5-5-1.	Lipopolisakkarit Modeli	25
5-5-2.	Bakteriyel İnfüzyon Modelleri	27
5-5-3.	Peritonit modelleri	29
5-6.	Sepsis ve Apoptoz	31
5-6-1.	Apoptoz	31
5-6-2.	Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	36
5-6-2-1.	Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	36
5-6-2-2.	Histokimyasal Yöntemler	38
5-6-2-3.	Biyokimyasal Yöntemler	40
5-6-2-4.	Moleküler Biyoloji Yöntemleri	41
5-6-3.	Sepsis-Apoptoz ilişkisi	41

5-7.	Sepsisle İlişkili Ensefalopati	45
5-8.	Sepsisle İlişkili Ensefalopati'nin Patofizyolojisi	48
5-9.	Çalışmanın Amacı	56
6.	GEREÇ VE YÖNTEM	58
6-1.	Deney Hayvanları	58
6-2.	Nörolojik Değerlendirme	58
6-3.	Abdominal Cerrahi	59
6-4.	Vital parametrelerin monitorizasyonu	63
6-5.	Beyin Elektriksel Aktivitesinin Değerlendirilmesi	66
6-5-1.	Elektrokortikografi Kayıtlarının Alınması	68
6-5-2.	Somatosensorial Uyarılmış Potansiyel Kayıtlarının Alınması	70
6-6.	Kan Örnekleri ve Kan Kültürleri	72
6-7.	Tam Kan Sayımı ve Kan Laktat Değerlerinin Ölçümü	73
6-8.	Dokuların Elde Edilmesi	74
6-9.	İmmünohistokimya	77
6-9-1.	TUNEL Metodu	77
6-9-2.	Kaspaz-3 İmmünohistokimyası	78
6-9-3.	Transglutaminaz İmmünohistokimyası	79
6-10.	Hücre Sayımı	79
6-11.	İstatistik	80
7.	BULGULAR	81
8.	TARTIŞMA	104
9.	SONUÇ	152
10.	KAYNAKLAR	160
11.	TEŞEKKÜR	197
12.	ÖZGEÇMİŞ	198

KISALTMALAR

ACCP	Amerikan göğüs hekimleri birliği
AEP	İşitsel uyarılmış potansiyel
AI	Agranüler insüler korteks
AIDS	Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
ARDS	Akut respiratuar distress sendromu
ATS	Amerikan göğüs cerrahisi derneği
AVPe	Anteroventral periventriküler nükleus
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CA	Cornu ammonis
CASP	Colon ascendens stent peritoniti
CDC	Hastalık kontrol merkezleri
ÇLP	Çekum bağlama ve delme yöntemi
DG	Dentate gyrus
DIC	Yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu
DMD	Dorsomedial hipotalamik nükleus
DNA-PK	DNA-protein kinaz
ECoG	Elektrokortikografi
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EEG	Elektroensefalografi
EM	Elektron mikroskobu
EMB	Eosin Metilen Blue
ESICM	Avrupa yoğun bakım derneği
FFT	Hızlı Fourier transform
FISC	Flouorescein isothiocyanate

GI	Granüler insüler korteks
HB	Hematoksilen boyama
Hb	Hemoglobin
Htc	Hematokrit
ICAM	İntersellüler adezyon molekülü
ICE	İnterlökin 1 dönüştürücü enzim
IFN- γ	İnterferon-gamma
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
Irt	İntermediate retiküler nükleus
LEP	Lazer uyarılmış potansiyel
LPB	Lipopolisakkarid bağlayıcı protein
LPS	Lipopolisakkarid
LTP	Uzun süreli güçlendirme
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MLAEP	Orta mesafeli işitsel uyarılmış potansiyel
MnPO	Median preoptik nükleus
MODS	Multipl organ disfonksiyon sendromu
MYD88	Myeloid farklılaşma faktörü 88
NFkB	Nükleer faktör kappa beta
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
NO	Nitrik oksit
OAB	Ortalama arteriyel basınç
OH ⁻	Hidroksil radikali

ONOO ⁻	Peroksinitrit
PAF	Platelet aktive edici faktör
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PeF	Perifornikal nükleus
PFGE	Pulsed-field jel elektroforezi
PGE2	Prostoglandin E2
PI	Propidium iyodür
POD	Peroksidaz
RGA	Rostral göç akımı
RVLM	Rostral ventrolateral medulla
SCCM	Yoğun bakım derneği
SEF	Spektral edge frekansı
SEP	Somato-sensorial uyarılmış potansiyel
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SİE	Sepsisle ilişkili ensefalopati
SVZ	Subventriküler bölge
TF	Doku faktörü
TLR	Toll like reseptörü
TNF- α	Tümör nekroz faktör-alfa
TSST-1	Toksik şok sendromu toksini-1
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü
VPPC	Ventroposterior parvosellüler nükleus
Vx-SEP	Vertex-Somatosensoriyal uyarılmış potansiyel
ZI	Zona inserta

ÖZET

Sepsis, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların %14-37'sinde görülmekte ve günümüzdeki ilerlemiş tıbbi tedavi olanaklarına rağmen hala korkulan bir sağlık problemi olma özelliğini sürdürmektedir. Sepsis tanısı konan yoğun bakım hastalarının %8 ila 70'inde ise sepsisle ilişkili ensefalopati (SİE) gelişmektedir. Çalışmamızda yaygın bir sepsis modeli olarak uygulanan çekal ligasyon ve perforasyon (ÇLP) yöntemi kullanılarak sıçanlarda oluşturulan septik tabloda vital parametrelerin, kan tablosu ve kan kültürü sonuçlarının, beyin elektriksel aktivitesinin ve beynin değişik bölgeleri üzerinde apoptotik hücre ölümleri açısından oluşturduğu etkilerin araştırılması ve insanlarda görülen tablo ile olan benzerlik ve farklılıkların irdelenmesi amaçlandı. Bu amaçla 24 erkek Wistar sıçanı kullanıldı ve ÇLP, sham-opere ve opere edilmeyen kontrol grubu olmak üzere üç ayrı gruba ayrıldı. Vital parametreler her üç deney grubunda 0, 2, 6, 12 ve 24. saatleri kapsayacak şekilde non invaziv olarak monitorize edildi. Eş zamanlı olarak, beyin elektriki aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile her üç gruptaki deney hayvanlarının Elektrokortikografik (ECoG) ve Somatosensoriyel Uyarılmış Potansiyel (SEP) kayıtları alındı. Ayrıca operasyon sonrası 24. saatte çıkarılan beyinlerden elde edilen parafin kesitler, TUNEL yöntemine ek olarak kaspaz-3 ve transglutaminaz immunohistokimya yöntemleri ile işaretlenerek gyrus dentatus (DG), cornu ammonis (CA), subventriküler bölge (SVZ) ve çeşitli otonomik merkezlerdeki apoptotik değişiklikler araştırıldı.

ÇLP grubunda, kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında çalışmanın 24. saatinde kan basıncında belirgin bir düşme ve kalp atım hızında ise bunun tersi olarak artış gözlemlendi. Deney hayvanlarından elde edilen ECoG kayıtları, ÇLP grubunda spektral edge frekansı (SEF95) ve medyan frekans (MF) değerlerinde bir miktar azalmayı ve delta aktivitesinde artışı gösterirken; SEP kayıtlarında ise U-P1 ve N1-P2 mesafelerinde uzama ve P1 dalgasına ait amplitüdde düşüş gözlemlendi. ÇLP grubunda pozitif kan kültürü sonuçlarının yanı sıra trombositopeni ve artmış kan laktat seviyeleri gözlemlendi. İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına bakıldığında ise ÇLP grubunda TUNEL yöntemiyle işaretlenen apoptotik hücre sayısının median

preoptik nükleus (MnPO), subventriküler bölge (SVZ), gyrus dentatus (DG), cornu ammonis-1 (CA1) ve cornu ammonis-3 (CA3) alanlarında anlamlı oranda yüksek olduğu belirlendi. Bununla birlikte nucleus tractus solitarius (NTS), ventroposterior parvosellüler nükleus (VPPC), anteroventral periventriküler nükleus (AVPC), granüler insular korteks (GI), agranüler insular korteks (AGI), perifornikal nükleus (PeF), zona inserta (ZI), dorsomedial hipotalamik nükleus (DMD) ve rostral ventrolateral medulla (RVLM)'da ise TUNEL pozitif hücre sayısı açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kesitlerin kaspaz-3 immünohistokimya boyaması sonucu ÇLP grubunda, TUNEL boyamasını destekler şekilde SVZ, median preoptik nükleus, CA1 ve CA3 alanlarında kaspaz-3 ve transglutaminaz immünohistokimya yöntemiyle pozitif boyanmanın olduğu görüldü.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, sıçanlarda uygulanan ÇLP modelinin yaklaşık olarak 24 saatlik dönem açısından sepsisli hastalarda ortaya çıkan klinik sepsis tablosuna benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Buna ek olarak immünohistokimyasal yöntemlerle boyanmış histolojik kesitlerden elde edilen veriler doğrultusunda SİE'deki patofizyolojik değişikliklerde en azından SVZ, DG, CA1, CA3 ve MNPO alanları için apoptotik hücre ölümlerinin de rol oynayabileceğine ilişkin önemli deliller elde edilmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları, beyinde gerçekleşen apoptotik hücre ölümlerinin engellenmesine yönelik tedavi yaklaşımları sayesinde sepsisli hastaların beyin fonksiyonlarında düzelme ve mortalitede ise azalma sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Sepsis, sepsisle ilişkili ensefalopati, ECoG, SEP, apoptoz, TUNEL, kaspaz-3, çekal ligasyon ve perforasyon

ABSTRACT

Sepsis occurs in 14-37% of patients admitted to non-cardiac intensive care units and despite substantial recent progress in medical treatment; it continues to be a serious clinical challenge. Sepsis Associated Encephalopathy (SAE) occurs in 8 to 70% of all critically ill patients suffering from sepsis. The primary aim of this study is to characterize the cecal ligation and puncture (CLP) model, which is one of the most widely used models of sepsis, and define its similarities to and differences in human disease using the vital and hematologic parameters, blood cultures and brain electrical activity as well as investigating the apoptotic effect of CLP on the different brain regions. For this aim, 24 male Wistar rat divided into the three groups; CLP, sham operated and non-operated control groups, were used. Noninvasive methods were used for the monitorization of vital parameters at 0, 2, 6, 12 and 24 hours for all three groups. Electrocorticographic (ECoG) and somatosensorial evoked potentials (SEP) were further recorded for analysis of the brain electrical activity at corresponding times. Furthermore, apoptotic cell death in the dentate gyrus (DG), cornu ammonis (CA), subventricular zone (SVZ) and central autonomic centers were investigated using TUNEL, caspase-3 and transglutaminase immunohistochemistry methods.

A significant reduction in mean arterial pressure and an increase in heart rate was observed in CLP group compared the sham-operated and un-operated groups at the 24 hours of the experimental period. ECoG recordings revealed a slight decrease in median frequency (MF) and spectral edge frequency (SEF95) and an increase in delta activity while decreased P1 amplitude and elongated U-P1 and N1-P2 latencies observed within SEP recordings for CLP group. In addition to positive blood culture results, thrombocytopenia and increased blood lactate levels also found in CLP group. Immunohistochemical examination of brain tissues from CLP group showed significantly higher number of TUNEL positive apoptotic cells in the median preoptic nucleus, SVZ, DG, CA1 and CA3. However, there were no

significant difference between the groups at nucleus tractus solitarius (NTS), ventroposterior parvocellular nucleus (VPPC), anteroventral periventricular nucleus (AVPC), granular insular cortex (GI), agranular insular cortex (AGI), perifornical nucleus (PeF), zona incerta (ZI), dorsomedial hypothalamic nucleus (DMD) and rostral-ventrolateral medulla (RVLM) for the TUNEL positive cells. Caspase-3 and transglutaminase positive cells further detected at the SVZ, median preoptic nucleus, DG, CA1 and CA3 within CLP group in line with the results obtained using TUNEL staining.

The results of the current study have demonstrated that the CLP rats closely resemble the clinical condition of human sepsis in a period of 24 hours following CLP procedure. Furthermore, immunohistochemical observations support the hypothesis that apoptotic cell deaths would contribute to the pathophysiology of the SIE observed at least in the SVZ, DG, CA1, CA3 and MNPO regions. The results of the current study would suggest that the therapeutic strategies that would specifically inhibit the apoptotic cell death in various brain regions may improve clinical outcome of patient with sepsis.

Key words: Sepsis, sepsis associated encephalopathy, ECoG, SEP, apoptosis, TUNEL, caspase-3, cecal ligation and puncture

GİRİŞ

Tıp ve tıbbi teknoloji alanında yaşanan gelişmeler kanserli, metabolik hastalığı ve immün yetmezliği olan hastaların yaşam sürelerini uzatmaktadır. Değişik amaçlarla kullanılan kateterler ve diğer invaziv yöntemler yaygın olarak kullanılabilir hale gelmekte, kanserli hastalarda ve organ transplantasyonu yapılan kişilerde kortikosteroidlerin ve diğer bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı yaygınlık kazanmaktadır. Bu olumlu gelişmeler hastaların yaşam sürelerini uzatırken, beraberinde de son derece önemli bir başka sorun olan enfeksiyonu gündeme getirmekte ve bu tabloda yer alan enfeksiyonların en ağır şeklini ise sepsis ve septik şok oluşturmaktadır (1-3). Sepsis, günümüzde yaygın olarak kabul edilen görüşe göre enfeksiyon sırasında ortaya çıkan "sistemik inflamatuvar yanıt sendromu" (SIRS) olarak tanımlanmaktadır. Genellikle bu yanıt taşikardi, taşipne, hipotermi/hipertermi ve lökositoz/lökopeni gibi klinik bulgulardan en az iki tanesinin varlığı ile karakterizedir (4). Sepsis, tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere ve patofizyolojisi hakkındaki bilgilerimizde pek çok ilerleme kaydetmiş olmamıza rağmen önem ve ciddiyetini kaybetmemiş olan bir hastalık tablosu olarak göze çarpmaktadır. Son yıllarda hücre biyolojisinde gerçekleşen ilerlemeler sayesinde sepsisin patofizyolojisi daha iyi anlaşılabilir hale gelmiş, olayda rol alan mediyatörler ve sitokinler tanımlanarak, bunların etki mekanizmaları ve vücutta meydana getirdikleri zincirleme metabolik değişimler belirlenmiştir. Bu çalışmaların sonucu olarak sepsisin, konakçının enfeksiyon etkenine karşı geliştirdiği bir grup yanıtlar dizisi olduğu ve klinik bulgulardan büyük oranda salınan sitokinlerin sorumlu olduğu anlaşılmıştır (5). Yabancı mikroorganizmalar ve onların endotoksin gibi ürünlerinin, konakçı organizmanın hücresel defans mekanizmalarını tetikleyerek TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler ile birlikte, çok sayıda inflamatuvar mediyatörü aktive ettikleri saptanmıştır (6). Sitokinler ve inflamatuvar mediyatörler arasında pek çok karmaşık ilişkiler ortaya çıkmakta, nötrofiller aşırı ve kontrolsüz biçimde aktifleşmekte, kompleman sistemi, trombosit agregasyonu, araşidonik asit metabolizması uyarılmakta ve sonuç olarak hedef durumundaki mikrovasküler endotelde hasarlanma gerçekleşmektedir.

(1). Gelişen endotel hasarı ve doku perfüzyonunda azalma neticesinde çeşitli organ fonksiyonlarında bozulma oluşmakta ve sonuç olarak sepsisli hastalar ortaya çıkan “multipl organ yetmezliği sendromu” (MODS) ile kaybedilmektedir (7).

Sepsis, geniş endotel hasarı, ilerleyici organ yetmezliği ve kontrol dışı inflamasyon ile birlikte ortaya çıkardığı ciddi ve kalıcı hasarlar sonucunda yoğun bakım olanaklarında, sıvı resusitasyonu ve cerrahi girişim konusunda meydana gelen gelişmelere rağmen yoğun bakım ünitelerinde önemli bir ölüm nedeni olmayı hala sürdürmektedir. Sepsisli hastaların yaklaşık yarısında şok gelişmekte ve buna bağlı olarak mortalite oranları %30-60 arasında bildirilmektedir (3, 8-13). Sepsis, non-koroner yoğun bakım ünitelerindeki en sık ölüm nedeni olup, CDC (Centers of Disease Control-Hastalık Kontrol Merkezleri)’e göre Amerika Birleşik Devletleri’ndeki tüm ölümler içinde 10. sırada yer almaktadır (14).

Sepsisin kalp, akciğer ve böbrekler gibi vital organlar üzerindeki etkilerini inceleyen pek çok çalışma bulunmaktayken, merkezi sinir sistemi ile ilişkili morfolojik ve moleküler araştırmaların sayısı patofizyolojinin anlaşılması için yeterli düzeyde değildir. İlerleyici sepsiste, hastaların yaklaşık yarısında kötü prognozun belirtisi olarak sepsisle ilişkili ensefalopati (SİE)’nin geliştiği bildirilmektedir. Genel bir yaklaşımla sepsis sonucunda ortaya çıkan beyin disfonksiyonu olarak tanımlanan SİE’de klinik olarak hafif konfüzyondan komaya kadar değişen bir tablo izlenmekte ve bir komplikasyon olarak hastalık tablosuna eklendiğinde mortalite oranlarında artışa yol açmaktadır. Sepsisli hastalarda SİE’nin görülme oranı %8-70 arasında değişebilmekte ve yoğun bakım ünitelerinde en sık karşılaşılan ensefalopati tipi olma özelliğini hala korumaktadır (15-20). Septik olayların ve sepsisle ilişkili ensefalopatinin hippocampus, subventriküler bölge ve santral otonomik merkezler gibi önemli santral sinir sistemi bölgeleri üzerine olan etkilerini anlamamıza kaynak sağlayacak yayınların sayısı oldukça sınırlıdır. Sepsis ve SİE patofizyolojisini açıklamaya yönelik gerçekleştirilen bu çalışmalarda; ağır sepsis sonucu kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin bozulduğu ve perimikrovasküler ödemin geliştiği, nöronlarda ve glial

hücrelerde apoptotik hücre ölümlerinin gerçekleştiği ve aktive olan inflamatuvar yollara bağlı olarak oksidatif hasarlanmanın, asit-baz dengesinde ve aminoasit düzeylerinde değişikliklerin olduğu bildirilmektedir (21-31). Ancak, sepsiste ortaya çıkan nörolojik komplikasyonlar ve sekellerin patofizyolojisi, primer hastalık ve mortalite ile ilişkisi ve akut dönem sonrası etkilerine yönelik morfolojik ve moleküler seviyelerde gerçekleştirilecek SİE çalışmalarıyla daha kesin verilerin elde edilmesine ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (32-40).

Sepsis Terminolojisi

Sepsis ve sepsise ilişkin klinik tabloların tanımında tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Literatürde sepsis, septisemi, piyemi, bakteriyemi, sepsis sendromu ve septik şok gibi terimlerin aynı amaçla yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Sepsis patogenezi üzerinde yapılan çalışmalar bu klinik tabloyu anlamamızda önemli ilerlemeler sağlamış, sepsis tanımını yeniden gözden geçirme zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Terminoloji konusunda bir uzlaşma oluşturmak amacıyla Amerikan Göğüs Hekimleri Birliği (American College of Chest Physicians (ACCP) ve Yoğun Bakım Derneği (Society of Critical Care Medicine (SCCM) birlikte sepsis ve septik şok, multi-organ disfonksiyonu gibi önemli sepsis sekelleri için yeni ve anlaşılabilir tanımlamalar, sınıflamalar geliştirmişlerdir (4). Bu uzlaşma konferansı sonrasında, sepsis spektrumu içinde yer alan terimler aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

- *Enfeksiyon*; mikroorganizmaların normalde steril olan konakçı dokularında bulunmasına veya bu dokuları istila etmesine bağlı olarak gelişen inflamatuvar cevap olarak tanımlanmaktadır.
- *Bakteriyemi*; kanda canlı bakteri bulunmasıdır.
- *Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS)*; birçok ağır klinik bulguya neden olan sistemik inflamatuvar cevap olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan (pankreatit, yanık, multipl travma gibi) nedenlere bağlı gelişebilmekte ve aşağıda belirtilen

bulgulardan en az ikisinin mevcut olması halinde bu tanım kullanılmaktadır.

- Vücut ısının 38 C°'nin üzerinde veya 36 C°'nin altında olması (hipertermi veya hipotermi)
 - Kalp hızının dakikada 90'nın üzerinde olması
 - Solunum hızının dakikada 20'nin üzerinde veya PaCO₂'nin 32 mmHg'den daha düşük düzeyde olması
 - Beyaz küre sayısının 12.000/mm³'ten daha yüksek veya 4000/mm³'ten daha düşük sayıda olması (lökositoz ve lökopeni) ya da genç hücre oranının %10'dan fazla bulunması.
- *Sepsis*; kanıtlanmış bir enfeksiyöz olayda gelişen SIRS olarak kabul edilmektedir.
 - *Ağır sepsis*; sepsisle birlikte aşağıdakilerden birinin bulunması durumunda kullanılmaktadır.
 - Organ disfonksiyonu
 - Perfüzyon bozukluğu (hipoperfüzyon) ve buna bağlı olarak gelişebilecek laktik asidoz, oligüri veya akut mental değişiklikler
 - Hipotansiyon (sistolik kan basıncının 90 mmHg'nin altında olması veya daha önceki düzeyin 40 mmHg altına düşmesi)
 - *Septik şok*; yeterli sıvı tedavisine rağmen hipotansiyonla birlikte perfüzyon bozukluklarının (*laktik asidoz, oligüri ve akut mental değişiklikler gibi*) devam etmesi olarak tanımlanmaktadır.
 - *Yanıtsız septik şok*; bir saatten daha fazla süren sıvı tedavisine cevap vermeyen ve vazopressör ajanlara ihtiyaç duyulan septik şok olarak tanımlanmaktadır.
 - *Multipl Organ Disfonksiyon Sendromu (MODS)*; sepsis ve SIRS sonucu iki veya daha fazla organ ya da organ sisteminin progresif fizyolojik disfonksiyonudur.

Her ne kadar sepsis, ağır sepsis ve septik şok gibi tanımlamalar yaygın ve faydalı olarak kabul edilse de sepsis patofizyolojisi konusundaki bilgilerin ilerlemesi ile uzlaşma toplantısında oluşturulan tanımlamaların spesifik olmadığı, açık bir sepsis tanımlaması yapmadığı ve heterojen bir çalışma popülasyonu içerdiği iddia edilmektedir (41-44). Avrupa Yoğun Bakım Derneği (European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)) ve Yoğun Bakım Derneğinin (Society of Critical Care Medicine (SCCM)) düzenlediği bir ankette, katılımcıların %70'nin ortak bir tanımının bulunmadığı tespit edilmiştir (45). Bu tablo 1992 uzlaşma konferansı sonrasında kabul edilmiş olan sepsis tanımlamalarının yeniden gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Nitekim SCCM, ESICM, ACCP ve Amerika Göğüs Cerrahisi Derneği (American Thoracic Surgery (ATS))'nin sponsorluğunda 2001 yılında düzenlenen Uluslararası Sepsis Tanımlamaları Konferansında (International Sepsis Definitions Conference) 1992 tanımlamaları güncellenerek daha spesifik hale getirilmeye çalışılmış ve buna ek olarak İngilizce akronimi PIRO olan evreleme sistemi önerilmiştir (42).

- P (Predisposition): Sepsisin gelişmesine yatkınlık
- I (Infection): Sepsise neden olduğu bilinen enfeksiyon
- R (Response): Sepsise karşı gelişen inflamatuvar yanıt
- O (Organ failure): Organ yetmezliği

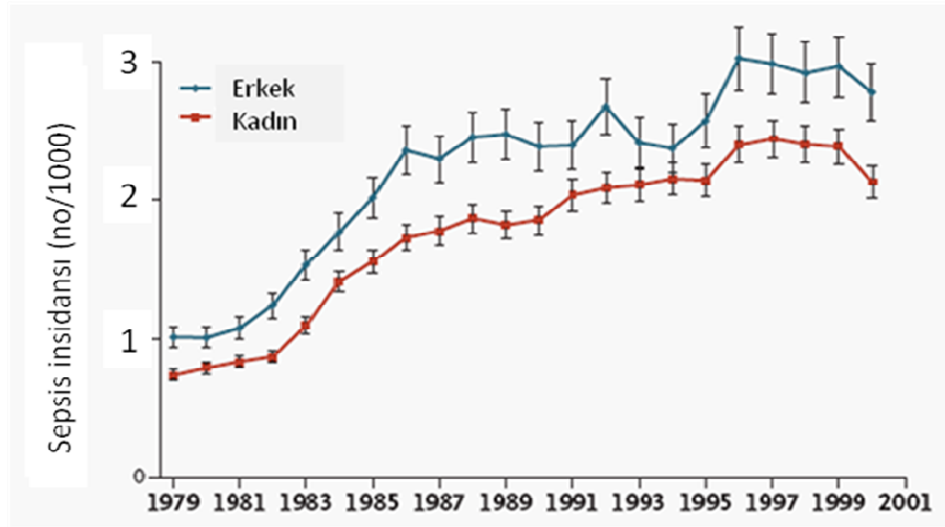
PIRO sisteminin ortaya çıkmasına neden olan temel gerekçe 1992 tanımlamalarının hastaların enfeksiyona verdiği cevabın hangi dönemde olduğunu tam olarak ortaya koyamadığı düşüncesidir (42, 46). Sepsis ve sepsise ilişkin klinik tablolara yönelik tanımlamaların hastalığın evrelerini belirlemede yetersiz olduğu kabul edilmekte ve sepsis evrelerini belirlemede PIRO sisteminin kullanılması önerilmektedir. Ancak PIRO sisteminin mevcut haliyle yetersiz olduğu ve yaygın olarak kullanıma geçirilmeden önce geliştirilmeye ihtiyaç duyduğuna dair görüşler de bildirilmektedir (42, 44, 47).

Sepsis Epidemiyolojisi

i. Sepsis insidansı

Sepsisin toplumdaki yaygınlığını saptayabilmek, sepsis ile ilişkili risk faktörlerini ortaya koyabilmek, yeni tedavi yöntemleri geliştirebilmek ve sağlık harcamaları ile ilgili etkili politikalar oluşturabilmek amacıyla sepsise yönelik epidemiyolojik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda yapılan birçok çalışma, sepsisin görülme sıklığının tüm dünya genelinde gün geçtikçe artış göstermekte olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle hastane enfeksiyonları arasında önemli yeri olan gram negatif bakterilerin meydana getirdiği sepsisin, yüksek mortalite ve morbiditenin yanı sıra önemli ekonomik kayıplara da neden olduğu bilinmektedir. 1990'lı yıllardan önce nadir bir klinik tanı olan sepsis, modern tıpta en önemli infeksiyon hastalıkları sorunlarından biri haline gelmiştir. Angus ve ark.'larının (3) yapmış oldukları çalışmaya göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 751.000 hastada ağır sepsis geliştiği tahmin edilmektedir. Martin ve ark.'larının (48) yaptığı çalışmada ise Amerika genelinde sepsisli vakaların sayısının yılda ortalama 660.000 civarında olduğu bildirilmektedir. Sepsisin toplumda görülme sıklığı ile ilgili olarak 0.5/1000 ila 3/1000 arasında değişen oranlar veren çalışmalar bulunmaktadır (3, 11, 12, 48-58). Martin ve ark.'larının (48) yaptığı çalışmaya göre Amerika Birleşik Devletleri'nde sepsis insidansı 1979 yılında 1000'de 0.8 iken, 2000 yılına gelindiğinde ise bu oran üç kat artış göstererek 1000'de 2.4 olarak hesaplanmıştır (Şekil-1). Dünya genelinde yapılan diğer birçok çalışmada da sepsisin görülme sıklığının günümüzde giderek artış gösterdiği bildirilmektedir (3, 11, 12, 54-56, 59, 60). Angus ve ark.'larına (3) göre, ağır sepsisin görülme sıklığı her sene ortalama %1,5 artış göstermektedir. Bu artışın Amerikan toplumundaki nüfus büyüme hızından daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Sepsisin bu hızda artış göstermeye devam etmesi halinde Amerika Birleşik Devletleri'nde 2010 yılında 934.000, 2020 yılında ise 1.110.000 yeni sepsis vakası olacağı tahmin edilmektedir. Angus ve ark.'larının (3) yaptıkları çalışmada herhangi bir nedenle hastaneye yatırılmış olan her 100 kişinin 2.26'sında ağır sepsis saptanmaktadır. Hastanede yatan hastalar arasındaki sepsis görülme sıklığına ilişkin olarak Amerika Birleşik

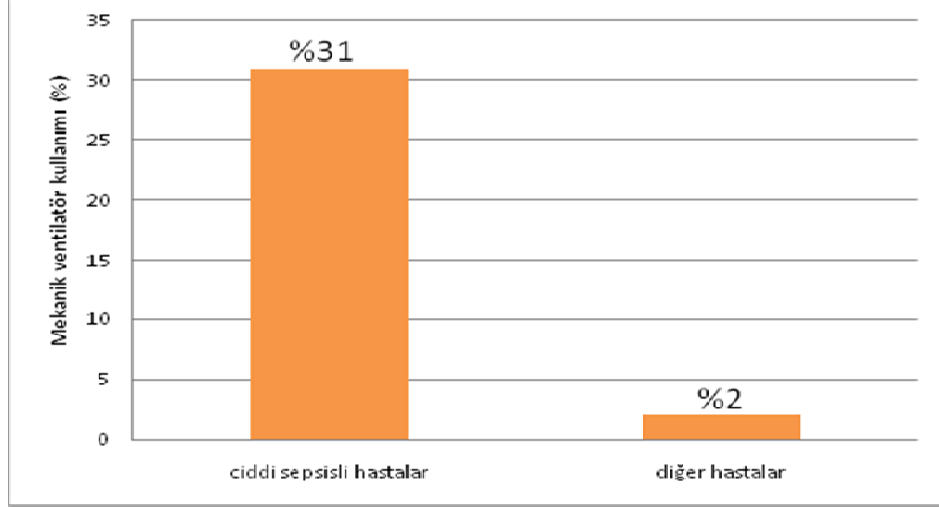
Devletlerinde yapılmış olan çalışmalarda 1.1/100 ila 3.3/100 arasında oranlar verilmektedir (3, 14, 48, 54, 61). Avusturalya'da bu oranın 1.1/100, Norveç'te 0.95/100 ve Hollanda'da ise 1.3/100 olduğu bildirilmektedir (51, 56, 62). Ülkemizde sepsis ile ilgili en geniş çalışma Hacettepe Üniversitesi'nde yapılmış olup bu çalışmada 1983-1989 yılları arasındaki yedi yıllık dönemdeki gram negatif bakteriyemi olguları değerlendirilmiş, yatan hastalar arasında insidansı 0.42/100 ve mortalitesi %45 olarak bulunmuştur (63).



Şekil 1: Sepsis insidansının Amerika Birleşik Devletleri'nde 1979-2000 yılları arasında gösterdiği değişim grafiği. (Martin ve ark. 2003. NEJM. 348:1546-1554)

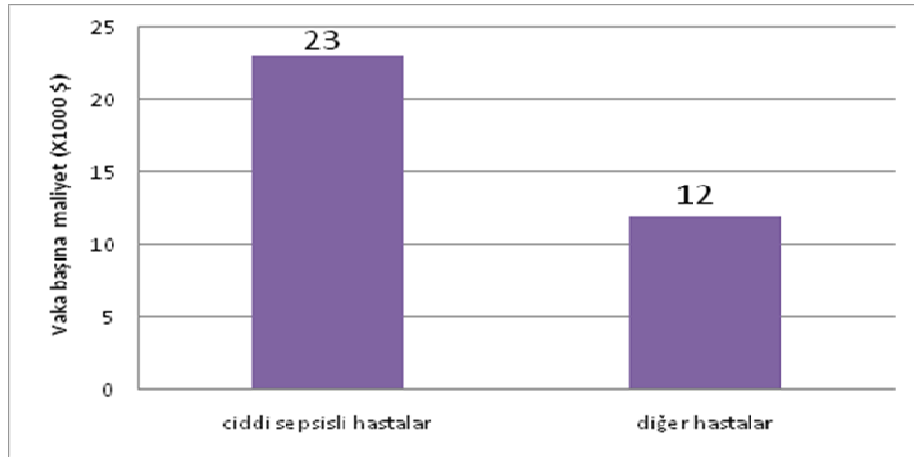
Yoğun bakım ünitelerine yatırılan hastaların %14 ila 37'sinde sepsis, % 10 ila 27'sinde ise ağır sepsis saptanmaktadır (3, 11, 12, 14, 49-52, 55-57, 64-68). Angus ve ark.'larının (3) yaptıkları çalışmada ağır sepsisli olguların yaklaşık yarısının (%51,1) yoğun bakım ünitesine alınarak tedavi edildiği bildirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nin New Jersey eyaletinde yapılan bir çalışmada (11) bu oran %56,3, İngiltere ve Kuzey İrlanda'da yapılan bir çalışmada (54) ise %59 olarak bildirilmektedir. Bu oranlar yoğun bakım ünitelerindeki cihazların (*mekanik ventilatör gibi*) ve kaynakların kullanımı açısından sepsisin önemli bir sağlık problemi olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil-2). Sepsisli hastalar genellikle uzun bir süre hastanede kalmakta, nadiren 2-3 haftadan önce yoğun bakım ünitesinden ayrılabilirler (46,

69, 70). Yoğun bakım ünitelerindeki hasta bakım masraflarının yüksek olması nedeniyle sepsisli hastaların tedavi masrafları kişi başına ortalama 20.000 \$ civarında hesaplanmaktadır (Şekil-3) (3, 71). Amerika Birleşik Devletlerinde sepsisli hastaların tedavi maliyetinin senelik olarak 17 milyar \$ civarında olduğu ileri sürülmektedir (3).



Şekil 2: Yoğun bakım ünitesinde yatan ciddi sepsisli hastalar ile diğer hastalar arasında mekanik ventilatör kullanım oranlarının karşılaştırılması.

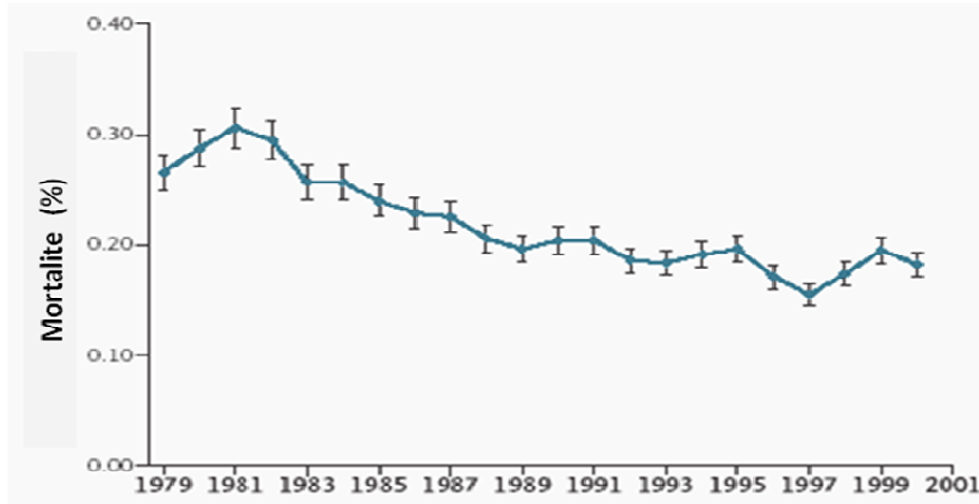
(MEDPAR-Hastane Taburcu Veritabanı (Hospital Discharge Databases),2004-2005)



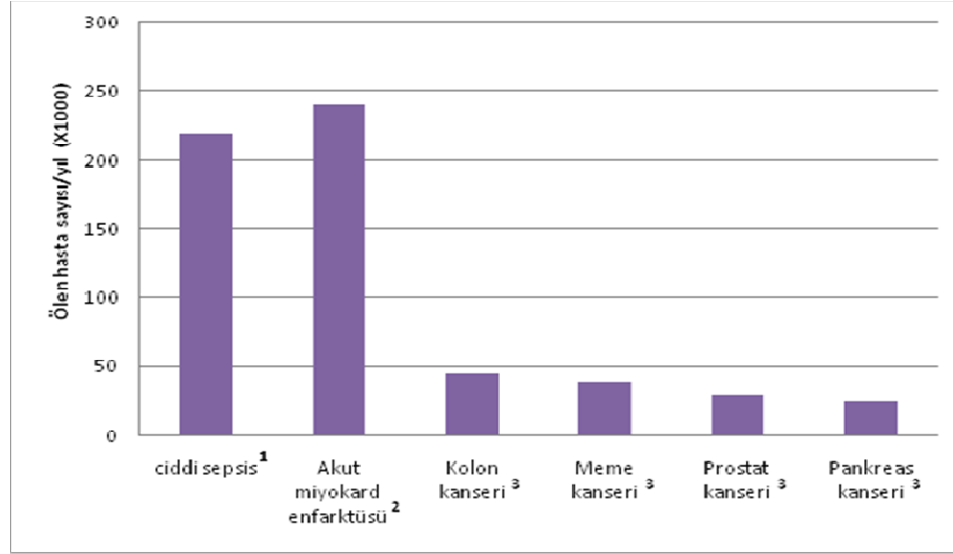
Şekil 3: Yoğun bakım ünitesindeki tedavi masraflarının ciddi sepsisli hastalar ve diğer hastalar arasında karşılaştırılması. (Angus ve ark. 2001. Crit Care Med. 29: 1303-1310)

ii. Sepsiste Mortalite Oranları

Sepsis, yoğun bakım ünitelerinde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak kabul edilmektedir. Yoğun bakım ünitelerindeki teknik gelişmelere ve infeksiyöz hastalıkların tedavisindeki ilerlemelere rağmen non-koroner yoğun bakım ünitelerindeki ölümler arasında sepsis en başta gelen ölüm nedeni olarak göze çarpmaktadır (3). Angus ve ark.'larının (3) yaptıkları çalışmada ağır sepsisli vakaların mortalite oranı %28.6 olarak bildirilmektedir. Geçmiş yıllara kıyasla sepsis mortalitesi yalnızca az bir miktar azalma göstermiştir (Şekil-4) (9-13). Sepsisli hastalar sıklıkla altta yatan ek bir medikal veya cerrahi probleme sahip olmakta ve bu durum mortalite oranlarına katkıda bulunarak sepsis mortalitesi genellikle yüksek oranlarda saptanmaktadır (8). Sepsise bağlı mortalite oranları, akut miyokard infarktüsündeki mortalite oranlarına benzerlik göstermekte iken kolon, meme ve prostat kanserine bağlı ölümlerin toplamından ise daha fazla olduğu hesaplanmıştır (Şekil-5) (3, 13, 72). Tüm bu veriler ışığında sepsisin dünya genelinde ciddi bir sağlık problemi olduğu ve bu problemin günümüzde de büyümeye devam ettiği görülmektedir.



Şekil 4: Amerika Birleşik Devletleri'nde 1979-2000 yılları arasındaki sepsisli hastalara ait mortalite oranları. (Matin ve ark. 2003. NEJM. 348:1546-1554)



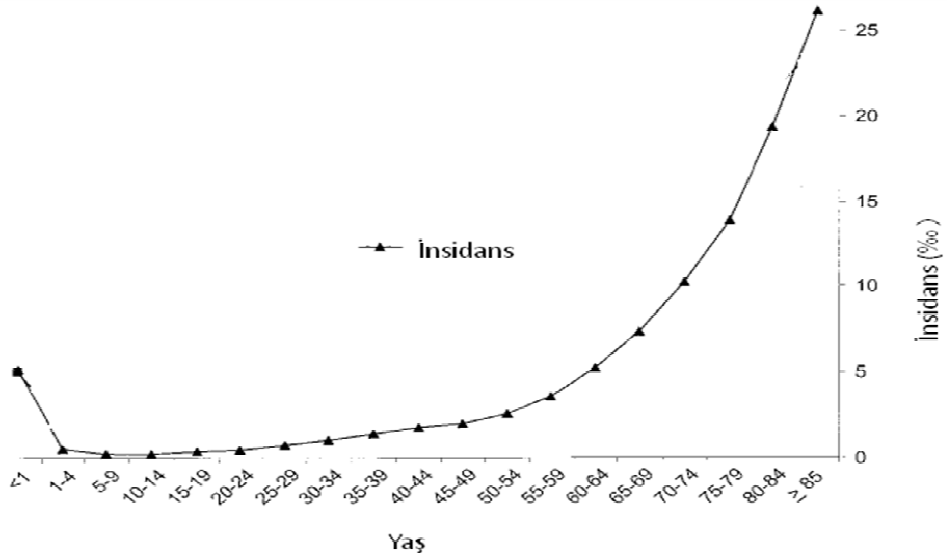
Şekil 5: Ciddi sepsisli, miyokard infarktüslü ve kanserli (kolon, meme, prostat ve pankreas kanseri) hastalar arasındaki mortalite oranları.

(1-Angus ve ark. 2001. Crit Care Med. 29: 1303-1310; 2- Minino ve Smith. 2001. Natl Vital Stat Rep. 49:1-40; 3-Amerikan Kanser Demeyi. 2001. http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0_2001.asp?sitearea=STT&level=1 verilerinden oluşturulmuştur.)

iii. Predispozan Faktörler

Sepsisin, herhangi bir kişide ve herhangi bir enfeksiyon sonrasında (örneğin; pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu veya gastroenterit gibi) gelişebildiği bilinmektedir (73). Fakat bazı kişilerin sepsis gelişimi açısından risk altında bulunduğu düşünülmektedir. Yaşlılar veya prematüre bebekler, bağışıklık sistemi baskılanmış (*AIDS, kemoterapi ve organ transplantasyonu gibi*) kişiler, genetik yatkınlığa sahip olan kişiler, daha önceden ek bir hastalığa (*kronik böbrek yetmezliği, konjestif kalp yetmezliği, diabetes mellitus, kronik obstruktif akciğer hastalığı ve siroz gibi*) sahip olanlar, yoğun bakım ünitesindeki hastalar, yanık, kurşun veya basınç yarası gibi yaraya sahip olanlar, intravenöz kateter, yara drenajı veya üriner kateter gibi invaziv prosedür uygulanan hastalar sepsis gelişimi açısından yüksek risk taşıyan kişiler olarak kabul edilmektedir (2, 7, 13, 61, 74, 75). Angus ve ark.'larının (3) yapmış oldukları çalışmaya göre ağır sepsisli vakaların yaklaşık olarak yarısının 65 yaş ve üstündeki hastalardan oluştuğu bildirilmektedir. Bu çalışmayla erişkinlerdeki sepsis insidansı ile yaş arasında doğrusal bir korelasyonun bulunduğu gösterilmiştir. Sepsis insidansı, yenidoğan döneminde neonatal sepsise bağlı olarak yüksek oranlarda seyretmekte fakat

daha sonrasında gerileyerek 5-14 yaş civarındaki çocuklarda en düşük değerlerine inmekte, bunu takip eden süreç içinde yaşla birlikte artış göstererek 85 yaş ve üstü hastalarda pik yapmaktadır (Şekil-6). Martin ve ark.'larının (48) yaptıkları çalışmaya göre sepsisli hastaların yaş ortalaması 1979 yılında 64,1 iken, 2002 yılında ise 68,2'ye yükselmiştir. Dünya genelinde yapılan diğer birçok çalışmada da sepsisli vakaların yaş ortalaması 60 yaş ve üstü olarak hesaplanmaktadır (3, 11, 12, 14, 50, 52, 54, 55, 57, 64, 66-68, 76, 77). Tüm bu veriler ışığında, sepsisin açık bir şekilde yaşlı nüfusa ait bir hastalık olduğu gözükmemektedir. İlerleyen tıbbi gelişmeler neticesinde insanların yaşam süreleri uzamakta ve bunun neticesinde artan yaşlı nüfusa paralel olarak sepsis insidansında da artışın meydana geleceği öngörülmektedir.

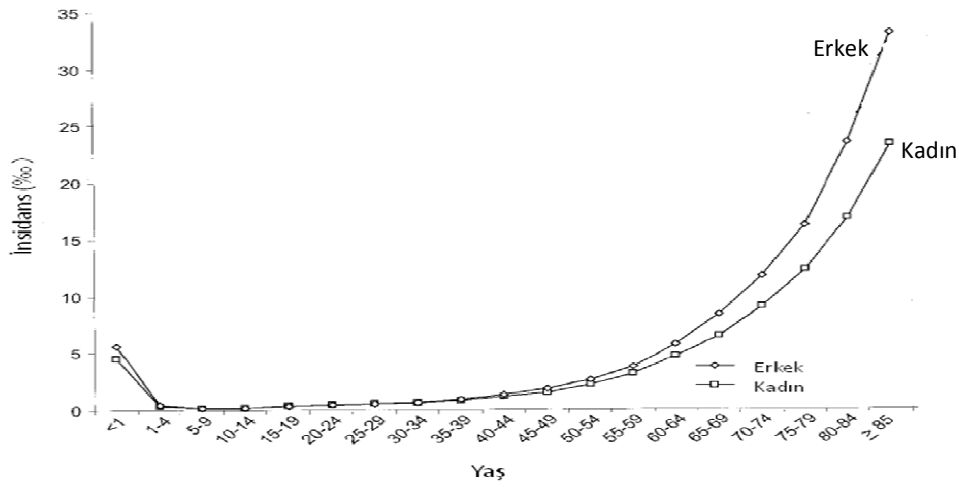


Şekil 6: Sepsis insidansı ile yaş arasındaki değişim grafiği.

(Angus ve ark. 2001. Crit Care Med. 29: 1303-1310)

Yaş faktörünün dışında ırk ve cinsiyetin de sepsisin görülme sıklığında etkili olduğu bildirilmektedir. Martin ve ark.'larının (48) yapmış oldukları çalışmada, erkeklerde kadınlara göre %30 daha fazla sepsis geliştiği bildirilmektedir. Sepsis açısından erkeklerdeki baskınlık, diğer epidemiyolojik çalışmalarda da göze çarpmaktadır (Şekil-7) (3, 11, 12, 14, 49, 50, 54-57, 64, 68, 76). Sepsiste görülen cinsiyet farklılığını açıklayabilecek kısıtlı sayıda faktör tanımlanmıştır. Erkek ve kadınlar arasındaki hormonal farklılık,

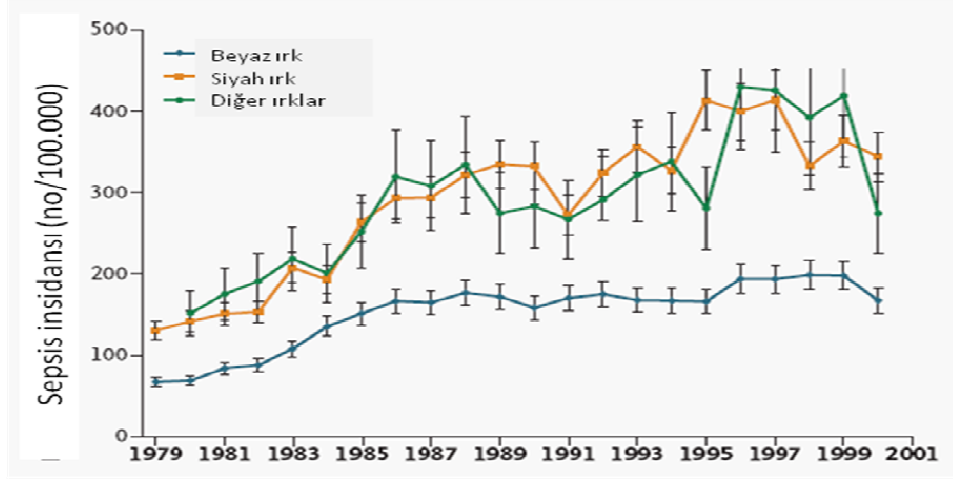
erkeklerde travmatik yaralanma sonrası sepsis gelişme sıklığının daha fazla olması ve sepsise neden olan infeksiyonun tipi ve kaynağı açısından iki cinsiyet arasında farklılığın gözlenmesi bu durumu açıklayabilecek faktörler arasında yer almaktadır (58, 78). Östrojen seviyeleri ile plazma sitokin dengesi arasındaki ilişkinin sepsisteki cinsiyet farklılığına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (79, 80). Hormonal manipülasyon sonrasında erkek hayvan modellerinde dişilere kıyasla sepsise bağlı ölüm oranları azaltılabilmektedir (81).



Şekil 7: Sepsis insidansı ile cinsiyet arasındaki değişim grafiği.

(Angus ve ark. 2001. Crit Care Med. 29: 1303-1310)

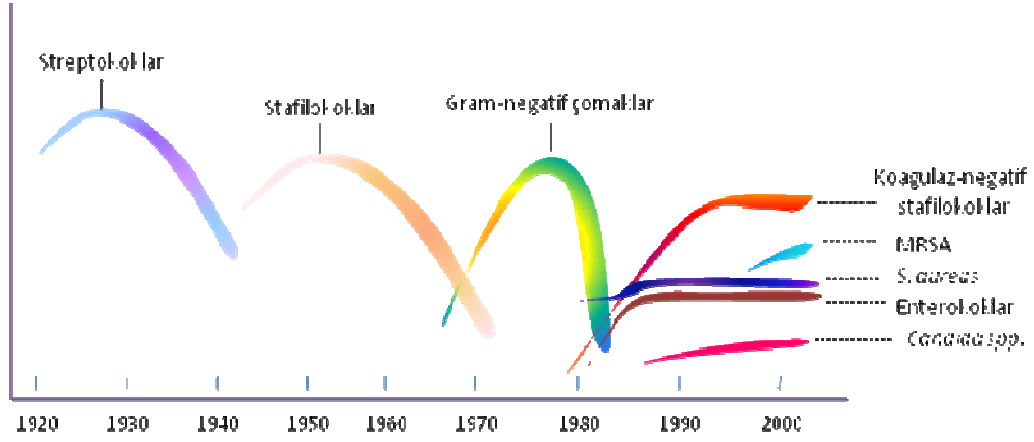
Amerika Birleşik Devletleri'ndeki siyah popülasyonun, beyazlara göre sepsis gelişimi açısından iki kat daha fazla risk taşıdığı gösterilmiştir (Şekil-8). Siyah ırktaki sepsisli hastaların daha genç yaşlarda olduğu ve daha ciddi bir hastalık seyrine sahip olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak siyahlarda gram pozitif infeksiyonlara bağlı sepsis insidansı beyazlara kıyasla daha yüksek oranlarda bildirilmektedir (58). TLR-2 (Toll-like reseptör-2)'nin, gram pozitif infeksiyonlara verilen cevapta doğal bağışıklık açısından önemli bir rolü olduğu kabul edilmektedir. TLR-2'deki yapı ve ekspresyonla ilgili mutasyonlara bağlı olarak bu patojenlere karşı oluşan immün yanıtta değişiklikler meydana gelebilmektedir. TLR-2 genindeki farklılığa bağlı olarak, siyahlarda beyazlara kıyasla gram pozitif enfeksiyonlara bağlı sepsisin daha sık geliştiği düşünülmektedir (58, 82).



Şekil 8: Sepsisin beyazlarda, siyahlarda ve diğer ırk temsilcilerindeki görülme sıklığı.
(Martin ve ark. 2003. NEJM. 348:1546-1554)

Sepsise Neden Olan Mikroorganizmalar:

Sepsisli vakaların büyük bir kısmından bakteriler sorumlu olsa da mantarlar, parazitler ve nadiren virüsler de sepsise neden olabilmektedir (83-85). Sepsise yol açan mikroorganizmaların sıklığı sepsisin hastane içinde veya hastane dışında gelişmiş olmasına göre değişiklik göstermektedir. Toplumda kazanılmış sepsis olgularında en sık izole edilen mikroorganizmalar sıklık sırasına göre Escherrichia coli, Streptococcus pneumoniae ve Staphylococcus aureus olarak bildirilmektedir (86, 87). Hastane içinde gelişen sepsisten sorumlu mikroorganizmalar ise yıllara göre bazı değişiklikler göstermektedir. Antibiyotiklerin kullanım alanına girmesinden önceki 1950'li yıllarda gram-pozitif bakteriler ön sıralarda olup Staphylococcus aureus ve Streptococcus pyogenes'in sıklıkla etken olarak saptandığı göze çarpmaktadır. Ancak antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile gram-pozitif bakterilerin neden olduğu hastalıklar tedavi edilebilir hale gelmiş ve 1960, 70 ve 80'li yıllarda gram negatif bakteriler gittikçe artan oranda sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır (1, 48, 87-90). Son yıllarda ise gram-pozitif mikroorganizmalara bağlı sepsis insidansında belirgin bir artış göze çarpmaktadır (Şekil-9).



Şekil 9: Sepsise neden olan mikroorganizmaların yıllara göre gösterdiği değişim grafiği.

1990'lı yıllardan günümüze dek yapılan birçok sepsis çalışması gram-pozitif bakterilerin gram negatiflere oranla daha yaygın hale geldiğini işaret etmektedir (9, 48, 55, 56, 60, 66, 91-108). Bakteri spektrumunun tekrar gram pozitif mikroorganizmalara kayma nedenleri arasında hızla kullanıma giren 3. kuşak sefalosporinler ve kinolonlar gibi gram-negatif bakterilere çok etkili yeni antibiyotiklerin kullanımının artması, tıbbın artan olanakları ile daha uzun süre yaşama imkanı sağlanan kanserli hastalarda uzun süreli kalıcı intravasküler kateter uygulamasının artması, değişik vücut içi protez (kalça, diz gibi eklem protezleri ve kalp kapakçıkları) kullanımının artması ve kronik periton diyalizi gibi yöntemlerin geliştirilmesi sayılabilir (56, 89, 109-113).

Birçok vücut bölgesinde yabancı materyallerin kullanıma girmesi sonucunda bu materyallere yapışabilme özelliği olan koagülaz negatif stafilkokokların etken oldukları sepsis insidansında belirgin bir artış gözlenmektedir (Şekil-9) (97, 105, 114). Amerika Birleşik Devletleri'nde intravasküler kateter ile ilişkili enfeksiyonlar önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak kabul edilmektedir (115). Hastalara intravenöz sıvı tedavisi uygulayabilmek, kan ürünleri ve parenteral nütrisyon sıvıları verebilmek, hastanın hemodinamik durumunu gözlemleyebilmek ve gerekli hastalarda hemodiyaliz sağlayabilmek amacıyla intravasküler kateter uygulaması yaygın olarak kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde her sene 150 milyon adet intravasküler alet kullanıldığı ve bu aletlerin yaklaşık olarak 5 milyon adetinin santral venöz kateter olduğu bildirilmektedir (116, 117). Santral

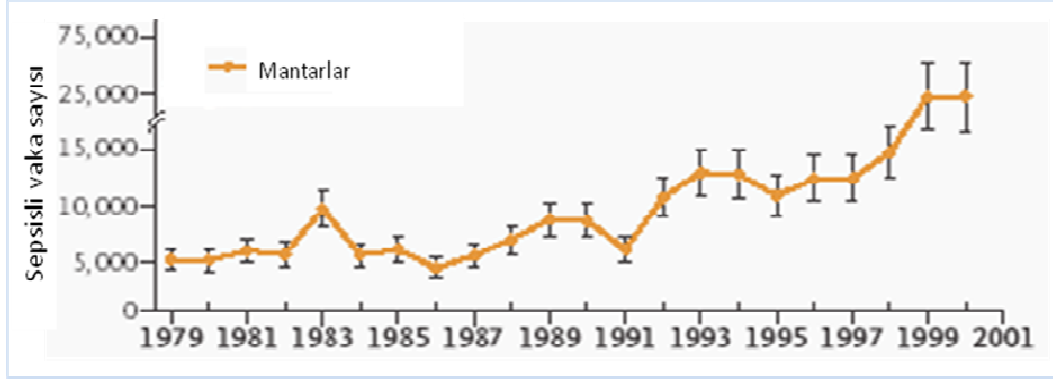
venöz kateter uygulamasının, sepsis gelişimi açısından risk faktörleri arasında yer aldığı bilinmektedir (2). Günümüzde santral venöz kateter kullanımındaki artışa paralel olarak stafilokoklara bağlı enfeksiyonların dramatik olarak artış gösterdiği ve bu durumun gram pozitif bakterilere bağlı sepsis insidansını belirgin olarak arttırdığı düşünülmektedir (117).

Değişik çalışmalarda gram-pozitif bakterilerin sepsisli hastalarda %28-74, gram-negatif bakterilerin ise %20-65 arasında etken olarak izole edildiği bildirilmektedir (3, 14, 48, 55, 56, 60, 64, 66, 76, 93, 99, 103, 104, 108, 118, 119). Gram-negatif bakteriyel sepsislerde *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* ve *Klebsiella* türleri en sık izole edilen etkenler olarak göze çarpmaktayken gram-pozitif bakteriyel sepsislerde ise koagülaz negatif stafilokoklar, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve enterokok türleri en sık izole edilen etkenler arasında yer almaktadır (Tablo-1) (74, 84, 90, 120). Bütün sepsis olgularının yaklaşık olarak %5-15'inden anaerob bakteriler sorumlu tutulmaktadır (87, 120). Anaeroplarda en sık izole edilen etken *Bacteroides fragilis* iken *Fusobacterium* türlerine ve diğer anaeroplara daha az sıklıkla rastlanmaktadır (87). Hastanede sepsis gelişen hastaların %15-20'sinde ise birden fazla mikroorganizma (polimikrobiyal sepsis) saptanmaktadır (14, 76, 111, 119, 121). Ayrıca son yıllarda sepsis olgularının yaklaşık %5-10'u başta *Candida* türleri olmak üzere mantarlar tarafından gelişmektedir (14, 55, 90, 92, 119, 121, 122). 1980'li yıllardan günümüze kadar geçen süreç içinde mantar enfeksiyonlarına bağlı sepsis oranında %200'den daha fazla artış olduğu bildirilmektedir (Şekil-10) (48). Bu durumu hazırlayan risk faktörleri arasında uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, parenteral hiperalimentasyon, intravasküler kateter uygulaması ve kortikosteroid tedavisi sayılabilir (56, 111).

Tablo 1: Sepsise neden olan mikroorganizmalar

<p>Gram-pozitif bakteriler</p> <p><i>Metisilin-duyarlı S. aureus</i></p> <p><i>Metisilin-dirençli S. Aureus</i></p> <p><i>Diğer Stafilokok türleri</i></p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i></p> <p><i>Diğer streptokok türleri</i></p> <p><i>Enterokok türleri</i></p> <p><i>Anareoblar</i></p> <p><i>Diğer gram-pozitif bakteriler</i></p>	<p>%30-50</p> <p>%14-24</p> <p>%5-11</p> <p>%1-3</p> <p>%9-12</p> <p>%6-11</p> <p>%3-12</p> <p>%1-2</p> <p>%1-5</p>
<p>Gram-negatif bakteriler</p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p><i>Diğer enterobakter türleri</i></p> <p><i>Haemophilus influenzae</i></p> <p><i>Anaeroblar</i></p> <p><i>Diğer gram-negatif bakteriler</i></p>	<p>%25-30</p> <p>%9-27</p> <p>%8-15</p> <p>%2-7</p> <p>%6-16</p> <p>%2-10</p> <p>%3-7</p> <p>%3-12</p>
<p>Mantarlar</p> <p><i>Candida albicans</i></p> <p><i>Diğer candida türleri</i></p> <p><i>Mayalar</i></p>	<p>%3-6</p> <p>%1-3</p> <p>%1-2</p> <p>%1</p>
<p>Parazitler</p>	<p>%1-3</p>
<p>Virüsler</p>	<p>%2-4</p>

(Annane ve ark. 2005. Lancet. 365:63-78)



Şekil 10: Mantarların etken olarak izole edildiği sepsisli vaka sayısının 1979-2000 yılları arasında gösterdiği değişim grafiği. (Martin ve ark. 2003. NEJM. 348:1546-1554)

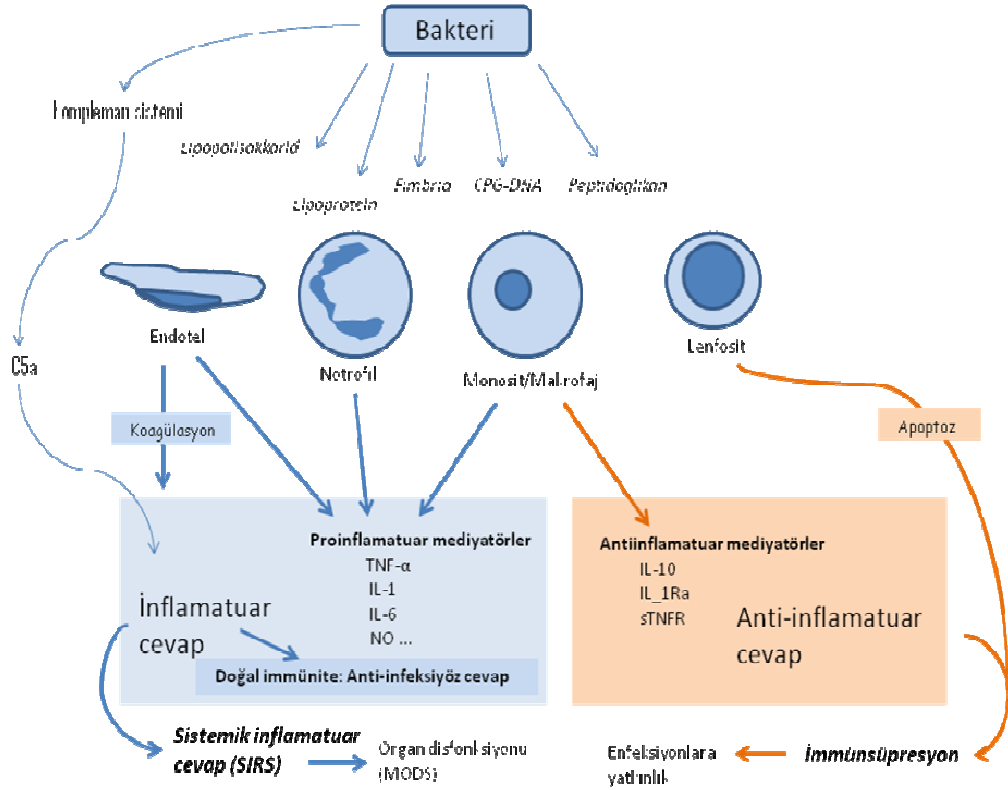
Sepsise neden olan mikroorganizmaların sıklığı coğrafik özelliklere göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin Güney-Doğu Asya'daki toplum kökenli sepsiste *Burkholderia pseudomallei*'nin yol açtığı meliodiozis vakalarına sıkça rastlanmaktadır (75). Bunun yanı sıra spesifik hasta gruplarında belirli patojenler daha sık izole edilebilmektedir. Örneğin orak hücreli anemisi olan kişilerde pnömokok veya salmonelleya bağlı sepsis riski 400 kat yükselmektedir. Ayrıca dalağı alınmış kişilerde kapsüllü bakterilere bağlı sepsis riski, genitoüriner anomalisi olanlarda ürosepsis riski ve ciddi yanıklı hastalarda ise deri florası veya nazokomiyal gram negatif bakterilere bağlı sepsis riski belirgin olarak artış göstermektedir (74, 75, 123-125).

Sepsis Patofizyolojisi:

Sepsis ve onun sonucu olarak gelişen klinik tabloların oluşumunda bakteriyel invazyonun yanı sıra bakteriyel hücresel yapıların ve toksinlerin de önemli rolü bulunmaktadır. Bu hücresel yapılar ve toksinler organizmada değişik biyolojik sistemleri aktive edebilmekte ve sepsisteki fizyopatolojik değişikliklerden sorumlu endojen mediyatörlerin açığa çıkmasını sağlamaktadır (Şekil-11). Endotoksin, toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1), pirojenik ekzotoksin A, gram pozitif bakteri veya mantar hücre duvarı yapıları, viral ve mantar antijenleri sepsis kaskadını başlatabilmektedir (1, 126-128). Sepsis patogenezinde yaygın olarak kabul edilen görüş, olayın kontrol edilemeyen sistemik inflamatuvar bir cevaba bağlı olarak geliştiğidir (129, 130). İlk aşamada aşırı bir immün yanıtın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu yanıtın oluşumunda mikroorganizmalara ait öğelerin mononükleer hücreleri (makrofajlar) uyararak pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarmaları önemlidir. Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6 ve interferon-gamma (IFN- γ) bu aşamada en etkili mediyatörler olarak göze çarpmaktadır (Şekil-11) (6). Sepsisli hastalarda ilerleyen dönemlerde infeksiyonlara eğilimin artması, artan inflamatuvar yanıtın yanında immünsüpresif bir sürecin de olduğunu düşündürmektedir. Başlangıçta, mikroorganizmalara ve ürünlerine karşı olarak gelişen inflamatuvar yanıt, zamanla yerini aşırı anti-inflamatuvar yanıtta, diğer bir deyişle immünsüpresyona bırakmaktadır. Sepsiste gözlenen bu immünsüpresyon durumu salgılanan anti-inflamatuvar sitokinlere (IL-4, IL-10, v.b), lenfositler gibi immün hücrelerde gelişen apoptoza ve Th2 hücrelerinin baskın aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan artmış anti-inflamatuvar yanıtta bağlanmaktadır (Şekil-11) (121, 131).

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında yer alan endotoksinler, sepsis patogenezinine yönelik çalışmalarda üzerinde en fazla durulan tetikleyici moleküller olarak göze çarpmaktadır. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarını içte peptidoglikan tabakası, dışta ise lipopolisakkaridler, protein ve fosfolipidler oluşturmaktadır (1). Lipopolisakkarid yapısında olan endotoksin molekülü, hücre duvarında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktif

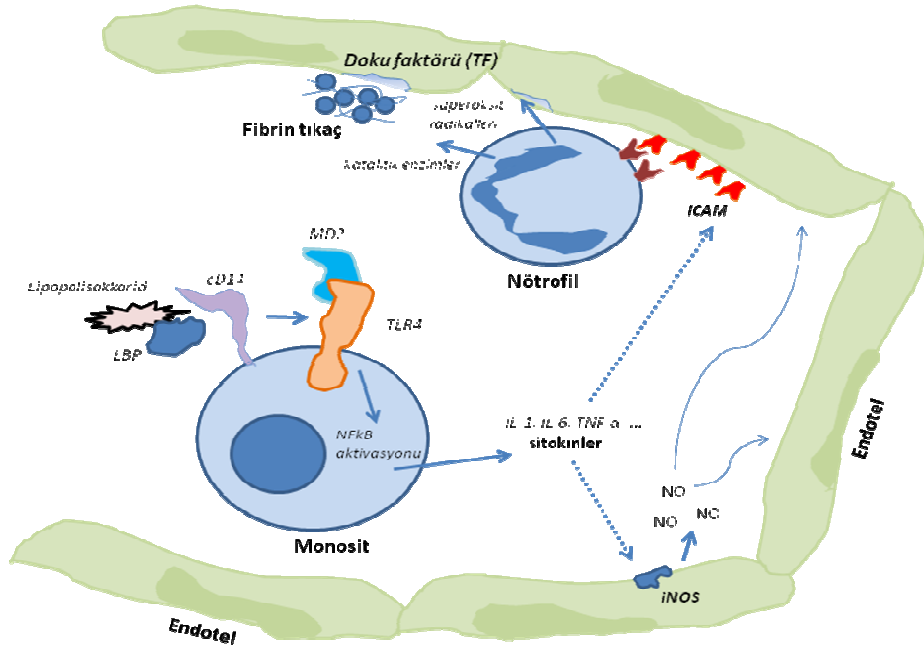
iken hızlı hücre büyümesi veya hücre yıkımı sırasında dışarıya salınabilmekte ve sepsiste görülen bir dizi olayı başlatabilmektedir (132). Lipopolisakkarid (LPS) molekülü yapı olarak O-spesifik antijeni, kor bölgesi ve lipid-A parçalarından oluşmaktadır (74). Lipid-A fraksiyonunun tek başına deney hayvanlarına verilmesi sonucunda LPS'nin etkilerine benzer sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle lipid-A parçası, sepsis patogenezi açısından LPS'nin en kritik parçası olarak kabul edilmektedir.



Şekil 11: Sepsiste ortaya çıkan patofizyolojik değişiklikler.

Enfekte kişilerde, immün sistemin etkisiyle ve antibiyotik uygulaması sonucunda bakterilerin parçalanmasını takiben yoğun miktarlarda LPS dolaşıma geçebilmekte ve monosit, makrofaj gibi hedef hücreleri uyararak inflamatuvar mediyatörlerin açığa çıkmasına neden olmaktadır (Şekil-12) (133). LPS molekülü dolaşıma geçtikten sonra "LPS-bağlayıcı protein"e (LBP) bağlanmakta ve oluşan LPS-LBP kompleksi makrofajlardaki CD14 reseptörlerine bağlanarak etkili olmaktadır. CD14 reseptörünün

intrastoplazmik parçasının olmaması nedeniyle hücre içine sinyal iletiminin sağlanabilmesi için Toll like reseptör-4 (TLR-4)'e ihtiyaç bulunmaktadır. LPS ile başlayan sinyal iletimi CD14 reseptörü aracılığı ile TLR-4'e iletilmekte ve bu sayede TLR-4'ün aktivasyonu sağlanmaktadır. TLR-4'ün aktivasyonunda MD-2 molekülü de görev almakta ve bu molekülün eksik olması veya mutasyona uğraması durumunda LPS'ye cevabın gerçekleşmediği bildirilmektedir. TLR-4'ün intrastoplazmik parçası IL-1 reseptörüne benzerlik göstermekte ve NFkB ailesini aktive edecek olan sinyal iletim dizisini indüklemektedir. NFkB'nin aktivasyonu ise hedef hücrelerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımı ile sonuçlanmaktadır (134-136). Monosit, makrofaj gibi mononükleer hücrelerden sitokin salınımı sonucunda endotelyumdan nitrik oksit (NO) ve prostosiklin salınmakta, koagülasyon sistemi, araşidonik asit metabolizması ve kompleman sistemi aktive olmakta, lökositlerin endotelial hücrelere adezyonu artmakta ve oksijen radikallerinin artması sonucu doku hasarı meydana gelmektedir (133). Bakteriye hücre yapısının ve toksinlerin, organizmada meydana getirdiği tüm bu etkiler sitokinlerinde içinde yer aldığı ikinci araçlarla düzenlenmektedir (Şekil-12).



Şekil 12: Lipopolisakkarid molekülünün tetiklediği patofizyolojik değişiklikler.

(ICAM: İntersellüler adezyon molekülü, iNOS: indüklenebilir nitrik oksit sentaz, LBP: Lipopolisakkarid bağlayıcı protein, NO: Nitrik oksit, TLR4: Toll like reseptör-4)

Son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde sepsis patogenezi açısından endotel hücrelerinin anahtar bir rol oynadığı kabul edilmektedir (137). Endotel hücreleri hem pıhtılaşmayı hemde enflamasyonu düzenleyen önemli moleküller salgılamakta ve normal şartlarda antikoagülan ve antitrombotik özellikler taşımaktadır (137, 138). Endotel hücreleri bakteriyel hücre yapıları ile ilk karşılaşan hücreler olup bu yapılar ile karşılaşır karşılaşmaz hızla inflamatuvar mediyatörlerin salınımına yol açmaktadır (137, 139). Abartılı sistemik proinflamatuvar yanıt oluşması sonucunda ise endotel hücrelerinde hasarlanma meydana gelmekte ve mikrovasküler koagülopati oluşumu ile sonuçlanmaktadır (137). Mikrovasküler yatakta meydana gelen fibrin trombüslerinin organlara giden kan akımını engellemesi sonucu birçok organın beslenmesi ve oksijenizasyonu bozulmakta ve bunun neticesinde akut organ disfonksiyonu gelişebilmektedir (140, 141). Ciddi sepsisli vakalarda ortaya çıkan organ yetmezliklerinin nedeni olarak damar endotelinde meydana gelen hasarlanma ve mikrovasküler koagülopati sorumlu tutulmaktadır.

Sepsisle ilgili araştırmalarda üzerinde en çok durulan sitokinler IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , koloni stimulan faktör, platelet aktivatör faktör (PAF) ve TNF- α olarak göze çarpmaktadır (138, 142). TNF- α , sepsisten sorumlu temel mediyatör olarak kabul edilmektedir (143). Deneysel olarak hayvanlara ve insanlara rekombinant TNF- α verilmesi sonucunda sepsiste görülen hemodinamik ve biyokimyasal değişikliklere benzer etkiler ortaya çıkmaktadır (144). TNF- α 'nın vücutta oluşturduğu etkiler çok çeşitli olup bunlar arasında ateş, anoreksi, sempatik deşarj artışı, akut faz proteinlerinde artış, lökositoz, miyokard depresyonu, kapiller düz kas hücrelerinde dilatasyon, hipotansiyon ve endotel hasarlanması gibi pek çok etki sayılabilir (142). IL-1 β , TNF- α ile benzer fonksiyonel özelliklere sahip olup yeterli konsantrasyonları vücut direnci için gerekli iken artmış miktarları ise vücuda zararlı etkilere yol açmaktadır (138). IL-1 β 'in artmış seviyelerine bağlı olarak IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α ve NO seviyelerinde de artış görülmektedir (142). TNF- α ve IL-1 β 'nin etkisiyle endotel hücrelerindeki indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesi artmakta ve buna bağlı olarak NO sentezinde artış görülmektedir (145). NO

etkisi ile damar duvarındaki düz kaslarda gevşeme, miyokard depresyonu ve sonuç olarak hipotansiyon meydana gelmektedir. Sepsiste ortaya çıkan dirençli hipotansiyondan büyük ölçüde NO sorumlu tutulmaktadır (146, 147). Sepsisli hastalarda iNOS aktivitesinin inhibisyonu sonucunda periferik vasküler direnç artmakta, kan basıncı yükselmekte ve kardiyak debide artış meydana gelmektedir (148-150). NO, serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO⁻) gibi dokular için zararlı bileşiklerin oluşumuna da yol açabilmektedir (151). NO, özellikle vazodilatasyon, doku yıkımı ve kardiyak fonksiyon bozukluğuna yol açarak sepsis patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Sepsiste yapımı artan bir diğer sitokin olan IL-6 ise megakaryosit matürasyonunu desteklemekte ve trombosit sayısında artışa neden olmaktadır. Ayrıca T hücrelerinin proliferasyonunu, natural killer (NK) hücrelerinin ve akut faz proteinlerinin aktivasyonunu uyarmaktadır (142). Sepsisli hastalarda IL-6'nın kandaki seviyesinin düzenli aralıklarla ölçülmesinin hastalığın seyri açısından önemli veriler sağlandığı bildirilmektedir (152). Buna ek olarak yapılan birçok çalışmada, septik şoklu hastalarda IL-6 düzeyleri ile mortalite oranları arasında korelasyonun bulunduğu gösterilmiştir (142, 153).

Sepsiste rol oynadığı düşünülen bir diğer sitokin olan PAF ise monosit ve endotelial hücreleri tarafından LPS'ye cevap olarak üretilmekte ve sepsisteki fizyopatolojik değişikliklerin ortaya çıkışında mediyatör olarak rol oynamaktadır (138). PAF, sistemik vasküler direnci düşürmekte ve bu sayede hipotansiyona neden olmaktadır. Pulmoner damarlarda ise tam tersi olarak arteriyel basıncı arttırdığı gösterilmiştir (154, 155). Septik şoktaki endotoksinin neden olduğu pulmoner değişikliklerde PAF'ın önemli rol oynadığı bildirilmektedir (156). Hayvan deneylerinde PAF'ın koroner kan akımını azalttığı ve kardiyak fonksiyonları baskıladığı gösterilmiştir (154). PAF reseptör antagonistleri ile gram-negatif sepsisli hastalarda yaşam süresinin arttırıldığı bildirilmiştir (156).

Sepsiste ortaya çıkan patofizyolojik değişiklikler sırasında endotoksinlerin hegeman faktörünün (faktör 12) aktive ettikleri ve bu sayede kompleman, kinin ve koagülasyon sistemlerinin aktivasyonuna yol açtıkları

bildirilmektedir (74). Endotoksinlerin kompleman sistemini aktive etmesi klasik veya alternatif yolla gerçekleşmektedir (157). Kompleman sisteminin aktivasyonu sonucu açığa çıkan C3a ve C5a, bazofil ve mast hücrelerini uyarmakta ve histamin başta olmak üzere birçoğu hipotansiyona neden olan vazoaaktif mediyatörlerin salgılanmasına neden olmaktadır (158). Kinin sisteminin aktivasyonu ise bradikinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bradikinin vazodilatör etkili olup vasküler permeabilitede artışa yol açmaktadır. Bradikinin sepsiste gelişen hipotansiyonda katkıda bulunduğu düşünülmektedir (154, 157). Sepsiste aktive olan sistemlerden biriside koagülasyon sistemidir. Sepsiste mononükleer hücrelerden salınan sitokinlerin çoğu trombin yapımını uyarmakta, başlangıçta doku faktörünün (TF) ekspresyonundaki artışa bağlı olarak ekstrinsik yol ve daha sonra faktör 12 aktivasyonu ile intrinsik koagülasyon sistemi aktive olmaktadır (74, 137, 159). Koagülasyon sisteminin aktivasyonu sonucu mikrovasküler yatakta fibrin trombüsleri oluşmakta ve bu durum birçok organda yetmezlik gelişimi ile sonuçlanabilmektedir (140, 141). İlerleyen dönemlerde pıhtılaşma proteinlerinin aşırı tüketimi kanamalara yol açmakta ve hastalarda hem kanama, hemde trombüs gelişimi birlikte görülmektedir. Diğer taraftan plazmin tarafından fibrinin parçalanması sonucu fibrinolizis gelişmektedir. Yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu (DIC) olarak tanımlanan bu tablo sepsisteki kötü prognoz göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (160, 161). DIC'in son etkileri hedef organlarda görülmekte olup şiddetli klinik kanama, tromboz, doku iskemisi, nekroz, hemoliz, akciğer, karaciğer ve böbrek yetmezliği gelişimi sık görülen komplikasyonları arasında yer almaktadır (162). Septik şoktaki hastalarda DIC gelişmesi ile mortalitenin arttığı bildirilmektedir (163).

Sepsiste Organ Tutulumu

Sepsisli vakalarda akciğer, böbrek, karaciğer, kalp ve diğer birçok organda yetmezlik gelişebilmekte ve mortalite oranları yetmezliğe giren organ sayısı ile orantılı olarak artış göstermektedir. Mortalite oranı, üç veya daha fazla organ tutulumu olan vakalarda %80-100'e ulaşabilmektedir (7, 164).

Sepsiste karaciğer yetmezliği genellikle hiperbilirubinemi, aminotransferaz ve alkalin fosfataz artışı ile kendini göstermekte ve serum aminoasit düzeylerindeki azalma veya azalmış hepatik aminoasit klirensi yetmezliğin ilerlediğini işaret etmektedir (7). Sepsis sonucu renal tübüler hipoperfüzyona bağlı olarak akut böbrek yetmezliğinin gelişebildiği bildirilmektedir. Ayrıca nefrotoksik antibiyotiklerin kullanımı ve infeksiyona bağlı olarak immünkomplekslerin böbrekte birikimi gibi nedenlerle de akut böbrek yetmezliği oluşabilmektedir (138, 165). Sepsiste yetmezlik gelişen organlardan birisi de kalp olup salınan pekçok mediyatörün kalp üzerinde disfonksiyona yol açtığı gösterilmiştir. TNF- α miyokardı deprese etmekte iken PAF ise kalp üzerinde negatif inotropik etki göstermekte ve kan basıncında düşüğe yol açmaktadır (142, 154, 155). Ayrıca NO'un da kardiyak fonksiyon bozukluğuna yol açtığı bilinmektedir (146, 147). Sepsiste akciğerlerin tutulumu sonucu genellikle ARDS'nin (akut respiratuar distress sendromu) geliştiği ve buna bağlı olarak septik şoklu hastaların %30-80'inde solunum yetmezliği ortaya çıktığı bildirilmektedir (166). ARDS, klinik olarak artan solunum desteğine rağmen dirençli hipokseminin varlığı ile kendini göstermektedir. Pulmoner hipertansiyon, artmış ekstravasküler akciğer sıvısı ve azalmış kompliyans ARDS'de meydana gelen olaylar olup ilerleyen dönemlerde ortaya çıkan respiratuar kas yorgunluğu ve deprese diyafragmatik kontraktilite hastalığının durumunu daha da ağırlaştırmaktadır (167). Organ yetmezliklerinin zamanında ve uygun yaklaşımla tedavi edilememesi sonucu metabolizma geriye dönüşsüz olarak bozulmakta ve hastayı ölüme kadar götürebilmektedir (156). Sepsis sonucu ortaya çıkan patofizyolojik olaylardan beyin dokusu da etkilenebilmekte ve bunun sonucunda konfüzyondan komaya kadar değişebilen bir takım klinik bulgular ortaya çıkmaktadır (168). Sepsisle ilişkili ensefalopati (SİE) adı verilen bu durumun eşlik ettiği sepsisli hastalarda mortalitenin belirgin bir biçimde yüksek seyretmesi, sepsisin beyindeki etkilerini aydınlatmaya yönelik araştırmaların önemini arttırmakta ve bu konuda yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artış göstermektedir.

Deneysel Sepsis Modelleri:

Günümüzde sepsis araştırmalarında kullanılmak üzere deneysel sepsis modelleri oluşturulurken pek çok yöntem ve yaklaşımdan faydalanılabilmektedir. Sepsis modelleri; (1) dışardan toksin verilmesi (örneğin LPS gibi), (2) dışardan intravenöz veya intraperitoneal olarak yaşayan bir bakterinin verilmesi ve (3) hayvanlarda endojen olarak yer alan koruyucu bariyerlerin bozulmasını sağlayan cerrahi işlemlerin uygulanması (örneğin; kolonik geçirgenliğin arttırılarak bakterilerin periton içine translokasyonunun sağlanması) olmak üzere üç ana başlık olarak karşımıza çıkmaktadır (169-172).

i. Lipopolisakkarit (LPS) Modeli

LPS, gram negatif sepsis oluşturulmasında, endojen sitokinlerin ve tamamlayıcı proteinlerin deneysel olarak üretiminin uyarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. LPS'nin intraperitoneal veya intravenöz olarak deney hayvanlarına verilmesi sepsis benzeri bir tablonun oluşumuna yol açmaktadır (170, 173). Endotoksikoz oluşturmakta kullanılan LPS, dayanıklı yapısı ile liyofilize halde depolanabilmekte ve gerektiğinde bolus ya da sürekli infüzyon şeklinde kullanılabilmektedir (174, 175). Ancak, deneysel olarak oluşturulan endotoksemi ile klinik sepsis arasında önemli farkların bulunduğu gösterilmiştir (176-179). Sepsisli hastalarda hiperdinamik ve hipodinamik faz olmak üzere iki ayrı hemodinamik evre yer almaktadır. Sepsisin erken dönemlerinde hiperdinamik fazın gelişmesiyle sistemik vasküler dirençte düşüş ve kardiyak atım hacminde artış, sepsisin ilerleyen dönemlerinde ise hipodinamik fazın gelişmesiyle birlikte kardiyak atım hacminde azalış görülmektedir (175, 180). Endotoksinin bolus enjeksiyonu sonrasında ise birçok hayvan türünde direkt olarak hipodinamik fazın geliştiği gözlenmektedir (176-178). Ayrıca LPS'nin bolus şeklinde tek doz olarak verilmesi sonucunda inflamatuvar sitokinlerin kandaki seviyelerinde hızlı ve geçici bir yükseliş gözlenmektedir (179). Sepsisli hastalarda ise inflamatuvar sitokinlerdeki artışın daha geç ve göreceli bir yükseliş ile meydana geldiği ve kandaki seviyelerinin uzun bir süre yüksek kaldığı bildirilmektedir (174, 181).

LPS infüzyonu yapılan hayvanlarda, TNF- α 'ya karşı antikörlerin verilmesiyle veya çözünebilir TNF reseptörlerinin kullanılmasıyla TNF- α 'nın blokajı sağlanmakta ve bu sayede bu hayvanların yaşama sürelerinde belirgin bir artış gözlenmektedir (182, 183). Sepsisli hastalarda yapılan çalışmalarda ise TNF- α blokajının yaşam süresi üzerine belirgin bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (184-187). TNF- α ve IL-1 seviyelerinin sepsisli hastalarda endotoksikoz oluşturulan hayvanlar kadar yüksek seviyelere çıkmaması nedeniyle proinflamatuvar sitokinlerin azaltılmasına yönelik tedavi yöntemlerinin başarılı sonuçlar vermediği düşünülmektedir (174, 181, 188). Yeni geliştirilen yöntemlerle LPS infüzyonu sonrasında ortaya çıkan aşırı sitokin artışının önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Böylelikle LPS modelinin klinik sepsisi daha iyi taklit edebilmesi amaçlanmaktadır. LPS'nin ufak dozlardaki tekrarlayan enjeksiyonu, düşük doz LPS'nin devamlı infüzyon şeklinde verilmesi veya LPS infüzyonu sonrasında agresif sıvı tedavisi uygulanması sayesinde LPS modelindeki yetersizlikler aşılmaya çalışılmaktadır (189, 190).

İnsanların LPS'ye karşı oldukça duyarlı olduğu ancak deney hayvanı olarak kullanılan sıçanların ve babunların ise LPS'nin etkilerine karşı göreceli olarak dirençli olduğu bilinmektedir. Tavşan, koyun ve domuzların LPS'ye duyarlılıkları ise insanlara benzer şekildedir (191). Deney hayvanlarında özellikle sıçan gibi kemirgenlerde LPS'ye karşı duyarlılığın artırılmasını sağlayan teknikler geliştirilmiştir. LPS ile birlikte öldürücü organizmaların ya da D-galaktozamin verilmesi ile gerekli LPS dozunun azaltılabildiği bildirilmektedir. D-galaktozamin kullanımı ile farelerde LPS'nin öldürücü, dozu 10.000 kat azaltılabilmektedir (190, 192). D-galaktozamin dışında kurşun asetat, berilyum fosfat, carrageenan ve karbontetraklorid'de LPS'ye karşı duyarlılığı arttırmak için kullanılabilir (190). Hayvanlarda oluşturulan toksin modelinde LPS dışında CPG DNA ve sentetik lipopeptid agonistleri de kullanılabilir (193, 194). LPS'nin vücuttaki etkilerini hücre membranında yer alan TLR-4 üzerinden, CPG DNA'nın TLR-9 üzerinden ve sentetik lipopeptid agonistlerinin ise TLR-2 üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir (195, 196). Bu toksik moleküllerin infüzyonu sonrasında kandaki

proinflamatuar sitokin seviyelerinde artış meydana geldiği bildirilmektedir (197-200).

Primatlar üzerinde yapılan çalışmalarda LPS'nin düşük dozlarda infüzyon şeklinde verilmesinin insanlardaki sepsisi daha iyi taklit edebildiği gösterilmiştir (177). Fakat günümüzdeki endotoksemi modeli çalışmalarının büyük bir kısmı, yüksek miktarlardaki LPS'nin tek doz şeklinde intraperitoneal veya intravenöz verilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Yüksek miktarlardaki LPS'nin tek doz şeklinde bolus olarak verilmesi her ne kadar bu yöntemin kullanımını kolaylaştırıyor ve bu sebeple de araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih ediliyor olsa da, LPS modelinin bu şekilde uygulanmasının sepsisli hastalardaki hemodinamik değişiklikleri ve dolaşımda saptanan sitokin seviyelerini tam olarak karşılamadığı görülmektedir. LPS modeli kullanılarak ortaya konan sepsis tedavi yöntemlerinin (*TNF- α veya IL-1 blokajı gibi*), sepsisli hastalarda yarar sağlamaması hatta mortalite oranlarını arttırıyor olması bu düşüncüyü destekler niteliktedir (184, 185, 187, 201, 202).

ii. Bakteriyel İnfüzyon Modelleri

Deneysel sepsis modeli oluşturulmasında, LPS'den başka bakterilerin direkt olarak deney hayvanlarına verilmesi de kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Bu yöntemde bakteri izolatları, periton içine verilmekte veya intravenöz olarak damar içine enjekte edilmektedir (175, 203). Bakteriler, intraperitoneal olarak verilirken tek başlarına uygulanabileceği gibi "adjuvant" adı verilen maddelerle karıştırılarak da verilebilmektedir (203). Bakterilerin intravenöz yoldan uygulanmasının ardından vücutta meydana getirdiği patofizyolojik değişiklikler daha önce yapılmış olan birçok hayvan çalışmasıyla ortaya konmaya çalışılmıştır (204-207). Bu amaçla birçok bakteri türü kullanılmış olsa da Escherichia Coli en çok araştırılan bakteri olarak göze çarpmaktadır (175). Bakteriyel infüzyon modelinde, kullanılan bakterilerin miktarı ve infüzyon süresi çalışmalar arasında farklılık göstermektedir. Sıçanlar gibi küçük memeli hayvanlarda Escherichia Coli'nin intravenöz olarak düşük dozlarda verilmesi, saatler içerisinde minimal düzeyde fizyolojik değişikliklere yol açmakta iken daha yüksek dozlarda

verilmesi ise sıklıkla kardiyak output'ta erken dönemde artış, geç dönemde ise azalış olmak üzere bifazik değişikliklere yol açmaktadır (208, 209). Daha büyük memeli hayvanlarda (*domuz ve babun gibi*), bakterilerin genellikle yüksek dozlarda kullanıldığı ve bu durumun eğer sıvı replasmanı uygulanmıyor ise sıklıkla hayvanların ölümü ile sonuçlandığı görülmektedir (204, 210). Crocker ve ark.'ları (211), domuzlarda intravenöz olarak gram pozitif veya gram negatif bakteriler vererek sepsis modeli oluşturmuşlar ve elde ettikleri sonuçların kullanılan bakterilerin türüne göre değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışmaya göre gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus*'un intravenöz olarak uygulanması sonrasında hayvanlarda minimal düzeyde kardiyopulmoner değişiklik ortaya çıkmakta iken gram negatif bakteriler arasında yer alan *E. coli* ve *P. aeruginosa*'nın verilmesi ise şok tablosu ve akut respiratuar yetmezlik ile sonuçlanmaktadır. Haberstroh ve ark.'larının (205), domuzlara *P. aeruginosa* vererek yapmış oldukları sepsis modeli çalışmasında ise geç dönemde ortaya çıkan sistemik hipotansiyon ve pulmoner hipertansiyona ek olarak kardiyak output'ta bifazik değişikliklerin ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bakteriyel infüzyon modelindeki mortalite oranları, verilen bakteri miktarına göre değişiklik göstermekte ve bu özelliği sayesinde periton içine direkt olarak fekal içeriğin uygulanması yöntemine kıyasla daha kontrollü bir sepsis modeli olduğu ileri sürülmektedir (212).

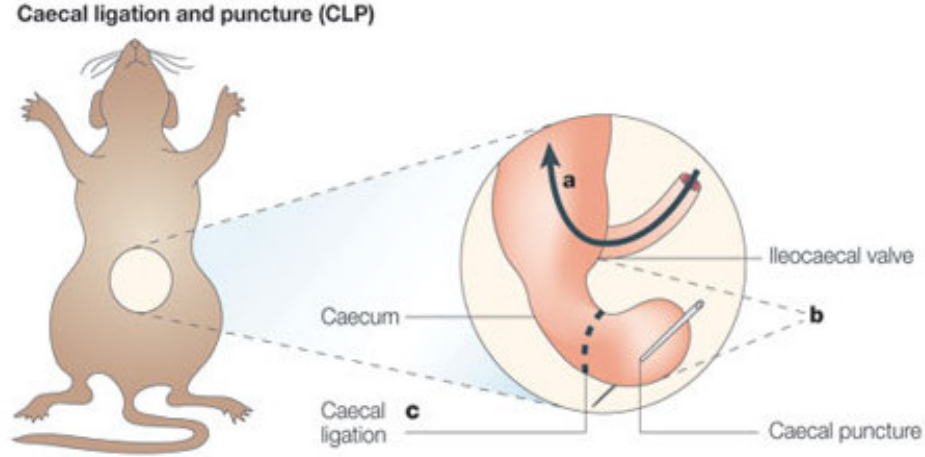
Canlı bakterilerin hayvanlara direkt olarak verilmesi, diğer invaziv cerrahi metodlara göre (*ÇLP ve CASP gibi*) çalışma pratiği açısından kullanım kolaylığı sağlaması ve mortalite oranlarının manipülasyonuna olanak sağlaması nedeniyle araştırmacılar tarafından tercih ediliyor olsa da bu yöntem kullanılarak oluşturulan sepsis modelinde, uygulanan canlı bakterilerin vücutta kolonize olarak üreyemedikleri ve yüksek miktarlardaki bakterinin direkt olarak kan akımına karıştığı görülmektedir. Sepsisli bir hastada ise septik enfeksiyon odağından aralıklı olarak değişik miktarlarda bakterinin kan akımına karıştığı düşünüldüğünde, bu modelin klinik sepsisi iyi bir şekilde taklit edemediği ortaya çıkmaktadır. Bakteriyel infüzyon modelleri

kullanılarak geliştirilen tedavi rejimlerinin insanlar üzerinde denenmesinin başarısızlıkla sonuçlanması bu durumu destekler niteliktedir (175).

iii. Peritonit Modelleri

Endojen floranın gastro-intestinal sistemden cerrahi olarak serbest bırakılması ve bir enfeksiyon odağı oluşturulmasına izin verilmesi deneysel sepsis çalışmalarında sıkça kullanılan bir diğer yaklaşım olarak görülmektedir. Çekum bağlama ve delme (ÇLP) yöntemi veya colon ascendens'e stent yerleştirilmesi (CASP) bu amaçla kullanılan iki farklı yöntemdir. ÇLP modeli, Wichterman ve arkadaşları (213) tarafından geliştirilmiş bir model olup sepsisle ilişkili çalışmalarda oldukça sık kullanılan bir yöntem olarak göze çarpmaktadır. Başlangıçta sıçanlar üzerinde geliştirilmiş bir yöntem olsa da diğer türlerde de (*fare, koyun ve domuz gibi*) başarı ile uygulanabilmektedir. ÇLP modeli, sepsis araştırmaları için "altın standart" yöntem olarak kabul edilmektedir (212). ÇLP, insanlardaki rüptüre apandisit veya perfore divertiküli taklit eden bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (175). ÇLP modelinde orta hattan yapılan bir insizyon ile çekum ortaya çıkarılmakta, ileoçekal valvın distalinden istenilen oranlarda çekum bağlanmakta ve yine istenilen kalınlıktaki (*18, 20 ve 22 gauge gibi*) bir iğneyle çekumda delik oluşturulmaktadır (Şekil-13). Bu sayede fekal içeriğin periton içine geçmesi sağlanmaktadır (175, 188). ÇLP modelindeki sitokin seviyeleri sepsisli hastalardakine benzer bir seyir göstermektedir (214). Ayrıca sepsisteki erken hiperdinamik ve geç hipodinamik fazın ikisi de bu yöntemde izlenebilmektedir (215). ÇLP modeli, bu özellikleri sayesinde insanlarda gelişen sepsis tablosunu iyi bir şekilde taklit edebildiği düşünülmektedir. ÇLP, diğer noninvaziv yöntemlerden daha agresif ve daha uzun süreli bir yöntem olmasına rağmen, tercih edilen girişim olma özelliğini hala korumaktadır (190). İleriye yönelik yapılması planlanan sepsis çalışmalarında insanlardaki septik tabloyu daha iyi taklit ettiği düşünülen diğer sepsis modellerinin (ÇLP ve CASP gibi) kullanılması, sepsisli hastalara yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ve insanlardaki sepsis patofizyolojisinin açıklanmasında daha geçerli bilgiler sağlayabilecektir. Bu gerekçelerle bizim yapmış

olduğumuz bu çalışmada da sepsis deneysel modeli olarak ÇLP tercih edilmiştir.



Şekil 13: Sıçanlarda çekum bağlama ve delme (ÇLP) işleminin şematik olarak gösterimi. (Buras ve ark. 2005. Nat Rev Drug Discov. 4: 854-865)

Sepsis modelleri oluşturulurken küçük memeli deney hayvanlarının tercih edilmesinin en önemli faydaları; göreceli ucuz olmaları ve genetik yatkınlıklarıdır. Bu hayvanların deney süresince yaşamda kalmalarının sağlanması ise aşılması gereken önemli bir nokta olarak görülmektedir (175). Büyük memeli hayvanlar genelde invaziv monitorizasyon gerektiren fizyolojik çalışmalar için kullanılmaktadır. Özellikle domuzlar, organ sistemlerinin insana benzerliği dolayısıyla oldukça sık kullanılan büyük deney hayvanları olarak göze çarpmaktadır (216). Vasküler geçirgenlik çalışmalarında, akciğer damarlarının geçirgenlik özellikleri dolayısıyla koyunlar, sitokin çalışmalarında ise immünolojik yapılarının insana benzemesi nedeniyle primatlar tercih edilen hayvan türleridir (204, 217, 218). İdeal bir septik hayvan modelinin basit, tekrar edilebilir ve doza bağımlı yanıt verebilir olması, yeterli klinik bulguları sergileyebilmesi ve yeterli sitokin yanıtı ile bakteriyolojik bulguları ortaya çıkarabilmesi gerekmektedir. Ayrıca, sepsis tablosunun lokal başlayıp dereceli olarak yayılan bir gelişim izlemesi istenmektedir. Bilimsel açıdan anestezisiz şartlar altında ilerleyen bir deney

süreci tercih edilse de bu etik olarak kabul edilmemektedir (175). Yoğun bakım ünitelerindeki hasta çeşitliliği ve geniş çaplı klinik çalışmaların maliyetinin yüksek olması gibi olumsuz faktörler nedeniyle septik hayvan çalışmaları, sepsise ilişkin karanlıkta kalmış konuların aydınlatılabilmesi ve sepsis tedavisinde kullanılabilecek yeni immünomodülatör ajanların denenmesi açısından günümüzde hala değerini korumaktadır. Tüm bu gerekçelerle mevcut tez çalışmasında Wistar Albino türü sıçanlar kullanılmıştır.

Sepsis ve Apoptoz:

i. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda normal gelişimin sağlanabilmesi ve doku homeostazisinin korunabilmesi için hücre proliferasyonu ve farklılaşmasına ek olarak hücre ölümüne de ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere başlıca iki farklı mekanizmayla gerçekleşmektedir. Apoptotik hücre ölümü, nekrozun tersine normal erişkin dokularda da görülmekte ve mitozla birlikte doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelmektedir (219). Biyomedikal literatüre bakıldığında apoptoz teriminin ilk kez 1972 yılında Kerr, Willie ve Currie adlı patoloğlar tarafından kullanıldığı görülmektedir (220). Kerr ve arkadaşları (220) nekrozdaki farklı bir hücre ölüm şekli olan apoptozu morfolojik özellikleriyle tam olarak ortaya koymuşlardır. Apoptoz, eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, Klasik Yunan tarihçisi James Cormack'ın önerisiyle "apoptoz" olarak adlandırılmıştır (219, 220).

Apoptotik hücre ölümü vücutta gerçekleşen birbirinden farklı pek çok süreçte istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için gerekmektedir. Fizyolojik ve patolojik olayların birçoğunda apoptozun rol oynadığı düşünülmektedir. Embriyogenez ve fötogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi için

oluşmuş olan hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramaktadır (*müllerian ve wolffian kanallarının gerilemesi, kalp gibi lümene sahip organların lümenlerinin oluşması, el ve ayak parmakları arasındaki perdelerin yok olması gibi*) (221-223). Erişkin dönemde ise hormon yetmezliğine bağlı olarak gelişen organ gerilemelerinde apoptozun rol oynadığı gösterilmiştir (*menapozda ovaryum folliküllerinin atrezisi, laktasyon sonrasında meme bezlerinin gerilemesi gibi*) (224). Ayrıca immün sistemin gelişimi sırasında organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyan T lenfositlerinin de apoptozla ortadan kaldırıldığı bilinmektedir (223, 225). Bunlara ek olarak apoptozun birçok patolojik süreçte de rol oynadığı bildirilmektedir. Apoptotik hücre ölümünün artması veya azalmasının kanser, otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalık patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir (226-239).

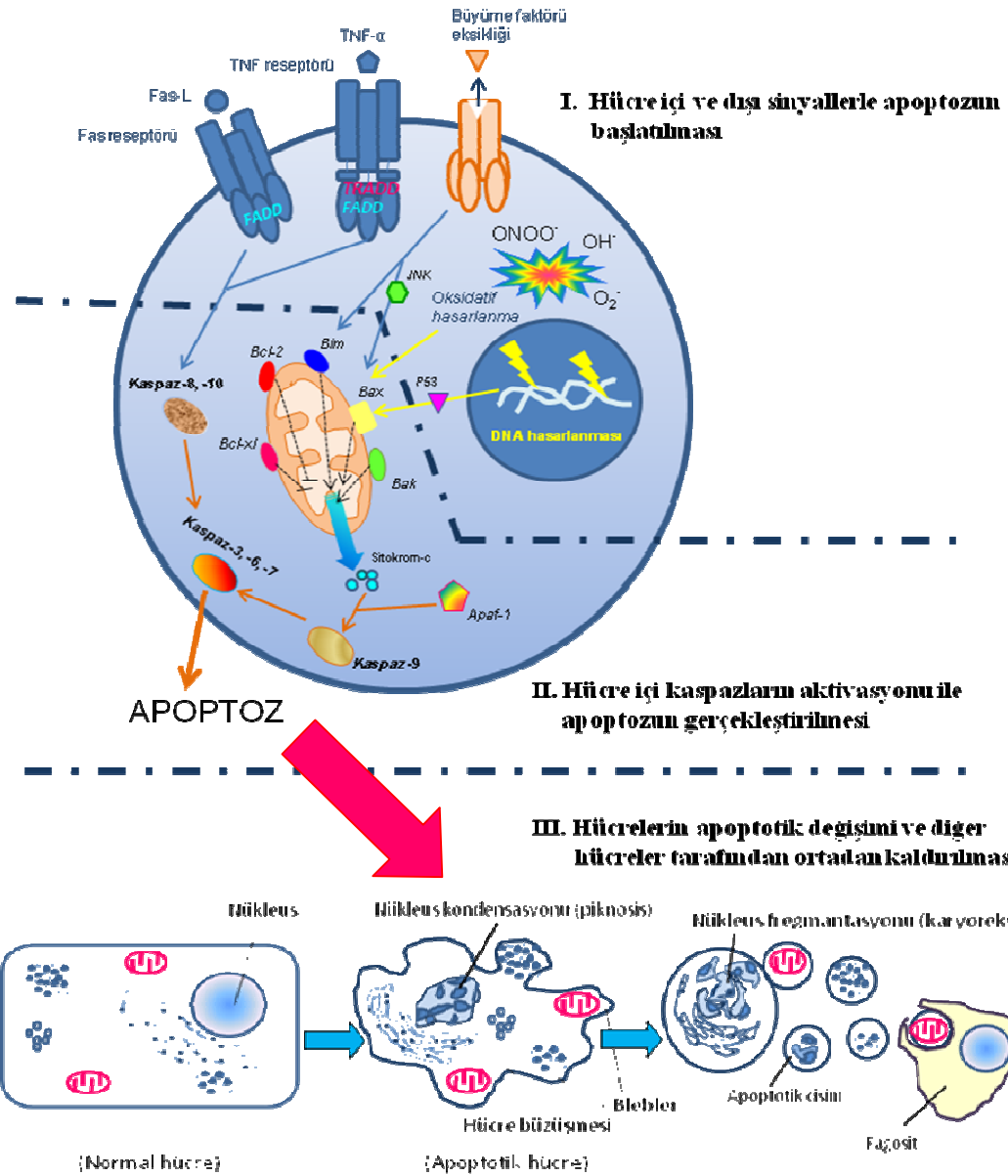
İki temel hücre ölüm şekli olan apoptoz ve nekroz arasında belirgin birçok farkın bulunduğu göze çarpmaktadır. Klasik hücre ölüm şekli olan nekroz, çoğunlukla bir hücre hasarı ile ortaya çıkmakta ve hücrelerin aktif olarak olaylara katılmadığı pasif bir süreç izlenmektedir. Ayrıca nekroz sırasında hücre şişmekte, mitokondri ve endoplazmik retikulum genişlemekte, hücre içi ATP üretimi bozulmakta ve hücre membranı yırtılmaktadır. Sitoplazma içeriğinin ve lizozomal enzimlerin ekstrasellüler ortama dökülmesi sonrasında ise enflamasyon gelişmesi ile sonuçlanmaktadır (226, 232, 240-244). Nekrozun tersine apoptotik hücre ölümünün genellikle tek tek hücreleri etkilediği ve inflamatuvar bir yanıt oluşumuna yol açmadığı gösterilmiştir. Apoptoz esnasında hücre büzüşmekte, mitokondri dış zarının geçirgenliği artmakta, kromatin yoğunlaşmakta, DNA internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti ve bunun katları olacak şekilde parçalanmakta ve sonuç olarak hücre küçük cisimciklere (apoptotik cisimcikler) parçalanmaktadır. Apoptotik cisimcikler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılmakta ve bu sayede hücre içeriğinin dış ortama salınmasının önüne geçilmesi ile inflamasyon gelişmesi engellenmektedir. Apoptoza giden bir hücrede, diğer hücrelere tutunmayı sağlayan özel bağlantı yapıları ortadan

kalkmakta ve hücre yüzeyinde yuvarlaklaşma meydana gelmektedir. Ayrıca normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan fosfolipidlerin molekülünün hücre membranının dış yüzüne doğru yer değiştirdiği (*fosfolipidlerin translokasyonu*) görülmektedir. Hücre membranında gerçekleşen bu fosfolipid değişikliği sayesinde apoptotik hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmakta ve sessiz sedasız bir şekilde ortadan kaldırılmaktadır (219, 226, 233, 242, 245-251).

Son yıllarda genetik ve moleküler biyoloji alanında yapılan yoğun araştırmalar sayesinde bütün hayvansal hücrelerin apoptoz ile kendilerini öldürebilecekleri genetik bir düzeneğe sahip olduğu anlaşılmıştır. Apoptozla ilgili gen ürünlerinin düzenlediği bir seri olayın aktivasyonu sonucu istenmeyen veya işe yaramayan hücrelerin ortadan kaldırılması sağlanmaktadır (219, 239, 242). Apoptozun genetik düzenlenmesi hakkındaki bilgiler *C. Elegans* adındaki toprakta yaşayan mikroskobik (~1 mm) bir nematod (yuvarlak solucan) ile yapılan ayrıntılı incelemelere dayanmaktadır (221, 242). Apoptoz, *C. Elegans*'ta CED (cell death abnormal) adlı genler tarafından kontrol edilmektedir. CED-3 ve CED-4 genlerinin ürünleri apoptoz için gerekli iken, CED-9 ise bu genleri inhibe ederek apoptoza engel olmaktadır. Sistein içeren bir aspartat proteaz olan CED-3'ün CED-4 tarafından aktive edilmesi sonucu hücre apoptoza gitmektedir. CED-9'un CED-4'e bağlanması sonucunda ise CED-3'ün aktive edilmesi engellenmekte ve bu sayede hücre yaşamaya devam etmektedir (242, 252-256). CED-3, memeli hücrelerindeki 'kaspaz'lar ile benzerlik göstermekte iken CED-4'ün 'Apaf-1' (apoptoz proteazı aktive eden faktör-1) ile CED-9'un ise apoptozu inhibe eden bir gen olan 'bcl-2' ile homolog olduğu gösterilmiştir (257-262). İnsanlarda apoptozu uyarıcı veya engelleyen çok sayıda genin bulunduğu bilinmektedir. Bcl-2, c-myc ve p53 genleri üzerinde en çok çalışılan genler olarak göze çarpmaktadır (219, 226, 242, 263-268).

C. Elegans ile yapılan çalışmalar apoptozun birbirini izleyen üç evresinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu evreler sırasıyla (1) hücreyi intihara götüren hücre içi veya hücre dışı sinyallerle apoptozun başlatılması, (2) hücre içi proteazların aktivasyonu ile hücrelerin öldürülmesi ve (3) apoptotik

hücrelerin diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılması olarak gerçekleşmektedir. Apoptozun başlatılabilmesi için hücre içinden veya hücre dışından gelen sinyallere ihtiyaç duyulmaktadır. Apoptozun hücre içi sinyallerle başlatılması, apoptotik hücre ölümünün “intrinsik yolunu”, hücre dışı sinyaller ise “ekstrinsik yolunu” oluşturmaktadır (233, 269). Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolu birbirinden tamamen bağımsız ilerleyen süreçler olmayıp, mitokondri vasıtasıyla bu iki yol arasında bağlantı kurulabilmektedir (245, 270-272). Hücre ölüm sinyallerini takiben memeli canlılara ait hücrelerde apoptozun gerçekleştirilebilmesi için sistein proteazlara (kaspazlar) ihtiyaç duyulmaktadır (273). Kaspazlar, apoptotik süreç içinde aktif olarak görev almakta ve bazılarının aktivasyonu bazılarının ise inaktivasyonu ile sonuçlanan çok sayıda hücre içi proteini parçalamaktadır (269). Apoptotik hücrelerde saptanan birçok morfolojik ve biyokimyasal değişikliğin kaspazlar tarafından hücrel proteinlerin parçalanmasına bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (274). Apoptozun son evresinde apoptotik hücreler membran yüzeyinde beliren bir takım yeni moleküller sayesinde makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınmakta ve inflamasyona yol açılmadan fagositoz ile ortadan kaldırılmaktadır (228, 233, 275, 276). Hücrede apoptozu tetikleyen hücre içi ve hücre dışı sinyalleri oluşturan moleküller, hücre içi proteazların aktivasyonu ve apoptozun gelişimi ile apoptotik hücrelerin fagositik hücrelerce ortadan kaldırılması şekil-14’de şematize edilmiştir.



Şekil 14: Apoptozun birbirini izleyen üç evresinin şematik olarak gösterimi.

Apoptozun birinci evresinde; büyüme faktörü eksikliği, Fas ligand (Fas-L) ve TNF- α gibi hücre dışı sinyallerle ya da hücre içi oksidatif stresteki artış ve DNA'da ortaya çıkan hasarlanma gibi hücre içi sinyallerle hücreler apoptoza sürüklenebilmektedir. TNF- α 'nın TNF reseptörüne bağlanması ile TRADD (TNF reseptörü-1 ilişkili ölüm bölgesi) aracılığıyla FADD (Fas ilişkili ölüm bölgesi) adı verilen adaptör proteinin aktive olması sağlanmakta, Fas-L'nin Fas reseptörüne bağlanması ise direkt olarak FADD'ın (Fas ilişkili ölüm bölgesi) aktive olmasına yol açmaktadır. Büyüme faktörü eksikliği durumunda direkt olarak ya da JNK (Janus kinaz) aracılığıyla mitokondri üzerinde yer alan proapoptotik proteinler olan Bax ve Bim'in aktive olması sağlanmaktadır. DNA hasarlanması durumunda p53 aracılığıyla Bax adı verilen proapoptotik protein aktive olmakta, hücre içi oksidatif stresteki artış durumunda ise direkt olarak Bax, Bak ve Bim gibi proapoptotik proteinler aktive edilmektedir.

Apoptozun ikinci evresinde; FADD'ın aktive olması ile kaspaz-8 ve -10'un aktive olması sağlanmakta iken Bim, Bak ve Bax gibi proapoptotik proteinlerin aktive olması ise mitokondriden sitokrom-c'nin salınımına yol açmakta ve sitokrom-c'nin sitoplazmaya çıkması sonrasında Apaf-1 (Apoptoz aktive edici faktör-1) ile birleşmesi sonucu kaspaz-9'un aktive olması sağlanmaktadır. Normal bir hücrede Bim, Bak, Bad, Bid ve Bax gibi proapoptotik proteinlerin, Bcl-2 ve Bcl-x1 gibi antiapoptotik proteinler tarafından inhibe olması sağlanmakta iken apoptoza giden bir hücrede ise proapoptotik proteinlerin fazla miktarlarda aktifleştirilmesi ile proapoptotik proteinlerin daha baskın hale geldiği görülmektedir. Kaspaz-8, -9 ve -10 gibi başlangıç kaspazlarının aktive olması ile kaspaz şalesi'nin aktifleştirilmesi sağlanmakta ve sonuç olarak cellat kaspazlar olan kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktive olması sağlanmaktadır. Cellat kaspazların aktivasyonu ise hücrede apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesine yol açmaktadır.

Apoptozun üçüncü evresinde; kaspazların aktivasyonu sonrasında apoptoza özgü morfolojik değişiklikler ortaya çıkmakta ve sonuç olarak apoptotik hücrelerin makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınması ve fagosite edilmesi ile inflamasyona yol açılmadan ortadan kaldırılmaları sağlanmaktadır.

ii. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptoz teriminin ilk kez literatürde yer almaya başladığı 1970'li yıllarda apoptotik hücrelerin saptanması amacıyla apoptoza özgü morfolojik değişikliklerin (*kromatin yoğunlaşması, hücre küçülmesi, apoptotik cisimcikler gibi*) histolojik yöntemlerle ortaya konmaya çalışıldığı fakat ilerleyen süreç içinde moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmeler sonucu morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozda rol oynadığı düşünülen bazı hücresel olayların (*kaspaz aktivasyonu ve fosfotidilserin translokasyonu gibi*) moleküler ve hücresel düzeyde belirlenmesinin de apoptotik hücrelerin saptanmasını mümkün hale getirdiği görülmektedir. Günümüzde morfolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler biyoloji yöntemleri apoptozun belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır (277-283). Apoptozun saptanmasına yönelik birçok yöntem geliştirilmiş olsa da elektron mikroskobu dışındaki diğer yöntemlerin apoptotik hücreleri net bir şekilde ortaya koyamadığı ve bu nedenle birden fazla yöntemin birlikte kullanılmasının daha uygun bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir. Kullanılan yöntemlerin herbiri apoptoz sonucu ortaya çıkan hücresel değişikliklerin (*DNA'da kırıklar oluşması, fosfotidilserinin translokasyonu ve hücre içi kaspazların aktivasyonu gibi*) yalnızca bir yönünü ortaya koymakta ve bu nedenle birden fazla yöntemin birlikte kullanılması apoptozun saptanmasında daha güvenilir sonuçlar vermektedir (277).

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

Histolojik kesitlerdeki apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak Hemotoksilen boyama (HB) yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntem, diğer metodlarla karşılaştırıldığında maliyetinin düşük olması ve kısa sürede sonuç alınabilmesi gibi avantajlara sahiptir. HB yönteminde, hemotoksilen boyasının kromatini boyamasından dolayı apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilmektedir. Apoptoz sonucu hücrenin küçülmesi, kromatinin yoğun bir görünüm kazanması, nükleusun küçülmesi ve nükleusta parçalanma meydana gelmesi HB ile gözlenebilen değişiklikler arasında yer almaktadır (245, 284).

Apoptotik hücrelerin morfolojik olarak değerlendirilmesinde ışık mikroskopunun yanısıra floresan ve elektron mikroskopu da kullanılabilir. Hoechst (Hoechst 33342) ve PI (propidium iodide) gibi floresan boyalar spesifik olarak DNA'ya bağlanmakta ve kromatin yoğunlaşması şeklinde ortaya çıkan hücresel değişiklikler floresan mikroskopu ile değerlendirilebilmektedir (285, 286). Canlı ve ölü hücrelerin ya da apoptotik ve nekrotik hücrelerin birbirinden ayırımında sıklıkla Hoechst ve PI boyası birlikte kullanılmaktadır. Hoechst boyası, tüm hücreleri boyamakta iken PI boyası yalnızca membran bütünlüğü bozulmuş olan hücreleri boyamaktadır. Hoechst ve PI boyasının birlikte kullanıldığı yöntemlerde boyanma özelliklerine göre üç grup hücre tanımlanabilmektedir. Buna göre; (1) canlı hücrelere ait nükleuslar Hoechst pozitif boyanmakta ve sağlam olarak görülmekte, (2) apoptotik hücrelere ait nükleuslar Hoechst pozitif boyanmakta ve parçalı olarak görülmekte ve (3) nekrotik hücrelere ait nükleuslar ise PI pozitif boyanmaktadır (287). Apoptotik hücrelerde, hücre membranı çoğunlukla sağlam olarak kalsa da apoptozun geç evresinde sekonder nekrozun gelişmesi sonucu membran bütünlüğünde bozulma gerçekleşebilmektedir. Buna bağlı olarak geç evredeki apoptotik hücrelere ait nükleuslarda, PI pozitif boyanma ve parçalı bir görünümün ortaya çıkabildiği bildirilmektedir (277, 287).

Elektron mikroskopu, apoptotik hücrelerin saptanmasında en güvenilir ve en değerli yöntem (altın standart) olarak kabul edilmektedir (288). Bu yöntemde apoptoza özgü morfolojik değişiklikler (*kromatinin yoğun bir görünüm kazanması, nükleusun küçülmesi ve parçalara ayrılması, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerin sağlam kalması gibi*) subsellüler düzeyde en iyi şekilde görülebilmektedir (289). Nekrozdan farklı olarak apoptozun aktif olarak gerçekleştirilen ve enerji gerektiren bir süreç olduğu gösterilmiştir (269). Buna göre apoptozun gerçekleşebilmesi için mitokondri vasıtasıyla ATP üretime ihtiyaç duyulmaktadır ki bu duruma uygun şekilde elektron mikroskopi çalışmalarında mitokondrilerin genellikle apoptotik süreçten etkilenmediği gösterilmiştir (290). Elektron mikroskopu ile dokuların incelenebilmesi için çok ince (ultra-thin) kesitlerin alınması

gerekmekte ve bu sebeple de diğer yöntemlere kıyasla daha fazla zaman aldığı ve ustalık gerektirdiği belirtilmektedir (277).

2. Histokimyasal yöntemler:

Apoptotik hücrelerin saptanması amacıyla TUNEL, M-30, kaspaz-3 ve annexin V yöntemi gibi birçok immünohistokimyasal yöntemden faydalanılabilmektedir. Bunların arasında TUNEL yöntemi sık kullanılan bir yöntem olarak göze çarpmaktadır. TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerde ortaya çıkan DNA kırıkları *in situ* olarak tanınabilmekte ve bu sayede hücre kültürü, kan örneği ve histolojik kesitlerdeki apoptotik hücreler görünür hale getirilmektedir. Araştırılan materyaldeki çok az miktardaki apoptotik hücre bile bu yöntem yardımıyla başarılı bir şekilde ortaya konabilmektedir (277). TUNEL yönteminde, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak biotin-dUTP'nin, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer edilmesi sağlanmakta ve bu sayede DNA parçacıkları biyotin ile işaretlenmiş hale getirilmektedir. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları, ortama avidin eklendiğinde görünür hale gelmekte ve ışık mikroskobu ile değerlendirilebilmektedir (291, 292). TUNEL yöntemi, ışık mikroskobunun yanı sıra floresan mikroskobu, konfokal lazer mikroskobu, faz kontrast mikroskobu ve elektron mikroskobu ile de başarılı bir şekilde kullanılabilmektedir (277). Örneğin biyotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları, ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile işaretlenmiş avidin eklendiğinde floresan mikroskobu altında görünür hale gelmektedir (293). Ayrıca TUNEL yönteminin, immünogold partiküllerinin kullanıldığı elektron mikroskobu çalışmalarıyla birleştirilmesi apoptotik hücrelere ait yapısal değişikliklerin yanısıra eş zamanlı olarak nükleustaki DNA kırıklarının da gösterilmesine olanak sağlamaktadır (294). Apoptotik bir hücrede DNA'nın genellikle 180-200 baz çifti ve bunun katları olacak şekilde internükleozomal bölgelerden spesifik bir şekilde kırıldığı gösterilmiştir (219). Fakat nekrotik hücrelerde de spesifik olmayan bir şekilde DNA kırıkları meydana gelebilmekte ve TUNEL yönteminde yanlış pozitifliğe yol açabilmektedir (269). Bu nedenle daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi amacıyla TUNEL yönteminin başka bir apoptotik saptama yöntemiyle birlikte kullanılması

önerilmektedir (277). Bu amaçla bizim çalışmamızda TUNEL yöntemine ek olarak kaspaz-3 ve transglutaminaz immünohistokimya yöntemleri kullanılmıştır.

Apoptotik hücre ölümü gerçekleşen bir hücrede normalde hücre zarının iç yüzünde yerleşmiş olan fosfotidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne doğru transloke olmaktadır (228, 295). Dış yüze doğru yer değiştiren fosfotidilserin molekülleri, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş anneksin V kullanılarak görünür hale getirilmekte ve bu sayede apoptotik hücreler belirlenebilmektedir (248, 296, 297). Bir diğer apoptoz saptama yöntemi olan M30 yöntemi ise apoptotik hücrelerde yer alan sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucunda ortaya çıkan yeni antijenik bölgelerin immünohistokimyasal yöntemlerle boyanması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem sadece sitokeratin 18'i eksprese eden epitelyal kaynaklı dokularda kullanılabilir (298).

Hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyallerini takiben apoptozun gerçekleştirilebilmesi için sistein proteazlara (kaspazlar) ihtiyaç duyulmaktadır (273). Apoptozun ekstrinsik yolunda kaspaz-8 enzimi, intrinsik yolunda ise kaspaz-9 enzimi aktive olmakta fakat son aşamada her iki kaspaz enziminin de kaspaz-3 enzimini aktive ettiği görülmektedir (269). Bu sayede kaspaz-3 enzimi birçok hücrede apoptozun gerçekleştirilmesinde aktif olarak görev almaktadır. Normalde inaktif olan prokaspaz-3, hücrenin apoptoza gitmesi ile aktif kaspaz-3 molekülüne dönüşmekte ve mevcut çalışmada da kullandığımız bir yöntem olarak aktif kaspaz-3'e yönelik antikörlerin kullanılması ile apoptotik hücrelerin immünohistokimyasal olarak saptanması mümkün hale gelmektedir (284).

Apoptotik hücrelerde, apoptoza özgü morfolojinin ortaya çıkabilmesi için kaspazlara ek olarak transglutaminaz ve endonükleaz gibi bir takım hücre içi enzimlerin aktivasyonuna da ihtiyaç duyulmaktadır (269, 299). Transglutaminazlar, apoptotik süreç içinde aktive olmakta ve hücre içi proteinler arasında γ -glutamil çapraz bağları oluşturarak proteinlerin denatüre olmasını ve katlanmasını sağlamaktadır (219). Nekrozdaki farklı olarak apoptotik hücrelerde, hücre içeriğinin dış ortama salınması engellenmekte ve

bu sayede inflamasyona yol açılmasının önüne geçilmektedir (233, 249, 250). Apoptotik hücrelerde transglutaminazlar aracılığı ile hücre içi çapraz bağların arttığı ve bu sayede hücre içeriğinin dış ortama salınmasının önüne geçildiği düşünülmektedir (300, 301). Apoptotik hücrelerdeki artmış transglutaminaz aktivitesi mRNA düzeylerinin ölçülmesiyle ya da transglutaminaza karşı antikorların kullanılmasıyla immünohistokimyasal olarak ortaya konabilmektedir (301-303). Çalışmamızda transglutaminaz immünohistokimyası apoptozun saptanmasında bir diğer yöntem olarak kullanılmıştır.

3. Biyokimyasal yöntemler:

Apoptotik bir hücrede ortaya çıkan DNA kırıkları, TUNEL yönteminin yanı sıra agaroz jel elektroferesiyle de gösterilebilmektedir. Apoptozda DNA'nın genellikle 180-200 baz çifti ve bunun katları olacak şekilde internükleozomal bölgelerden kırıldığı ve bu sayede agaroz jel elektroferesinde merdiven görünümü "ladder pattern" oluşumuna yol açtığı bildirilmektedir (269). Bu görünüm apoptozun karakteristik bir özelliği olarak kabul edilmekte ve apoptozun nekrozdaki ayrımında kullanılmaktadır (245). Fakat bazı çalışmalar apoptozda DNA'nın her zaman bu şekilde spesifik bir kırılmaya uğramadığını 50 kilobaz çifti gibi daha büyük molekül ağırlıklı DNA kırıklarına da yol açabileceğini göstermiştir (304). Bu nedenle agaroz jel elektroferesinde her zaman merdiven görünümüne rastlanmayabilmekte ve bu gibi durumlarda PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) yönteminin kullanılması gerekmektedir (277). Ayrıca incelenen doku örneğindeki apoptotik hücre sayısının yeterli miktarda olmaması durumunda agaroz jel elektroferesinde merdiven görünümünün saptanamayabileceği belirtilmektedir (305).

Flow sitometri yönteminde, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoza özgü karakteristik özelliklerin (*DNA fregmantasyonu ve fosfotidilserinin translokasyonu gibi*) saptanması mümkün hale gelmekte ve bu sayede apoptotik hücreler belirlenebilmektedir (283, 306, 307). Flow sitometri yönteminde karmaşık bilgisayar işlemleri kullanılmakta ve hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanarak kısa bir süre içinde apoptotik

hücre sayısı ortaya konabilmektedir (308). Fakat bu yöntemde apoptotik cisimciklerin de birer apoptotik hücre gibi değerlendirildiği ve bu sebeple diğer yöntemlere göre apoptotik hücre sayısının daha yüksek miktarlarda saptandığı bildirilmektedir (277). Bunlara ek olarak bir diğer biyokimyasal yöntem olan Western blotting yöntemi ile apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıkları (örn. *Bcl2*) ya da kırılıp kırılmadıkları (örn. *Kaspaz-3*) saptanabilmektedir (306).

4. Moleküler biyoloji yöntemleri:

DNA “microassays” teknolojisi, henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntem olsa da yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa süre içinde yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA’larının) tespit edilmesi mümkün olabileceği öngörülmektedir. Böylece apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyonu gibi daha pek çok durum hakkında geniş bilgi edinme olanağı mümkün olabilecektir (309).

iii. Sepsis-Apoptoz İlişkisi

Sepsis sonucu birçok organda progresif fonksiyon bozukluğunun geliştiği ve buna bağlı olarak MODS tablosunun ortaya çıktığı bildirilmektedir. MODS’a giden patofizyolojik sürecin açıklanmasında, son yıllarda apoptozun da yerini almaya başladığı görülmektedir (310, 311). *In vitro* ve *in vivo* olarak yapılan birçok sepsis çalışmasında, immün ve parankimal hücrelerde apoptotik düzensizliklerin meydana geldiği ve bu durumun sepsisin patofizyolojisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (310). Deneysel sepsis modellerinde akciğer, karaciğer, kalp, böbrek ve intestinal yapılar gibi birçok organda apoptozun artış gösterdiği ve bu artışın serum TNF- α düzeyleri ile doğru orantılı olduğu saptanmıştır (312). Yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan sepsisli hastalardan elde edilen kan örneklerinde ve hayvanlarla yapılan deneysel sepsis çalışmalarında artmış oranlarda endotel hücre apoptozuna rastlanmaktadır (313-321). Hotchkiss ve ark.’ları tarafından yapılan otopsi çalışmasında yoğun bakım ünitesinde sepsis nedeniyle ölen 20 hasta

incelenmiş ve bu çalışma sonucunda lenfositler ve intestinal epitel hücreleri olmak üzere başlıca iki tip hücrede apoptozun geliştiği gösterilmiştir (184).

Endotel hasarının sepsiste gelişen organ disfonksiyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (310). TNF- α , IL-1, INF- γ ve serbest oksijen radikallerini içeren pek çok aracı molekül endotel hücrelerinde apoptozu tetikleyebilmektedir (322-327). *In vitro* ve *in vivo* yapılan pek çok sepsis çalışması, LPS'nin endotel hücrelerinde apoptoza neden olduğunu ayrıca LPS'lerin aktive ettiği monositlerin TNF- α 'a bağımlı ya da bağımsız birtakım mekanizmalarla endotel hücrelerini apoptoza sürükleyebildiğini göstermektedir (328-331). Tüm bu bulgulardan farklı olarak, LPS'nin, endotel hücre kültürlerinde apoptoza karşı sitoprotektif etkili A1, A20 ve bcl-2 proteinlerinin upregülasyonuna neden olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (331). Maeda ve arkadaşlarının (332) yaptıkları çalışmada endotoksinin tetiklediği endotel hücre apoptozuna karşı aorta'ya ait endotel hücrelerinin daha duyarlı olduğu bunu sırasıyla pulmoner arter, sol ventrikül ve sağ ventriküle ait endotel hücrelerinin izlediği ve bu yönüyle LPS sonrası gelişen endotel hücre apoptozun organa spesifik özellik gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışma endotel hücreleri açısından endotoksine duyarlılıkta organ farklılıklarını gösteren ilk çalışma olarak dikkat çekmektedir. DIC, diffüz mikrovasküler hasar, vasküler permeabilite artışı, perfüzyon yetersizliği ve sepsiste ortaya çıkan organ disfonksiyonunun endotel hücrelerinde ortaya çıkan yaygın apoptozla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (326).

Sepsise ilişkin daha önceki yapılmış çalışmalar arasında sepsisin immün sistem hücreleri üzerinde etkileri olduğunu ve bu hücrelerde apoptozu arttırdığını ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır. Sepsisten ölen hastaların dalaklarında immünohistokimyasal boyama ile B lenfosit, CD4 T lenfosit ve folliküler dendritik hücre sayılarında anlamlı bir düşmenin olduğu gösterilmiştir (327, 333). Benzer bir düşüş sepsisli hastaların periferik kanda dolaşan lenfositleri içinde bildirilmiştir (284). Dolaşan lenfositlerdeki azalmanın, bu hücrelerde apoptozun indüklenmesine ya da bu hücrelerin dolaşımdan periferik dokulara çekilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir

(334, 335). Bu durumu destekler bir şekilde lenfositlerinde bcl-2 (apoptozu engelleyici bir protein) ekspresyonu fazla olan fareler ile yapılan çalışmalar sonucunda bu lenfositlerin sepsisin indüklediği apoptoza karşı dirençli olduğu ve sepsisteki sağ kalım oranlarında iyileşmenin meydana geldiği görülmektedir (336, 337). Daha ileri gidilerek, kontrol farelerine bcl-2 eksprese eden lenfositler transfer edilmiş ve bu hayvanlarda sepsisin indüklenmesinin ardından azalmış lenfosit apoptozuna bağlı olarak sağ kalım oranlarının arttığı gösterilmiştir (333). Septik şoktaki hastalarda lenfosit apoptozunun hızla geliştiği ve oluşan derin, inatçı lenfopeninin yüksek mortaliteyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (335). Bazı araştırmacılara göre sepsiste ortaya çıkan lenfosit kaybının, sepsisin değişik aşamalarında farklı sonuçlar doğurabileceğine inanılmaktadır. Başlangıçta lenfosit ve dendritik hücrelerin kaybı sonrasında meydana gelen inflammatuar yanıtta azalmanın daha az organ hasarına yol açtığı ve bu sayede sağ kalım oranlarını arttırdığı fakat ilerleyen zaman içinde immün hücrelerin kaybına bağlı olarak konağın enfeksiyonu sınırlama yeteneğinde bozulma ve sekonder enfeksiyonlara yatkınlık sonucunda mortalite oranlarında artışa yol açtığı düşünülmektedir (338).

SIRS ve sepsis'in yol açtığı MODS'da parankimal dokulardan akciğer, karaciğer, böbrek ve intestinal yapılarda apoptozun arttığı ve bu artışın serum TNF- α düzeyleri ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (339). Bunun tersi olarak ileum, kolon, akciğer, böbrek ve çizgili kas dokularında apoptozun TNF- α 'dan bağımsız mekanizmalarla arttığını ortaya koyan hayvan çalışmaları da bulunmaktadır (312). Sepsiste apoptozun tetiklendiği dokular içerisinde vasküler endotel ve intestinal kanal öncelikli olarak göze çarpmaktadır. Sepsiste kandaki mikroorganizmalar veya onların yapısal elemanlarının, ilk olarak damar endotelini etkilediği ve endotelial hücrelerde apoptotik hücre ölümlerine yol açtığı gösterilmiştir (139, 316, 324, 340-342). Her ne kadar ilk hedef vasküler endotel hücreler olsa da sepsisin ilerleyen aşamalarında intestinal kanalda meydana gelen apoptozun katkısıyla birlikte intestinal mukozal bariyerde meydana gelen bozulma sonucu bağırsak florasında yer alan bakterilerin sistemik dolaşıma girişinin kolaylaştığı ve

ardından immün sistemin daha fazla aktive olması sonucu sistemik inflamatuvar cevapta artışın meydana geldiği bildirilmektedir (343-347).

Sepsisli hastalarda en sık tutulan organlardan birisi de akciğerlerdir (348). Akciğer tutulumu genellikle MODS'un bir komponenti olarak "akut respiratuvar distress sendromu" (ARDS) şeklinde gerçekleşmektedir (349). Pulmoner damar endotelinde akut zedelenme, kapiller permeabilitede artış ve interstisyel alana sıvı kaçıışı sonucu inflamatuvar sürecin tezahürü olarak meydana gelen ARDS'de hem endotel hemde epitel hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne sık olarak rastlanmaktadır (350-352). ARDS'de epitel hücrelerinin yüzeyindeki Fas ekspresyonunda ve nötrofillerden çözünebilir FasL (sFasL) salınımında artış meydana geldiği, Fas ve Fas-L etkileşimi sonucu pulmoner epitel hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir (353, 354). Anti-Fas antikoru uygulanması sonrasında ARDS'de meydana gelen epitelyal apoptozun engellenebildiği gösterilmiştir (355). ARDS'de ayrıca daha önce yukarıda bahsedilen mekanizmalarla endotel hücrelerinde de apoptotik hücre ölümü gerçekleşmekte ve bu durum ARDS'nin patofizyolojisinde yer alan non-kardiyak pulmoner ödem gelişimine katkıda bulunmaktadır (317, 356-358).

Sepsisli hastalarda akciğerlere ek olarak kalpte de hemen daima fonksiyon bozukluğunun geliştiği görülmektedir. Sepsiste meydana gelen kardiyak disfonksiyonun mekanizması henüz tam olarak açığa kavuşturulabilmiş değildir (359). Hotchkiss ve ark.'larının (284) septik şoklu hastalarda postmortem olarak yaptıkları çalışmada kalp örnekleri incelenmiş ve artmış oranlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülürken çok az miktarda miyokardiyal hücre ölümüne rastlanmıştır. Septik hayvan modelleriyle yapılan çalışmaların bazılarında miyokard hücreleri incelenmiş ve hem apoptotik hemde nekrotik hücre ölümü açısından kayda değer sonuçlara rastlanmamıştır (360). Bu durumu destekler şekilde sepsiste ortaya çıkan kardiyak disfonksiyonun morfolojik yapıdaki bozukluktan ziyade fonksiyonel bozuklukla ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar bulunmaktadır (361). Bunun tersi olarak miyokard hücrelerinde ortaya çıkan apoptozun, sepsiste meydana gelen miyokardiyal disfonksiyona katkıda bulunduğunu ve

kaspaz inhibitörleri verilerek bu hücrelerde meydana gelen apoptozun engellenmesinin myokard fonksiyonlarında düzelmeye yol açtığını gösteren hayvan çalışmaları da bulunmaktadır (362, 363).

Sepsiste, serebral fonksiyon bozukluklarına rastlanmasına rağmen sepsisin beyin üzerine olan etkilerini inceleyen araştırmaların sayısı henüz patofizyolojinin anlaşılması için yeterli düzeyde değildir (15). Sepsis sonrasında santral sinir sisteminin çeşitli bölümlerinde meydana gelen apoptotik hücre ölümlerinin SİE'nin oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir (21). Sepsisli hastalarda yapılan postmortem çalışmalarda veya LPS verilerek deneysel sepsis oluşturulan sıçanlarda santral sinir sisteminin çeşitli bölümlerindeki nöronlar ve glial hücrelerde apoptozun arttığı bildirilmektedir (28, 29, 364). Mevcut çalışmada sepsis için yaygın olarak kullanılan bir model olan CLP modelinde beyin farklı bölümlerindeki apoptotik değişimler incelenerek, apoptozun sepsiste beyindeki etkilerine ışık tutulmaya ve CLP modelinin sepsisli postmortem insan beyinlerinde elde edilen bulgular ile uyumlu olup olmadığı incelenmiştir.

Sepsisle İlişkili Ensefalopati:

Sepsisle ilişkili ensefalopati (SİE), enfeksiyona karşı vücudun vermiş olduğu sistemik yanıt neticesinde ortaya çıkan yaygın serebral disfonksiyondur (15). SİE tanısının konabilmesi için hastada ensefalopatik tabloyu açıklayabilecek herhangi bir klinik durum (*hipotansiyon, hipoksi, karaciğer ya da böbrekte fonksiyon bozukluğu gibi*) veya beyin kendisinden kaynaklanan bir enfeksiyon durumunun (*menenjit, makroskobik serebrit veya beyin absesi gibi*) bulunmaması gerekmektedir (21). SİE'nin yoğun bakım hastalarında görülen ensefalopatinin en sık nedeni olduğu bildirilmektedir. SİE'nin farklı çalışmalarda %8 ila %70 arasında değişen oranlarda görülebildiği bildirilmiştir (16-20, 365-369). Klinikte sepsis ve SİE'ye ilişkin farklı tanımlamaların kullanılıyor olmasının SİE'nin görülme sıklığı ile ilgili verilerdeki değişikliğe yol açılabileceği düşünülmektedir (21). SİE bulunan sepsisli hastalarda ölüm oranları belirgin bir şekilde artış göstermektedir (16, 17, 20, 370). Sprung ve ark.'larının (16) 1333 sepsisli hastada yapmış

oldukları çalışmaya göre ensefalopatinin eşlik ettiği hastalarda ölüm oranı %49 iken mental durumu sağlam olan hastalarda ise bu oranın %26 olduğu saptanmıştır.

SİE'li bir hastada ortaya çıkan mental durum değişikliklerine bağlı olarak konfüzyondan komaya kadar değişebilen çeşitli klinik bulgular gözlenebilmektedir. Sedatize edilmemiş ve hafif derecede ensefalopatisi bulunan hastalarda konfüzyon gelişimi, uygunsuz davranışlar sergileme, dikkatsizlik ve yazı yazma yeteneğinde kayıp ortaya çıkabilmekte iken daha ciddi ensefalopati gelişen hastalarda ise deliryum, ajitasyon, bilinç durumunda kötüleşme ve koma gelişebilmektedir. Asteriksis, tremor ve multifokal myoklonus gibi böbrek ya da karaciğer yetmezliğinde sık karşılaşılan bulgulara SİE'de oldukça nadir rastlanmaktadır (17). SİE'li hastalarda motor sistemle ilgili olarak en sık ortaya çıkan klinik bulgunun ekstremitelerin pasif hareketlerine karşı artmış bir direncin görüldüğü paratonik rijidite olduğu bildirilmektedir (15). SİE'li hastalarda kranial sinir tutulumu daha az iken periferik sinir tutulumuna daha yaygın olarak rastlanmaktadır. Periferik sinir tutulumu genellikle polinöropati şeklinde olup SİE'li hastaların yaklaşık olarak %70'inde saptanmaktadır (371-374). Nöropati tablosunun iyileşme süreci aylar sürebilmekte hatta SİE tablosu geriledikten çok daha sonra nöropatinin klinik bulgularında düzelme gözlenebilmektedir (15). Polinöropati gelişmesi ile birlikte ekstremitte hareketlerinde zayıflama ve derin tendon reflekslerinde ise kayıp ortaya çıkmaktadır (375). Polinöropatili birçok hastada frenik sinir tutulumu sonucu ventilasyon desteğinin sonlandırılmasında problem yaşandığı bildirilmektedir (376). SİE genellikle simetrik olarak ortaya çıkan nörolojik bulgularla karakterizedir. Lateralizasyon bulguları SİE'li hastalarda oldukça nadir gözlenmekte ve bu sebeple hemiparezi gibi lateralizasyon bulguları gösteren hastalarda diğer etyolojik sebepler (*strok veya makroskopik fokal lezyonlar gibi*) akla getirilmelidir (15).

SİE'li hastalarda yapılan nöroradyolojik araştırmalar sonucunda genellikle anormal bir duruma rastlanmadığı bildirilmektedir. SİE'li bazı hastaların beyin MR'larında değişik derecelerde vazojenik ödeme

rastlanabildiği gösterilmiştir (15). SİE'li hastaların BOS analizi genellikle normal olup bazı hastalarda protein miktarlarının hafifçe arttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak SİE'li hastaların BOS analizinde aromatik aminoasitlerin arttığı fakat dallı zincirli aminoasitlerin ise azaldığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (377-379).

SİE'de patolojik değişikliklerin en sık gözlemlendiği beyin bölgesinin korteks olduğu fakat bazı hastalarda daha derin yapıların hatta medulla spinalis'in bile etkilenebildiği gösterilmiştir. SİE'de en sık saptanan patolojik değişikliğin beyin çeşitli bölgelerinde meydana gelen iskemik lezyonlar olduğu bildirilmektedir. Beyin purpurası, santral pontin myelinozis, DIC, hemoraji ve multifokal nekrotizan ensefalopati daha az karşılaşılan diğer lezyonlar olarak göze çarpmaktadır. Bazı hastalarda ise makroskopik ve mikroskopik olarak herhangi bir lezyona rastlanmamaktadır (21). Deneysel fekal peritonit modeli oluşturulan domuz beyinlerinde perimikrovasküler ödem, nöronal hasarlanma ve astrosit ayakçıklarında kayıp meydana geldiği gösterilmiştir (25, 26). Benzer şekilde laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda da sıçanların frontal korteksinde ve hippocampus CA1 bölgesinde perimikrovasküler ödemin geliştiği saptanmıştır (30, 31). Bogdansi ve arkadaşlarının (380) yaptığı çalışmada domuzlara intravenöz olarak canlı bakteri verilerek oluşturulan bir diğer sepsis modelinde beyin dokusunda nöronal hasarlanmaya ek olarak değişik derecelerde perimikrovasküler ödem geliştiği gösterilmiştir. Sharshar ve ark.'larının (381) septik şok gelişimi sonrasında ölen hastaların beyinlerinde yaptıkları bir çalışmada tipik multifokal nekrotizan lökoensefalopatik lezyonlara rastlanmıştır. Ayrıca Tamada ve ark.'ları (382), intravenöz olarak endotoksin verdikleri sıçan beyinlerinde, DIC gelişmesi sonucunda ölen hastaların beyinlerindeki lezyonlara benzer hemorajik intraserebral lezyonların oluştuğunu göstermişlerdir.

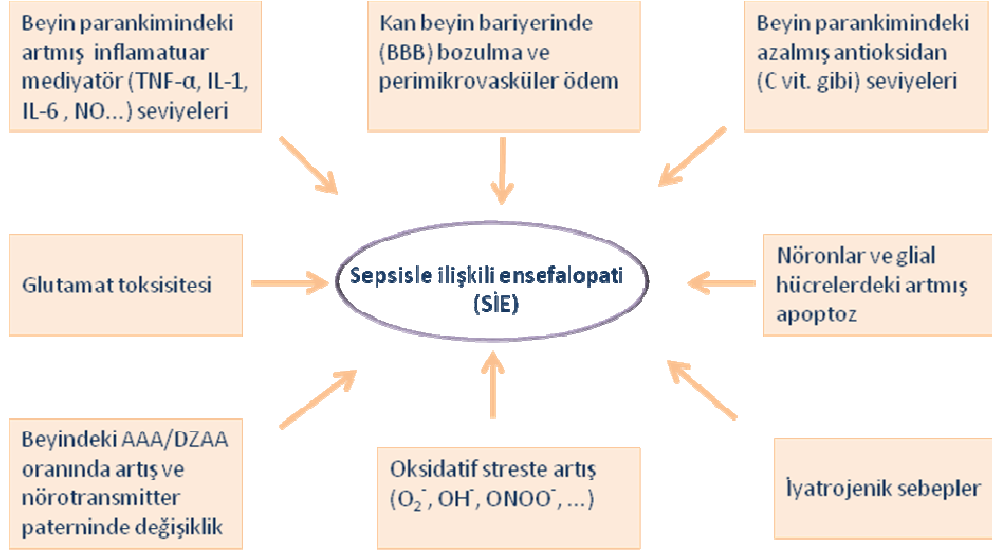
EEG'nin SİE tanısında kullanılan oldukça duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Young ve ark.'ları (383) klinik bulguların ciddiyetiyle paralellik gösteren beş sınıf EEG paterni belirlemişlerdir. Bunlar sırasıyla (1) normal EEG, (2) teta dalgalarında orta derecede yavaşlama, (3) diffüz delta

dalgaları, (4) trifazik dalgalar ve (5) süpresyon paterninden oluşmaktadır. Normal EEG'li hastalarda ölüm oranı %0 iken teta dalgasında orta derece yavaşlama olanlarda %19, diffüz delta dalgası olanlarda %36, trifazik dalgaların eşlik ettiği hastalarda %50 ve süpresyon paterni gösterenlerde ise %67 gibi yüksek seviyelerde ölüm oranı bildirilmektedir (383). Straver ve ark.'larının (20) ondört SİE'li hastada yapmış oldukları EEG çalışmasında tüm EEG kayıtlarında azalmış bir hız aktivitesi ve artmış oranlarda yavaş dalga oluşumu saptanmıştır. Bu veriler ışığında mevcut çalışmada, ÇLP uygulanan hayvanlarda SİE gelişimi ECoG kayıtları alınarak değerlendirilmiştir.

SİE'nin tanısında kullanılan bir başka yöntem olan somatosensoriyal uyarılmış potansiyel (SEP) kayıtlarının yapılması ilk defa Zauner ve ark.'ları (369) tarafından gerçekleştirilmiş ve bu çalışmada hastaların %34'ünde subkortikal yollarda ve %84'ünde ise kortikal yollarda artmış oranlarda SEP zirve azalmasının olduğu gösterilmiştir. Ohnesorge ve ark.'ları (384), deneysel pankreatit oluşturarak SIRS tablosu geliştirdikleri domuzlardan SEP kayıtları elde etmişler ve bu çalışmada hemodinamik SIRS kriterlerinin ortaya çıkmasından en az dört saat öncesinde SEP dalgalarının amplitüdünde azalmanın meydana geldiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışma neticesinde SIRS'lı hastalarda serebral fonksiyon bozukluğunun gelişip gelişmediğinin gösterilmesi açısından SEP monitorizasyon tekniğinin kullanılabilmesine ilişkin önemli veriler ortaya konulmuştur (384). Bu nedenle mevcut çalışmada SEP yöntemi, sepsisin santral sinir sistemine etkilerinin incelenmesinde bir diğer yöntem olarak kullanılmıştır.

Sepsisle İlişkili Ensefalopati'nin Patofizyolojisi:

SİE'nin patofizyolojisi günümüzde tam olarak anlaşılabilmiş değilse de oluşum mekanizmasının mültifaktöriyel olabileceği düşünülmektedir (Şekil-15)(21).



Şekil 15: SİE'deki patofizyolojik değişikliklerin şematik gösterimi.

(NO: Nitrik oksit, O_2^- : Süperoksit radikali, OH: Hidroksil radikali, ONOO: Peroksinitrit, AAA: Aromatik zincirli aminoasitler, DZAA: Dalı zincirli aminoasitler)

(Consales ve Gaudio. 2005. Minerva Anestesiol. 71: 44'deki şekilden modifiye edilmiştir.)

Sepsisli hastalarda ve sepsis oluşturulan hayvan modellerinde kandaki sitokin düzeylerinde artış meydana geldiği ve bunu takiben TNF- α , IL-1 ve IFN- γ gibi sitokinlerin kan beyin bariyerini geçerek beyinde gelişen disfonksiyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (18, 142, 385-390). IL-1, sirkümvatriküler organdaki birçok nükleusu uyarabilmekte ve bu nükleusların uyarılması sonucunda ise hipotalamus ve corpus amygdaloideum gibi limbik sisteme ait yapıların fonksiyonlarında değişiklik meydana gelerek iştahsızlık, keyifsizlik ve depresif ruh hali gibi klinik bulgular ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca IL-1'in beyin endotel hücrelerinden prostoglandin E2 (PGE2) salınımını arttırarak vücut ısısında artış meydana getirdiği de bilinmektedir (15, 391). TNF- α 'nın beyin dokusunda triptofandan kinürinin'in oluşumunu arttığı, kinürinin ise beyin dokusunda nörotoksik etkileri bulunan kinolonik asite dönüşerek ensefalopatik tablonun oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir. IFN- γ ise astrositlerdeki iNOS'u aktive etmekte ve bu sayede beyindeki NO seviyelerinde artış meydana getirmektedir (15). iNOS enzimi NO oluşumu sırasında yan ürün olarak süperoksit anyonu oluşumuna yol açmakta ve bu durumun ise beyindeki

oksidatif stresin artışına neden olarak muhtemelen ensefalopatinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (392-394). Primer astrosit kültürleriyle yapılan çalışmalarda IFN- γ ve LPS'nin birlikte uygulanması sonrasında astrositlerdeki iNOS ve arjininosüksinat sentaz ekspresyonunda artış gösterilmiştir (395, 396). Arjininosüksinat sentaz enzimi, NO'nun öncü maddesi olan arjinini sentezlemekte ve bu sayede NO seviyelerinde artışa yol açmaktadır (395). Glial hücrelerdeki arjininosüksinat sentaz ve iNOS aktivitelerindeki artış sonucunda yüksek konsantrasyonlara ulaşan NO'nun mitokondriden enerji üretimini engellediği gösterilmiştir. NO'nun bu etkisini muhtemelen sitokrom-c'nin O₂'ye olan afinitesini azaltarak yaptığı düşünülmektedir (397). IFN- γ ve LPS'nin birlikte glial hücrelere verilmesi sonucunda ATP seviyeleri normale göre çok daha düşük düzeylerde saptanmaktadır (398). SİE'li hastalarda enerji üretim mekanizmalarının bozulması sonucunda nöronlarda oksijen-glukoz yetmezliğinin geliştiği ve bu durumun ensefalopatik tablonun oluşumuna katkısı bulunduğu düşünülmektedir (18).

Sepsis sonucu kandaki miktarları artan sitokinlerin bozulmuş olan kan beyin bariyerinden geçerek ya da kan beyin bariyerinin bulunmadığı alanlardan (*sirkümventriküler organlar gibi*) parankim içine sızarak beyinde birikme eğilimi gösterdiği ve beyin dokusunda artmış düzeylere ulaşan sitokinlerin ise mikroglial hücrelerde aktivasyona yol açtığı bildirilmektedir (21, 29). Mikroglial hücrelerin aktivasyonu sonucu NO (nitrik oksit) gibi inflamatuvar mediyatörlerin yanısıra TNF- α ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımında artış meydana gelmekte ve bu durumun ise beyin parankimindeki sitokin seviyelerinin daha da artmış düzeylerde saptanmasına yol açmaktadır (29) . Sonuç olarak beyin dokusunda yüksek miktarlara ulaşan sitokinler, yukarıda bahsi geçen mekanizmalarla ya da nöronlarda meydana getirdiği apoptotik hücre ölümleriyle SİE'nin patofizyolojisine katkıda bulunabilmektedir.

SİE'de kan beyin bariyerinde bozulmanın meydana geldiği ve buna bağlı olarak intravasküler bölgeden beyin dokusuna doğru sıvı sızarak mikrovasküler ödemin geliştiği gösterilmiştir (25, 26, 30, 31). Sızan sıvıyla

birlikte bir takım substratların da beyin parankimine geçtiği bildirilmektedir. Örneğin aromatik aminoasitler, dallı zincirli aminoasitlere göre kan beyin bariyerini daha hızlı geçerek beyin parenkiminde toplanmaktadır (377, 379). Sepsisli hastalarda aromatik aminoasitlerin kan düzeylerinin dallı zincirli aminoasitlere göre daha yüksek seviyelerde olduğu saptanmıştır (379). Bu durum kan beyin bariyerinin bozuk olması nedeniyle beyin parankimine de yansımakta ve sepsisli hastaların beyin dokusundaki aromatik aminoasitlerin konsantrasyonları dallı zincirli aminoasitlere göre daha yüksek seviyelerde saptanmaktadır (399). Aminoasitlerde görülen bu değişikliklere bağlı olarak norepinefrin, dopamin ve seratonin gibi nörotransmitterlerin beyindeki konsantrasyonlarında azalma meydana gelebilmektedir (400). Nörotransmitterlerdeki bu değişikliğe bağlı olarak serotoninerjik ve noradrenerjik sisteme ait beyin bölgelerinde glukoz kullanımının azaldığı ve bunun sonucunda enerji üretim mekanizmasında ortaya çıkan fonksiyonel bozukluğun ensefalopatik tabloyu daha da ağırlaştırabileceği bildirilmektedir (18, 400, 401).

SİE'nin patofizyolojisine katkıda bulunduğu düşünülen bir diğer faktör de glutamat toksisitesidir (15). Sepsis gelişmesi sonucunda beyindeki glutamat konsantrasyonlarının beş kat kadar artabildiği ve glutamatın NMDA reseptörlerine bağlanarak nöronlar üzerinde toksik etkiler oluşturduğu bilinmektedir (15, 22). NMDA reseptör antagonistleri verilen sıçanlarda LPS'nin neden olduğu nöronal hasarlanmanın azaltılabildiği gösterilmiştir (402). Ayrıca yüksek glutamat konsantrasyonlarının SİE'li hastalarda görülen nöbetlerden sorumlu olabileceğine dair bildirilerde mevcuttur (403). Glutamat normalde astrositler tarafından Na-bağımlı bir transport mekanizması ile ortamdaki uzaklaştırılmakta iken sepsisli hastalarda bu mekanizmanın bozulduğu bildirilmektedir (15). IFN- γ ve LPS'nin birlikte verildiği sıçanlarda astrositler tarafından sodyuma bağımlı glutamat geri alınımında azalmanın gerçekleştiği ve beyin parankimindeki artmış glutamat seviyelerine bağlı olarak nöronal hasarlanma meydana gelerek ensefalopati tablosunun oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (15).

SİE'li hastalarda beyindeki artmış NO seviyelerine bağlı olarak NO'dan peroksinitrit oluşumunun arttığı ve artmış peroksinitrit konsantrasyonu neticesinde ise beyin dokusundaki oksidatif strese artış meydana geldiği gösterilmiştir (23, 24). Peroksinitritin artmış seviyeleri DNA'yı, hücre proteinleri ve hücre membranındaki lipidleri oksitleyebilmekte ve bu sayede hücrede toksik etkiler meydana getirebilmektedir (404). Endojen antioksidanların (örneğin C vitamini, E vitamini ve selenyum gibi) oksitleyici ajanları inhibe ettiği bilinmektedir (15). Endojen antioksidanlar arasında yer alan askorbik asit (C vitamini) beyin parankiminde milimolar konsantrasyonlarında olup hücresel metabolizma sonucu oluşan süperoksit radikallerini indirgemektedir. Beyin dokusunun kendisi *de novo* olarak C vitamini sentezleyemediği için beyindeki C vitamini konsantrasyonları kan seviyelerine bağlı olarak değişebilmektedir. Sepsisli hastalarda kandaki C vitamini seviyelerinin düşük olması nedeniyle beyindeki C vitamini seviyeleri de düşük konsantrasyonlarda saptanmaktadır (405). C vitamininin beyindeki düşük seviyelerinin SİE'li hastalarda ortaya çıkan artmış oksidatif stres engelleyemediği ve bu durumun sepsisli hastalarda ortaya çıkan ensefalopati gelişimine zemin hazırladığı bildirilmektedir (15, 406).

SİE'nin oluşumunda rolü olduğu düşünülen bir diğer faktör ise sepsis sonrasında meydana gelen apoptotik hücre ölümleridir. LPS verilerek deneysel sepsis oluşturulan sıçanlarda santral sinir sisteminin çeşitli bölümlerindeki nöronlarda ve glial hücrelerde apoptozun arttığı bildirilmiştir (29). ÇLP yapılan sıçanların koroid pleksus hücrelerinde, serebellum purkinje hücrelerinde ve hipokampus'un CA1 bölgesindeki hücrelerde bax ekspresyonunun artmış olduğu ve bu sayede hücrelerin apoptoza sürüklendiği gösterilmiştir (28). SİE nedeniyle ölen hastalarda otonom sinir sisteminin merkezi çekirdeklerinde apoptotik hücre ölümünün artmış olduğu görülmektedir (27). Benzer şekilde LPS verilen sıçanlarda yükselmiş NO konsantrasyonlarına bağlı olarak santral otonomik merkezlerden biri olarak kabul edilen rostral ventrolateral medulladaki (RVLM) sempatik premotor nöronlarda apoptozun geliştiği gösterilmiştir (407). Bu çalışma neticesinde RVLM'deki artmış apoptoz sonrasında sempatik vazomotor deşarjın azaldığı

ve buna bağlı olarak arteriyel kan basıncında dūşūşün meydana geldiği anlaşılmıştır. Otonom merkezlerdeki anatomik ve fizyolojik anomalilerin kardiyovasküler homeostazisin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak otonom merkezlerde meydana gelen bu lezyonların septik şoklu hastalarda ortaya çıkan tedaviye dirençli hipotansiyona katkıda bulunabileceği dūřünölmektedir (364, 408). Endotoksemi oluşturulan sıçanların hipotalamus'unda iNOS ve TNF- α ekspresyonlarının artmış olduğu ve beynin bu bölgelerinde meydana gelen apoptozun derecesiyle iNOS ekspresyon seviyeleri arasında korelasyonun bulunduğu saptanmıştır (29). iNOS aktivitesinde artış sonrasında NO yapımında artış meydana geldiği ve bu artış neticesinde bazı hücre tiplerinde (*pankreas beta hücreleri, timosit, vasküler endotel hücreleri, kalpteki miyosit hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve nöronlar gibi*) apoptotik hücre ölümlünün gerçekteştiği bildirilmektedir (71). Benzer şekilde proinflamatuvar sitokinlerin (örneğin; TNF- α , IL-1 ve IL-6) ve LPS'nin makrofaj, mikroglia ve astrosit hücrelerindeki iNOS'u uyurabileği ve bu sayede NO seviyelerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (409-411). Ayrıca nöron ve glia hücrelerinin bir arada yer aldığı hücre költürleriyle yapılan çalışmalarda LPS'nin glia hücrelerindeki iNOS'u aktive etmesi sonucunda NO düzeylerinin arttığı ve artmış NO'nun ise nöronlarda apoptoza yol açtığı bildirilmektedir (412-414). NO'nun bu hücrelerde apoptozu nasıl tetiklediğine ilişkin birçok mekanizma öne sürölmektedir. NO'nun sitokrom-c enziminin inhibisyonu ile mitokondri membran potansiyelinde azalma ve sitokrom-c'nin mitokondriden salınımında artışa yol açtığı, salınan sitokrom-c'nin ise kaspaz 9'un aktivasyonuna yol açarak hücreyi apoptoza süröklediği dūřünölmektedir (352, 415-417). Sitokrom-c'nin inhibisyonun ayrıca mitokondriden reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa yol açtığı ve sepsisli hastalarda endojen antioksidan seviyelerinin dūřük düzeylerde olması nedeniyle üretilen serbest radikallerin inhibisyonunun güçleştiği ifade edilmektedir (15, 418). Sonuçta artmış seviyelerdeki süperoksit radikalleri ve gene yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun birleşmesi neticesinde sepsisli hastaların beyinlerindeki peroksinitrit (ONOO⁻) konsantrasyonlarında hızlı bir artışın meydana geldiği,

peroksinitritin artmış seviyelerinin ise DNA'yı, hücresel proteinleri ve hücre membranındaki lipidleri oksitleyerek hücrede toksik etkiler meydana getirdiği ve hücreleri apoptoza sürüklediği düşünülmektedir (23, 151, 352, 419, 420).

LPS'nin veya TNF- α gibi sitokinlerin uyarımı sonucunda beyin endotel hücrelerinde yer alan iNOS enziminin indüklendiği ve bunu takiben artan NO seviyelerine bağlı olarak beyin endotel hücrelerinde apoptotik hücre ölümlerinin gerçekleştiği düşünülmektedir (29). Endotoksemi oluşturulan farelerde LPS'nin direkt olarak endotel hücrelerini etkilemesine veya TNF- α 'nın kandaki artmış seviyelerine bağlı olarak beyin endotel hücrelerinde artmış oranlarda apoptoza rastlanmaktadır (320). LPS'nin vasküler endotel hücrelerinde yer alan TLR-2'nin ekspresyon seviyelerinde artışa yol açtığı ve bunu takiben lipoprotein, lipoteikoik asit ve peptidoglikan gibi bakteriyel ürünlerin TLR-2'yi uarması sonucunda ise endotel hücrelerinde yer alan hücre içi bir takım adaptör proteinlerin (*MYD88 gibi*) aktivasyonunda artış görülmektedir. Adaptör proteinlerin aktivasyonu sonrasında ise hücre içi prokaspaz enzimlerinin aktif kaspaz enzimlerine dönüşümü hızlanmakta ve bu sayede endotel hücrelerinde apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir (421, 422). Sonuçta LPS'ye bağlı olarak endotel hücrelerinde ortaya çıkan artmış apoptoz sonucu endotel hasarlanması meydana gelmekte ve intravasküler sıvı beyin parankimine doğru sızarak perimikrovasküler ödem gelişebilmektedir. Gelişen tüm bu süreçler neticesinde beyinde disfonksiyon geliştiği ve ortaya çıkan ensefalopatik tablonun SİE'nin patofizyolojisine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (320, 326, 340, 423, 424).

Yukarıda bahsedilen patofizyolojik mekanizmalara ek olarak SİE'li hastalarda ortaya çıkan ensafalopatinin iyatrojenik olarak da indüklenebileceğine dair bildiriler mevcuttur (15, 21). Sepsisli hastaların yaklaşık olarak yarıya yakını yoğun bakım ünitelerinde tedavi edilmekte ve bu hastalara uygulanan solunum desteği esnasında hastaların mekanik ventilatöre uyum sağlamları açısından çoğunlukla sedatize edici ilaçlar verilmektedir (3, 425). Sepsisli hastalarda artmış LPS miktarlarına bağlı olarak karaciğerdeki sitokrom p450 enzim sistemi inhibe olmakta ve sedatize edici ilaçların metabolize edilmesi yavaşlamaktadır. Ayrıca sepsiste gelişen

organ yetmezlikleri sonucunda ilaçların atılım mekanizmasında da bozulma meydana gelebilmekte ve verilen sedatif ilaçların vücutta birikmesi sonucu bu ilaçların kandaki konsantrasyonları yüksek seviyelere çıkabilmektedir (426). Artmış düzeylerdeki sedatif ilaçlar ise beyinde oluşturdukları etkiler sonucu SİE'nin patofizyolojisine katkıda bulunabilmekte ya da SİE'ye ait nörolojik muayene bulgularının değerlendirilmesini güçleştirebilmektedir (15). Buna ek olarak sepsisli hastalar sıklıkla intravenöz olarak yüksek konsantrasyonlarda antibiyotik tedavisi almakta ve buna bağlı olarak aminofilin ve imipenem gibi ilaçların yüksek dozları hastada konvülsiv veya nonkonvülsiv nöbet gelişimine neden olabilmektedir. Ayrıca septik şokun tedavisi sırasında yüksek miktarlarda sıvı verilmesi sonucunda elektrolit dengesizliği gelişebilmekte ve hastanın nörolojik durumunu daha da kötüleştirebilmektedir (15, 427).

SİE'nin patofizyolojisi tam olarak aydınlatılabilmiş değilse de beyindeki artmış sitokin ve NO seviyelerinin, kan beyin bariyerinde meydana gelen bozulmanın, mikrovasküler yatakta meydana gelen perimikrovasküler ödemin, beyin dokusundaki aminoasit metabolizmasında ortaya çıkan bozulmanın, nöronlarda ortaya çıkan apoptotik hücre ölümlerinin ve iyatrojenik olarak tetiklenen birçok faktörün bir araya gelmesi sonucu sepsisli hastalarda SİE'ye ilişkin klinik tablonun ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Çalışmanın Amacı

Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitlilik göstermesi ve geniş çaplı klinik çalışmaların maliyetinin yüksek olması gibi olumsuz faktörler nedeniyle sepsis patofizyolojisini açıklamaya yönelik çalışmalarda genellikle septik hayvan çalışmaları tercih edilmektedir. Hayvanlara uygulanan deneysel sepsis modelinin insanlarda ortaya çıkan klinik sepsis tablosunu iyi bir şekilde taklit edebilmesi, insanlardaki sepsis patofizyolojisinin açıklanmasında daha geçerli bilgiler sağlanması ve sepsisli hastalara yönelik immünomodülatör ajanların geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. ÇLP modeli, sepsisle ilişkili çalışmalarda oldukça sık kullanılan bir yöntem olarak göze çarpmakta ve insanlardaki rüptüre apandisit veya perforate divertiküliti taklit ettiği kabul edilmektedir (175). Sepsisli hastaların %27'sinde barsak perforasyonu ve bunu takiben fekal peritonit sonucu sepsis geliştiği göz önünde bulundurulduğunda ÇLP yönteminin iyi bir sepsis modeli olduğu düşünülmektedir (428, 429). ÇLP modeli, insanlardaki klinik sepsisle birçok açıdan paralellik göstermektedir (430). Daha önceki yapılmış olan diğer deneysel sepsis modeli (*intravenöz yoldan lipopolisakkarid veya canlı bakteri verilmesi gibi*) çalışmaları dikkate alınarak ortaya konan tedavi yöntemlerinin (*TNF- α antikoru, çözünebilir TNF reseptörü veya IL-1 reseptör antagonistlerinin kullanılması ya da heparin gibi antikoagülanların kullanılması gibi*) sepsisli hastalarda uygulandığında başarılı sonuçlar vermemesi hatta mortalite oranlarında artışa yol açması septik hayvan çalışmalarının güvenilirliği ve insanlardaki sepsisi ne derece taklit edebildiği gibi konulara ilişkin kafalarda soru işareti oluşturmaktadır (184, 185, 187, 201, 202). Bu gerekçeyle bu çalışmanın planlanmasındaki temel hedeflerinden birisi ÇLP yönteminin insanlardaki klinik sepsisi ve SİE'yi ne derece taklit ettiğinin ortaya konulmaya çalışılmasıdır. Bu hedefe yönelik olarak ÇLP uygulanan sıçanlardan sepsise ilişkin klinik bulgular, vital monitorizasyon değerleri, ECoG ve SEP kayıtları ve nörolojik değerlendirme bulguları elde edilmiş ve değerlendirilmiştir.

Yukarıda açıklandığı üzere sepsis sonrasında nöronlar ve glial hücrelerde meydana gelen apoptotik hücre ölümlerinin, sepsisle ilişkili

ensefalopati (SİE)'nin patofizyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (28, 29). Sepsisin kalp, akciğer ve böbrekler gibi vital organlar üzerinde apoptotik hücre ölümleri açısından meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen pek çok çalışma bulunmaktayken, merkezi sinir sistemindeki apoptotik değişiklikleri ortaya koymaya yönelik çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. Bu nedenle çalışmamızda, ÇLP sonrası sıçan beyinlerinde ortaya çıkan apoptotik değişikliklerin, sepsiste meydana gelen hemodinamik değişikliklerde rol oynayabileceğini düşündüğümüz median preoptik nükleus (MnPO), anteroventral periventriküler nükleus (AVPe), dorsomedial hipotalamik nükleus (DMD), rostralventrolateral retiküler nükleus (RVLM) ve nucleus tractus solitarius (NTS) gibi santral otonomik merkezlerde ve yetişkin memeli beyinlerinde yeni nöron üretiminin (nörogenezis) gerçekleştirildiği germinal merkezler olan subventriküler bölge (SVZ) ve hippocampus gibi özel fonksiyonlara sahip beyin bölgelerinde değerlendirilmesi ikinci bir hedef olarak öngörülmüştür.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları

Çalışmada, ağırlıkları 270 ± 30 gram arasında değişen Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 24 adet Wistar Albino türü erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada gerçekleştirilen cerrahi ve deneysel protokoller Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi - Etik Kurulu' nun onayı alınarak yapıldı. Tüm gruptaki operasyonlar intraperitoneal olarak uygulanan tiopental sodyum (50 mg/kg) anestezisi altında gerçekleştirildi. Her grupta yapılan tüm invaziv işlemlerde steriliteye önem gösterildi ve cerrahi sonrası yara bakımı yapıldı. Sıçanlar, deney protokolleri öncesi ve sonrasında her kafeste bir adet olmak üzere 20-24 °C sıcaklıkta, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü ile tutuldu, besin ve suya serbest ulaşımları sağlandı.

Deney hayvanları protokoller öncesinde üç ayrı gruba ayrıldılar. Gruplar sırasıyla: A grubu (n=8), çekal bağlama ve perforasyon grubu; B grubu (n=8), sham kontrol grubu; C grubu (n=8), un-opere kontrol grubu olarak belirlendi. (1) Çekal bağlama ve perforasyon grubundaki hayvanlar ilgili sepsis modelinin cerrahi protokolü izlenerek cerrahi işlemlere tabi tutuldu. (2) Sham grubundaki deney hayvanlarında, vital fonksiyonların ve beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi prosedürleri yanısıra, çekal bağlama ve perforasyon grubuna benzer şekilde laparotomi uygulandı, çekum görüldü ancak bağlama ve perforasyon uygulanmadı. (3) Un-opere kontrol grubunda ise vital fonksiyonların ve beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan, invaziv ne non-invaziv girişimler dışında, dekapitasyona dek başka bir cerrahi operasyon uygulanmadı.

Nörolojik Değerlendirme

Nörolojik değerlendirmeler, vital parametrelerin monitorizasyonu öncesinde ve deney hayvanları kafeslerinden ayrılmadan yapıldı, alınan nörolojik yanıtlar 0 ila 2 arasında (0: yanıt yok, 1: zayıf yanıt, 2: güçlü yanıt)

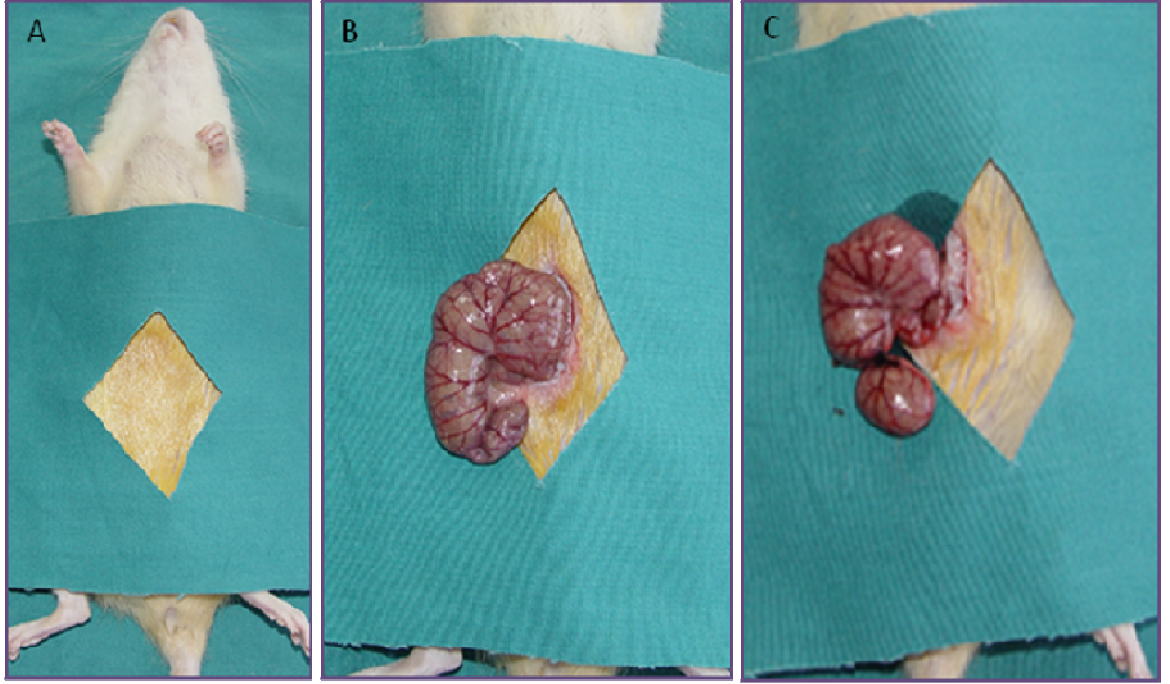
değerlendirilerek kayıt edildi. Bu amaçla 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerde basit postural somatomotor fonksiyon (pinna refleksi, korneal refleks ve kuyruk refleksi) ve kompleks postural somatomotor fonksiyon (doğrulma refleksi ve kaçma reaksiyonu) değerlendirilmeleri yapıldı. Pinna refleksi, meatus acusticus externus'a sivri bir cisimle dokunularak yapıldı ve kafa sallama reaksiyonu değerlendirildi. Korneal refleks, korneaya pamukla dokunularak yapıldı ve kafa sallama reaksiyonu değerlendirildi. Kuyruk refleksi, kuyruk distalinde ağırlı uyaran verilerek yapıldı ve geri çekme reaksiyonu değerlendirildi. Doğrulma refleksi, deney hayvanı sırt üstü bırakılarak yapıldı ve normal pozisyona dönme süresi ile değerlendirildi. Kaçma reaksiyonu ise ağırlı uyaran sonrasında hayvanın ağırlı uyaran verilen yerden uzaklaşmak amacıyla göstermiş olduğu kaçma hareketine bakılarak değerlendirildi (431-432). Herbir refleks cevaptan elde edilen 0 ila 2 arasındaki değerlendirme puanları toplandıktan sonra toplam beş adet reflekse ait en düşüğü 0 ve en yükseği 10 puan olacak şekilde *nörolojik değerlendirme skoru* hesaplandı.

Abdominal Cerrahi

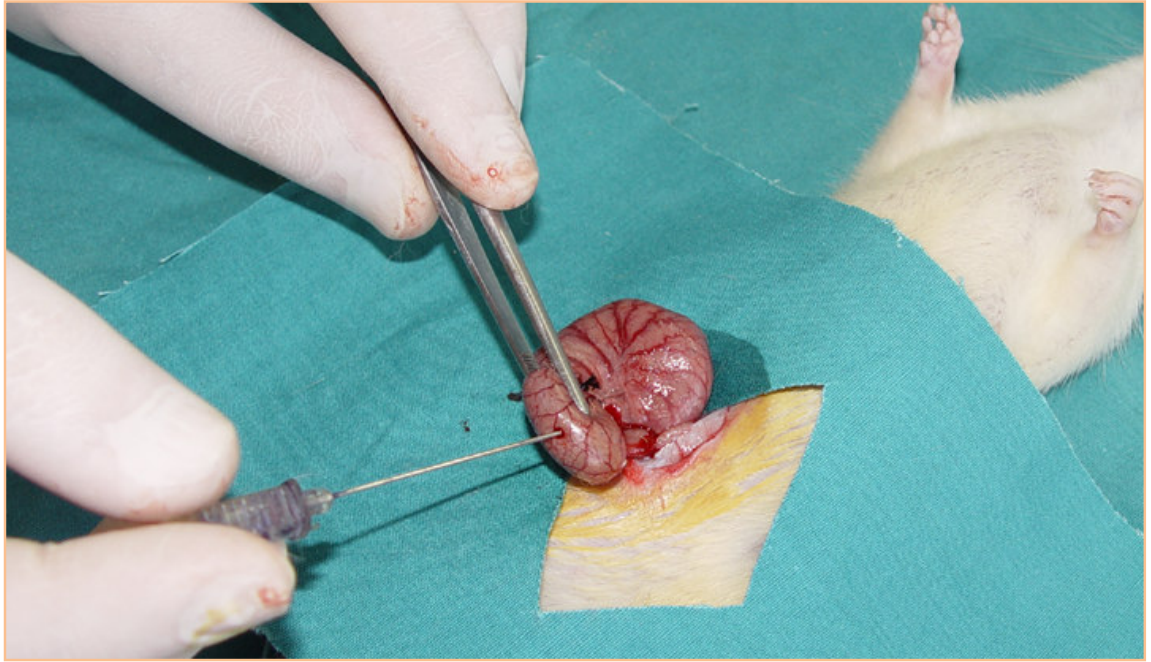
Çekal bağlama ve perforasyon grubunda (grup A) intraperitoneal olarak tiopental sodyum (50 mg/kg, ip) verilen hayvanların genel anesteziye girişi, solunum derinliği ve kardiyak fonksiyonları gözlemlendi ve anestezi derinliği kuyruk refleksi ile takip edildi. Genel anestezi altındaki hayvanlarda batin aseptik şartlarda hazırlıktan sonra (Şekil-16A), alt kadranların orta hattından ve üretral orifisin 2 cm üstünden olacak şekilde 2 cm uzunluğunda, vertikal olarak abdominal insizyon yapılarak bağırsaklar görünür hale getirildi. Abdominal insizyon sırasında minimal düzeyde travma oluşturmaya dikkat edildi. Deri ve karın ön duvarı forsepsle gerilerek sabitlendi. Daha sonra çekum bulunarak explore edildi ve bağırsakların anatomik düzlemlerine dikkat edilerek herhangi bir dönmeye izin vermeden steril cerrahi bez üzerine alındı (Şekil-16B). Bağırsak içeriği çıkan kolondan çekuma doğru yapılan masajla itilerek çekumun fekal içerikle dolması sağlandı. Gergin hale getirilen çekum, ileoçekal valv ve çıkan kolon tekrar explore edilerek ileoçekal bileşkenin altından ve çekum distalinden $\frac{1}{4}$ oranında çekum hacmini

kapsayacak biçimde ligasyon yeri belirlendi. Çekal bağlama işlemi 4/0 cerrahi iplikle tüm çekumu çepeçevre saracak şekilde ve fekal içeriğin terminal ileumdan çıkan kolona doğru olan seyrini engellemeyecek biçimde yapıldı (Şekil-16C). Daha sonra bağlı olan çekum 22 G iğne ile antimezenterik serozal yüzden iki ayrı noktadan delindi ve çekal içeriğin bağırsak lümeni dışına serbestlenmesi sağlandı (Şekil-17, 18). Perforasyon oluşturulması esnasında çekum duvarındaki kılcal damarların zedelenmemesine dikkat edildi ve bağırsak duvarından kanama olup olmadığı kontrol edildi. Yeterli sıkılıkta ve non-obstrükte yaklaşımla yapılan ligasyon ile bağırsak içeriğinin intraabdominal olarak sızmasının kolaylaştırılması amaçlandı. Çekum perforasyonu ve ligasyon işlemlerinin ardından, çekum içeriğinin serbestlenmesinin kontrolü amacıyla çekum masajı yapıldı. Daha sonra çekum dikkatlice anatomik pozisyonuna yerleştirildi ve batin aseptik olarak iki tabaka halinde 4/0 cerrahi iplikle suture edildi (Şekil-19). Cerrahi sonrası 3 ml/100g serum fizyolojik subkutan olarak verilerek sıvı dengesinin sağlanması amaçlandı ve yara antiseptik solüsyon (% 10 polivinilpirolidoniyot) ile temizlendi ve her sıçan kendine ait kafesine bırakıldı. Deney hayvanlarının abdominal yara bölgelerine 12 saatte bir topikal antibiyotik (% 0.2 nitrofurazon) uygulandı. Anesteziden çıkış ve düzleme süreçleri ayrıca takip edildi. Cerrahi sonrası, beslenme ve su içme davranışları yanında fekal çıkışları da gözlemlenerek kayıt edildi (171, 213, 215).

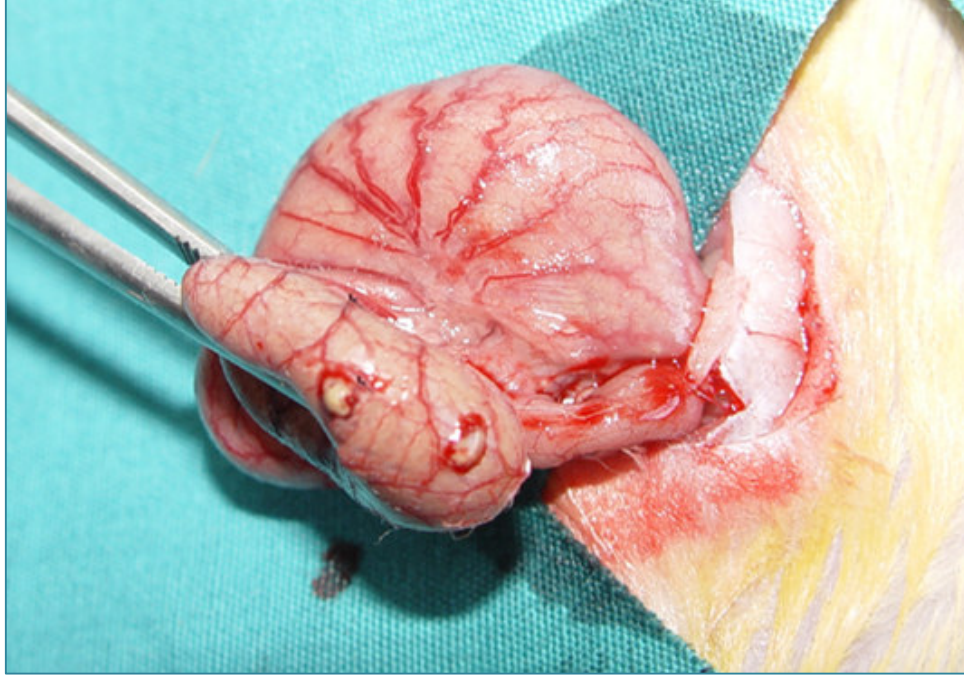
Sham grubunda (grup B), çekal bağlama ve perforasyon grubunda yapılan tüm işlemler bağlama ve perforasyon hariç tutularak uygulandı. Bu grupta, abdominal insizyon sonrası dışarı alınan çekum eksplere edildikten sonra, çekal bağlama ve perforasyon grubunda yapılan perforasyon öncesi ve sonrası işlemlere benzer şekilde masaj uygulandı ve anatomik pozisyonuna yerleştirildi. Un-opere kontrol grubunda (grup C) ise abdominal cerrahi uygulanmadı ve sıvı replasmanı yapılmadı.



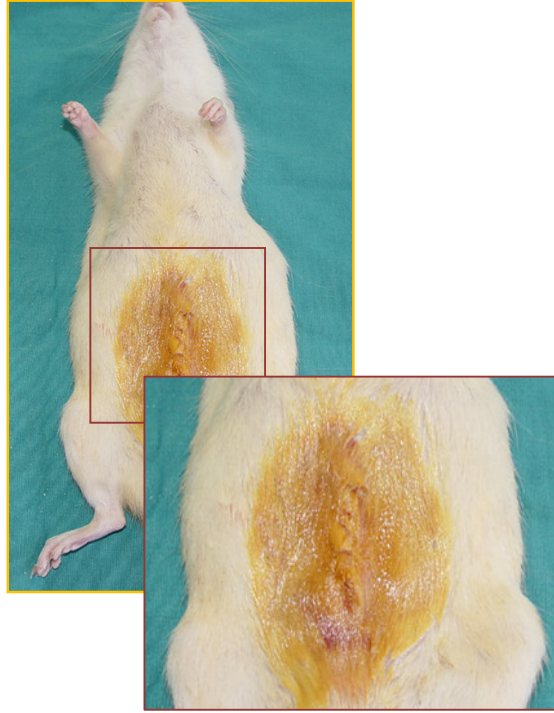
Şekil 16: ÇLP operasyonu sırasında; (A) abdominal bölgenin aseptik olarak hazırlık sonrası, (B) çekumun ortaya çıkarılarak steril cerrahi bez üzerine alınması ve (C) çekumun ¼'ünün bağlanması sonrasına ait fotoğraflar görülmektedir.



Şekil 17: Bağlanmış olan çekuma anti-mezenterik serozal yüzden 22G'luk iğne ile delik açılırken görülmektedir.



Şekil 18: Çekuma açılan deliklerin kapanmasını önlemek amacıyla bir miktar fekal içeriğin açılan deliklerden çekum dışına çıkması sağlandı.



Şekil 19: Abdominal insizyon yerinin 4/0 cerrahi ipekle suture edildikten sonraki görünümü.

Vital Parametrelerin Monitorizasyonu

Her deney grubundaki deney hayvanlarının vital parametreleri 0, 2, 6, 12 ve 24. saatleri kapsayacak şekilde non invaziv olarak monitorize edildi. Birinci zaman dilimi opere gruplarda (grup A ve B) abdominal cerrahi işlemler öncesi 30 dk. olarak belirlenirken, un-opere grupta (grup C) 0. saat olarak alındı. Monitorizasyon işlemleri sırasında kalp atım hızı, ortalama kan basıncı, rektal ısı parametreleri takip edilerek kayıt edildi. Kalp hızı ve kan basıncı parametreleri monitorizasyonu için bir veri kayıt sistemine (Mp150 Data Acquisition system, Biopac Systems Inc., CA, USA) bağlı non-invaziv kan basıncı monitorizasyon sistemi (NIBP200A- 220 V /50 Hz, Biopac Systems Inc., CA, USA) kullanıldı (Şekil-20, 21). Orta boy kısıtlayıcılar (Rxrestrainer-M) içerisinde immobilize edilen deney hayvanları ısıtıcı ünite (Tail heating unit-B, Biopac Systems Inc., CA, USA) içerisine kuyruğu kısıtlayıcının dışarısında kalacak şekilde yerleştirildi (Şekil-22, 23). Isıtıcı ünitenin ısı 32 C° ye ayarlanarak deney hayvanları ısıtıcı ünite içerisinde ölçümler öncesinde 20 dk bekletildi. Daha sonra ısıtıcı ünite dışarısına alınan deney hayvanlarının kuyruklarına IR algılayıcı (Rxtsensor-8, Biopac Systems Inc., CA, USA) ve uygun manşet (Rxtcuff-11, Biopac Systems Inc., CA, USA) yerleştirildi (Şekil-24). Ölçümler öncesi deney hayvanlarının hareketsiz kalmaları beklendi. Ardışık 10 ölçüm uygun bir veri kayıt ve analiz yazılımı (AcqKnowledge 3.7) aracılığı ile IBM uyumlu bir bilgisayar üzerinde kayıt edilerek arşivlendi. Ölçümler öncesinde Mp150 sisteminde veri örnekleme hızı 200 örnek/saniye, örnekleme süresi ise 24 saniye olarak belirlendi. Kalp hızı parametresi dakikadaki atım hızı olarak belirlenirken, kan basıncı ortalama arteriyel basınç (OAB) olarak elde edildi. Ortalama arteriyel kan basıncı ölçülen Sistolik ve Diastolik basınç değerlerinden yararlanılarak hesaplandı ($OAB = ((2 \times \text{Diastolik basınç}) + \text{Sistolik basınç}) / 3$) (433). Kalp atım hızı, her basınç ölçüm grafiğindeki basınç eğrilerinin tepe noktaları arasındaki zaman aralıkları kullanılarak ve 10 ardışık tepe noktasının ortalaması alınarak hesaplandı (Şekil-25). Deney hayvanlarının rektal ısı parametrelerinin ölçümünde "MP150 data acquisition" sistemine bağlı bir amplifikatör ünitesi (ST100C temperature unit, Biopac Systems Inc., CA,

USA) ve uygun transdüser (TSD202F, Biopac Systems Inc., CA, USA) kullanıldı. Rektal ısı ölçümleri kalp atım hızı ve kan basıncı parametrelerinin ölçümlerinden ve deney hayvanları ısıtıcı ünite içerisine yerleştirilmeden önce yapıldı. Transdüser içeren sıvı korumalı rektal prob deney hayvanlarına rektal olarak yerleştirilip 5 dakika beklenildikten sonra 2 dakikalık bir zaman dilimi boyunca ölçüldü ve kayıt edildi. 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerde 10'ar kez tekrarlanan vital parametre ölçümleri IBM uyumlu bir bilgisayara aktarıldıktan sonra elde edilen verilerin ortalamaları alınarak kayıt edildi.



Şekil 20: MP150 veri yakalama sistemi (Data acquisition system).



Şekil 21: NIBP 200A non-invaziv kan basıncı ölçüm cihazı.



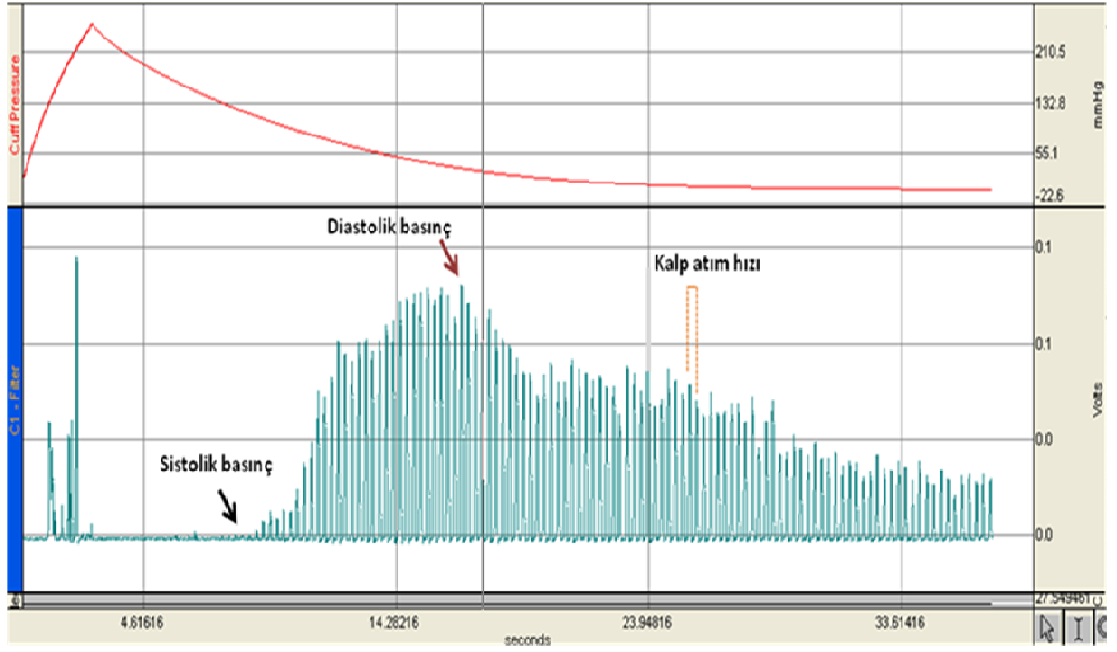
Şekil 22: Orta boy kısıtlayıcı (Rxrestrainer-M).



Şekil 23: Deney hayvanlarının ısıtılmasında kullanılan ısıtıcı ünite.



Şekil 24: Kan basıncının ölçülebilmesi için deney hayvanlarının kuyruklarına yerleştirilen IR algılayıcı (Rxtsensor-8).



Şekil 25: Kan basıncı ve kalp atım hızı değerlerinin basınç ölçüm grafiği üzerinden belirlenmesi. Birbiri ardına gelen basınç eğrilerinin artış göstermeye başladığı nokta “sistolik kan basıncı”na uymakta iken en yüksek tepe noktasına sahip basınç eğrisi piki “diastolik kan basıncı”nı işaret etmektedir. Basınç eğrilerinin tepe noktaları arasındaki zaman aralığı ise “kalp atım hızını” göstermektedir.

Beyin Elektiriksel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Beyin elektiriksel aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile her üç gruptaki deney hayvanlarının elektrokortigografileri (ECoG) ve somato-sensoriyel uyarılmış potansiyel (SEP) kayıtları alındı. ECoG ve SEP kayıtlarının alınabilmesi için deney hayvanlarına on gün öncesinde kranial elektrodlar yerleştirildi. Elektrodların yerleştirilme işlemi öncesi deney hayvanları anestetize edilerek (50mg/kg intraperitoneal, tiopental sodyum), kafatası derisi antiseptik solüsyon (% 10 polivinilpirolidonyot) ile temizlendi ve uzunluğunu üç santimetre olmak üzere bregmayı açığa çıkaracak şekilde orta hattan sagittal olarak diseke edildi. Aseptik teknikle tekrar temizlenen kafatası üzerinde bregma ve açılan kemik doku explore edildi ve ardından periost temizlenerek kurutuldu. Elektrotların yerleştirileceği vidaların takılabilmesi için Bregma’larının 10 mm anteriorunda midsagittal hattan ± 1

mm laterale iki adet, bregma 2.5 mm arkası ve 2.5 mm sağına uyan koordinatlara ise bir adet olmak üzere yüksek hızlı bir dril ve dril ucu ile üç ayrı delik açıldı (Şekil-26). Meninkslerin zarar görmemesi için dril ile birlikte uygun ve standart delici iğne uzunluğu kullanıldı. Meninkslerden kanaması olan hayvanlar deney dışı bırakıldı. Vidalar (0.8x1/8 3.2mm) açılan deliklere uygun vida tutucu (SD-1, Plastics One, USA) ile yerleştirildikten sonra epidural elektrot uçları (MS333/2A, Plastics One, USA) vidalara takıldı. Elektrotlar ve vidalar kafarasına dental sement ile tespit edildi ve kafa derisi 4/0 cerrahi iplikle dikildi (Şekil-27). Cerrahi işlem sonrası deney hayvanları sağaltım için kafeslerine bırakıldı.



Şekil 26: Kranial elektroda ait vidaların yerleştirilebilmesi için kraniyuma açılan delikler görülmektedir. (* ile işaretlenmiş nokta Bregma'yı, kırmızı noktalar ise vidaların yerleştirileceği delikleri göstermektedir.)

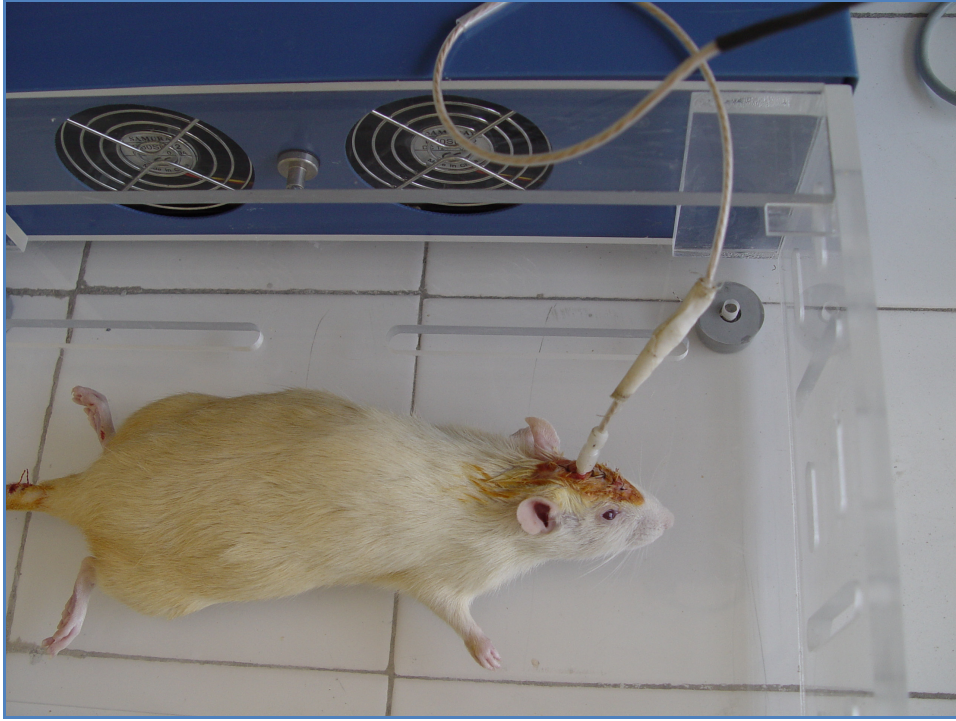


Şekil 27: Kraniyal elektrod takılmış bir deney hayvanı.

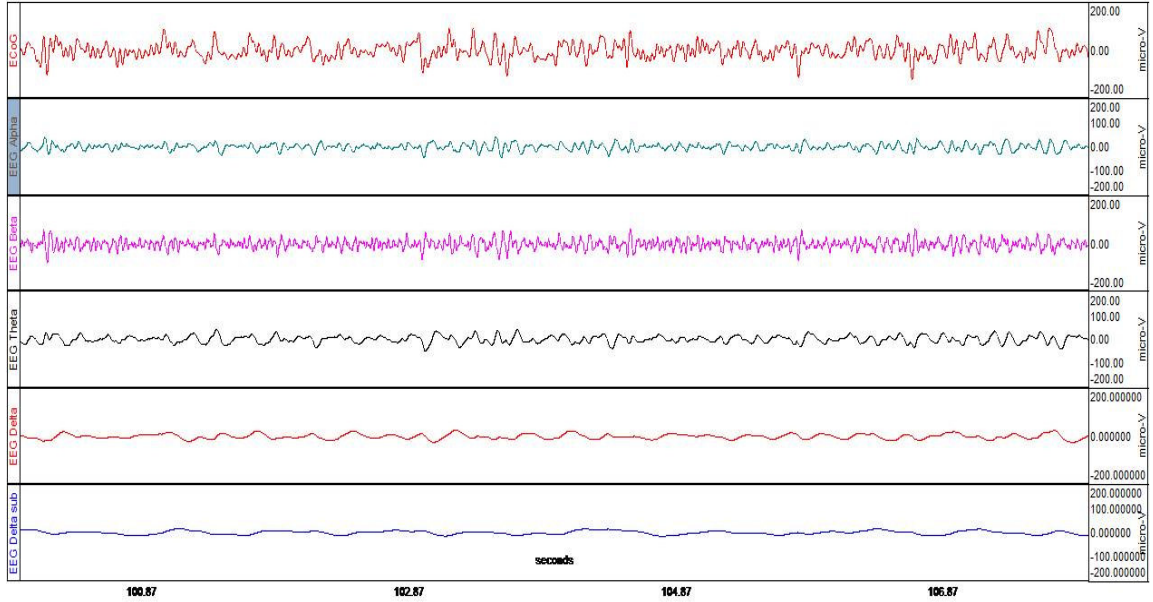
i. Elektrokortikografi (ECoG) Kayıtlarının Alınması

ECoG kayıtları için; uygun bir kablo (335-340/3 TT3C) yardımı ile elektrodların veri yakalama cihazına bağlantısı yapıldı. Verilerin yakalanmasında MP150 (Biopac Systems Inc., CA, USA) sistemi, amplifikasyonunda ise bir biyoelektrik amplifikatör modülü (EEG100C, Biopac Systems Inc., CA, USA) kullanıldı (Şekil-20). Beyin elektriksel aktivitesi ile ilgili tüm ölçümler özel plastik ve şeffaf bir kafes (30x30x35 cm) içerisinde yapıldı (Şekil-28). Her deney hayvanından uyanırken 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerde ECoG kayıtları alındı. Kayıtlar, primer somatosensoriyal kortekse yerleştirilen S1 elektrodu ve referans olarak ipsilateral frontal elektrot alınarak alındı. Kontralateral frontal elektrod toprak olarak kullanıldı. Biyoelektrik amplifikatör modülüne gönderilen sinyal 0,5 Hz “düşük akım (low pass)” ve 130 Hz “yüksek akım (high pass)” filtreleri ile filtrelenerek güç kaynağından kaynaklanan ve kas hareketleri nedeni ile oluşan artefaktlar minimize edildi. Beyin elektriksel aktivitesi en az 120 saniye boyunca devamlı olarak kaydedildi ve dijitalize edilen analog sinyal tüm spektral aralıkta ve önceden seçilmiş frekans bandları aralıklarında (alfa 8–13; beta 13–30; teta 4–8,

subdelta 0,5-1.5 ve delta 1.5-3 Hz) saniyede 2500 örnek hızında monitorize edildi (AcqKnowledge 3.7) (Şekil-29). Veriler kayıt esnasında ve sonrasında artefaktlar açısından tarandı. Dijital olarak kaydedilen veriler üzerinde “hızlı Fourier transform” (fast Fourier transform: FFT) yöntemi uygulanarak total elektriksel aktivite (güç spektrumu) saptandı. Elde edilen spektral grafik üzerinden medyan frekans (MF, toplam elektriksel gücün %50’sinin altında kalan alan) ve spektral edge frekansı (SEF 95, toplam elektriksel gücün %95’inin altında kalan alan) hesaplanarak kayıt edildi. Daha önceden belirlenmiş olan frekans bandlarının (delta 0,5-3; teta 4-8; alfa 8-13 ve beta 13-30 Hz) her birinin güçleri hesaplanarak, total güç spektrum’una olan katkısı yüzde değer olarak ifade edildi. Daha önceki yapılmış olan beyin elektriksel aktivite çalışmalarıyla karşılaştırma yapabilmek amacıyla bu çalışmaya ait total spektral güç hesaplamaları sırasında delta frekans band aralığı, subdelta frekansını da kapsayacak şekilde 0,5-3 Hz olarak belirlendi ve subdelta frekansına ait değerler delta frekansı ile birlikte hesaplandı.



Şekil 28: ECoG kayıtları alınırken görülen bir deney hayvanı.

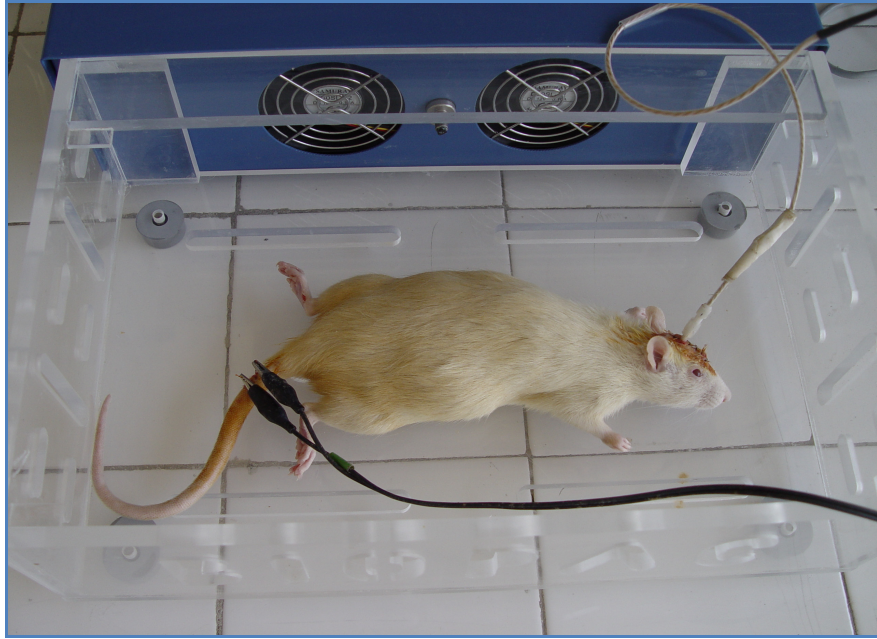


Şekil 29: Normal bir sıçandan elde edilmiş ECoG kaydı. En yukarıdaki parametre toplam elektriksel aktiviteyi, daha sonraki parametreler ise önceden seçilmiş olan frekans band aralıklarındaki (*alfa 8-13; beta 13-30; teta 4-8; delta 1,5-3 ve subdelta 0,5-1,5 Hz; sırasıyla*) elektriksel aktiviteyi göstermektedir.

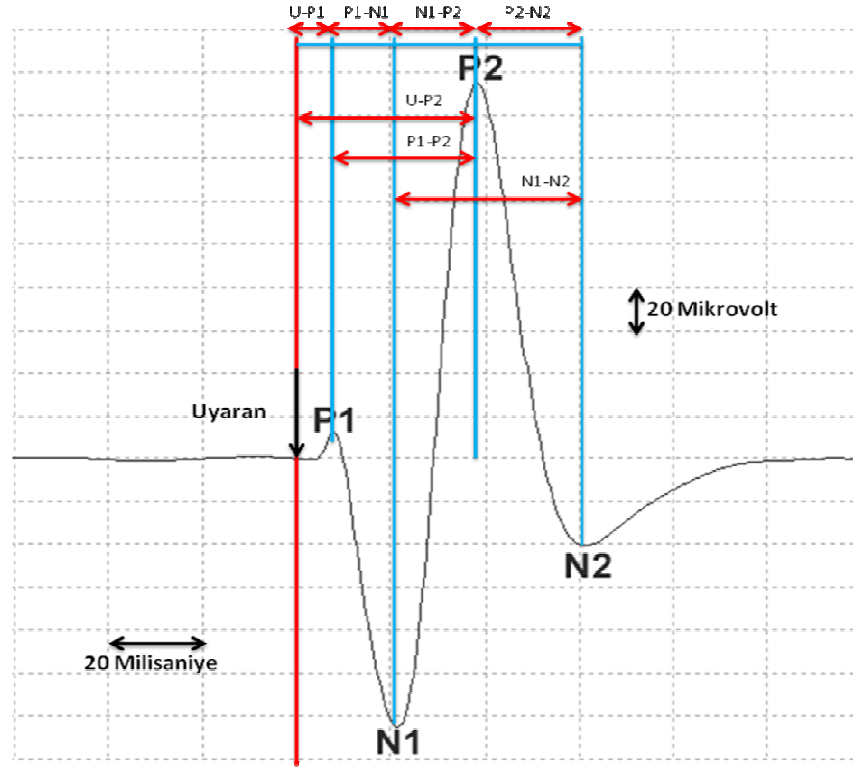
ii. Somatosensorial Uyarılmış Potansiyel (SEP) Kayıtlarının Alınması

Her deney hayvanından uyanırken 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerde SEP kayıtları çekildi. Kayıtlar S1 elektrodu ve referans olarak ipsilateral frontal elektrot alınarak alındı. Kontrlatel frontal elektrod toprak olarak alındı. SEP kuyruk proximalinden ve sol taraftan epidermisin elektriksel olarak uyarısı ile elde edildi. Uyarı için MP150 sistemi stimulator çıkışları kullanıldı. İki adet uyarı elektrodu 2 mm aralıklı olarak kuyruğa fixe edildi ve 2 ms zamanlı kare dalga elektriksel uyarı verildi. Biyoelektrik amplifikatör modülüne gönderilen beyin elektriksel aktivitesi amplifiye edilerek (2500 kat) 15-200 Hz arasında filtre edilerek 2.5 kHz örnek hızında dijital olarak monitorize edildi. Toplam 100 adet ve uyarı (2 ms, 5 mA kare dalga) ile eş zamanlı 256 veri noktası içeren SEP verisinin (uyarı öncesi 50 veri noktası ve uyarı sonrası 256 veri noktası) kayıt sırasında ortalaması alınarak grafiksel olarak kaydedildi. SEP analizleri SEP dalgalarının kayıtları sırasında deney

hayvanlarının vücut ısısı 37- 37,5 C° olacak şekilde ısıtıcı ünite (Tail heating unit-B, Biopac Systems Inc., CA, USA) içerisindeyken ve rektal ısı takibi yapılarak alındı (Şekil-30). SEP grafiklerinin analizi tüm kayıtlarda gözlemlenen 2 pozitif (P1 ve P2) ve 2 negatif (N1 ve N2) SEP dalgaları üzerinden yapıldı. P1, P2, N1 ve N2 dalgalarının bazal-tepe amplitüdlerinin (μV) yanısıra P1 piki ile P2 piki (P1-P2), P1 piki ile N1 piki (P1-N1), N1 piki ile P2 piki (N1-P2), P2 piki ile N2 piki (P2-N2), N1 piki ile N2 piki (N1-N2) arasında geçen süreler (ms) ve pozitif dalgaların mutlak gecikmeleri (uyaranın başlangıcından dalga tepesine kadar olan süre, ms) ölçüldü ve kaydedildi (434-435) (Şekil-31).



Şekil 30: SEP kaydı alınırken görülen bir deney hayvanı.



Şekil 31: Normal bir sıçandan elde edilmiş SEP kaydı. Pozitif ve negatif dalga pikleri arasında yer alan kırmızı oklar, SEP dalgalarına ait uzama (latency) mesafelerini göstermektedir.

Kan Örnekleri ve Kan Kültürleri

Her üç gruptaki deney hayvanlarından 24. saatteki monitorizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra kan örnekleri alındı. Bu amaçla anestezi altına alınan (50 mg/kg intraperitoneal, tiyopental sodyum) deney hayvanlarından intrakardiak olarak fiksatif verilmesinin hemen öncesinde kalbin sağ ventrikülüne steril bir enjektör iğnesi ile girilerek yaklaşık 5 ml kan örneği elde edildi. Alınan kan örneklerinin 1 ml'si laktat ölçümü için 1 ml'si de tam kan sayımı için EDTA'lı tüplere (BD Vacutainer™, VT 367836) alındı. Kalan 3 ml kan örneği kan kültürü için aseptik şartlar altında BD BACTEC™ PEDS PLUS™/F kültür şişelerine (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md.) aktarıldı.

Kan kültürü şişeleri, BACTEC™ 9240 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md.) kan kültür sisteminde 7 gün süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Aerop, anaerop ve mikro-aerofilik organizmalar için üreme ortamı sağlayan sistemde, üreme sinyali veren örnekler cihazdan çıkarılarak %5'lik koyun kanlı agar ve Eosin Metilen Blue Agar (EMB) plaklarına pasaj yapıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrasında üreme görülen plaklar değerlendirilmeye alınırken, üreme görülmeyen plaklar 24 saat daha inkübasyonda bekletildi. Üreme saptanan koloniler gram boyaması yapılarak; gram pozitif ya da gram negatif olma özelliğine göre değerlendirildi. İzole edilen bakterilerin identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri Phoenix™ (BDDS, Sparks, USA) otomatize sistemde çalışıldı. BACTEC™ 9240 kan kültür sisteminde üreme sinyali veren ancak %5'lik koyun kanlı agar ve EMB besiyerlerinde üreme saptanmayan örnekler; %5'lik koyun kanlı agar ve çukolatalı agarda aerobik olarak; %5'lik koyun kanlı agar, EMB ve çukolatalı agarda anaerobik (anaerobik jarda gas-pak ile) olarak yeniden inkübe edildi. Anaerobik ortamda üreme saptanan örneklerin bakteri tanımlaması, BBL Crystal™ tanımlama sistemi ile uygun kit kullanılarak yapıldı. BACTEC™ 9240 kan kültür sistemi tarafından sinyal vermeyen örnekler, bir haftalık süre sonunda negatif kültür olarak değerlendirildi.

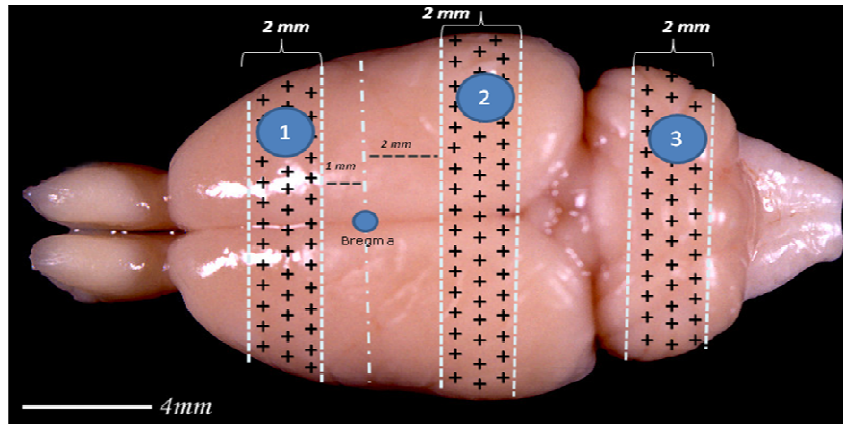
Tam Kan Sayımı ve Kan Laktat Değerlerinin Ölçümü

Alınan kan örneklerinden eritrosit, trombosit ve total beyaz küre sayısı, nötrofil, lenfosit, monosit hücrelerinin yüzdesi, retikülosit, MCV, MCH, MCHC, hemoglobin ve hematokrit değerleri Celldyn™ 3700 (Abbott Laboratories, Abbott, IL) otomatik tam kan sayımı cihazı ile ölçüldü. Kan laktat değerlerinin ölçümü için kardiyak ponksiyonla EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri buz banyosu içine konarak kısa bir süre içinde biyokimya araştırma laboratuvarına nakledildi. Kan örnekleri 3000 rpm devirde beş dakika santrifüj edilerek plazmaları başka bir tübe aktarıldı. Aeroset Analyser™ (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL.) otoanalizörde laktat değerleri fotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar mmol/L olarak ifade edildi.

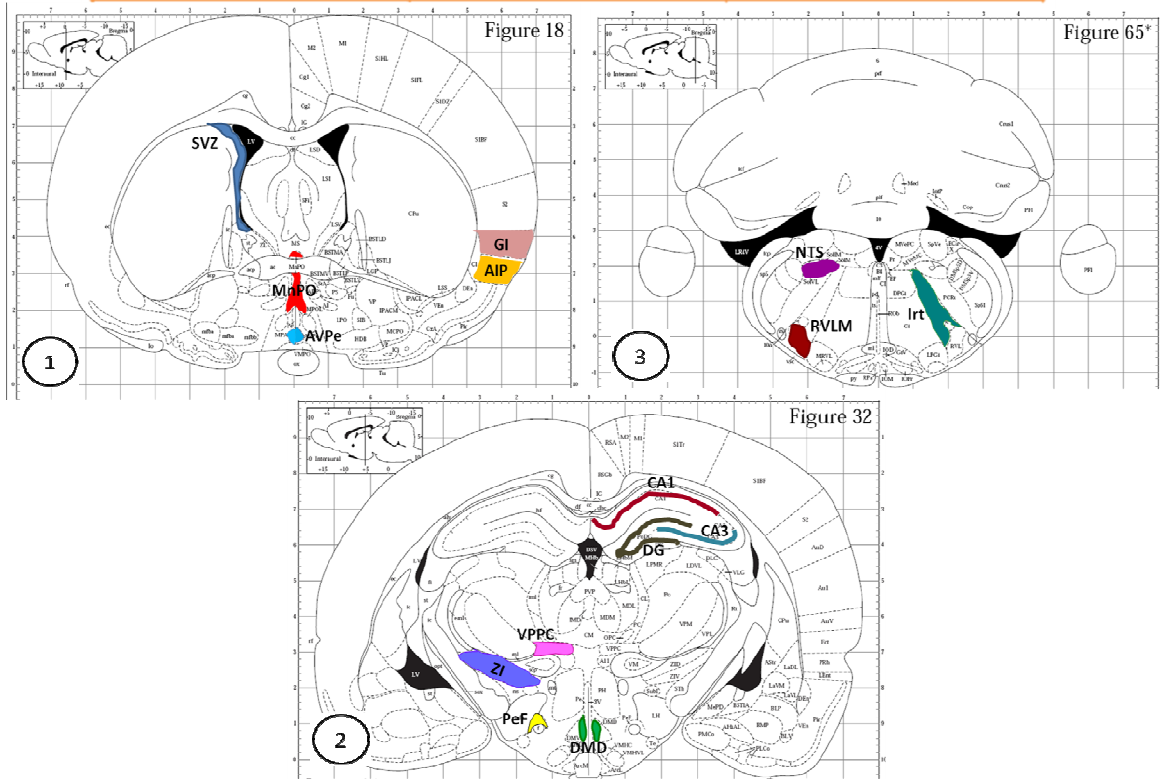
Dokuların Elde Edilmesi

Her üç gruptaki deney hayvanları 24. saatte monitorizasyon işlemlerinin tamamlanması sonrasında, beyin dokularının alınması amacı ile anestezi altına alındı (50mg/kg intraperitoneal, tiopental sodyum) ve intrakardiyak perfüzyon ile fiksatif (0.2 M fosfat buffer içinde, %4 paraformaldehid, ph 7.4) verilerek fikse edildi. Perfüzyon fiksasyonu için üretral orifisin 2 cm proksimalinden "V" şeklinde tüm batını proksimale doğru kat edecek şekilde insizyon açıldı. Bağırsaklar ve batın içi organlar görünür hale getirildi ve diaphragmaya kadar ulaşıldı. Batın üst kadrantları, diaphragma altında diaphragmaya paralel olarak horizontal biçimde insize edildi ve diaphragma-toraks ön duvarı birleşimi toraks içi organları açığa çıkarma amacıyla orta hattan açıldı. Toraks duvarları forsepslerle sabitlenerek kalp eksplore edildi. Kanama olup olmadığının kontrolünden sonra, önce kalbin sağ ventrikülüne steril bir enjektörle girilerek kan numuneleri alındı ve daha sonra sol ventriküle bir perfüzyon iğnesi yerleştirilerek sabitlendi ve sol atriya ait aurikula bulunarak ince kenarlı bir makas ile kesik atıldı. Sol ventriküle verilerek perfüzyonu sağlanan heparin içeren (1000 IU/litre) 100 ml serum fizyolojik solusyonunu takiben deney hayvanları 250- 400 ml fiksatif (0.2M fosfat buffer içinde, %4 paraformaldehid, ph 7.4) ile fikse edildi. Perfüzyon işlemi sırasında organlar renk değişiklikleri açısından takip edildi. Perfüzyon fiksasyonu işlemi sonrasında deney hayvanları giyotin ile dekapite edildi ve dekapitasyonun hemen sonrasında frontal kemik boyunca 3cm'lik sagittal bir insizyon yapılarak beyin tümüyle çıkartıldı. Çıkarılan beyinler oda ısısında olmak üzere perfüzyonda kullanılan aynı fiksatif içerisinde yıkandı ve bir gece boyunca fiksatif içerisinde bekletildi. Fiksasyon işleminden sonra beyinlerden üç ayrı koronal kesit alındı. Birinci koronal kesit bregmanın 1 mm önünden 2 mm kalınlığında, ikinci koronal kesit bregmanın 2 mm gerisinden 2 mm kalınlığında ve 3. koronal kesit cerebellum'un paraflocculus'u başlangıcından olmak üzere ve 2 mm kalınlığında alınarak parafin bloklama öncesi işlemler için kasetler içerisinde kodlandı (Şekil-32). Bloklar daha sonra artan konsantrasyonda etanol (%70, %80, %90, %96 ve %100) ile dehidrate

edilerek ksilole tabi tutuldu ve parafine gömüldü. Her iki beyin yarımküresini de içeren parafin bloklardan rotary mikrotom (American optical 820, USA) kullanılarak 5 µm'lik seri koronal kesitler elde edildi ve lizin kaplı lamlar (Sigma-Aldrich, P0425, USA) üzerine alınarak kodlandı. Immunohistokimyasal olarak boyanacak alanların belirlenmesi amacıyla her 10 kesitten biri Nissle yöntemi (% 0.1 cresyl violet) ile boyandı. Birinci parafin bloktan median preoptik nükleus (MnPO), anteroventral periventriküler nükleus (AVPe), subventriküler bölge (SVZ), granüler insular korteks (GI) ve agranüler insular korteks (AIP) alanlarını (Bregma-0.26 mm - Bregma-0.40 mm); ikinci parafin bloktan cornu ammonis-1 (CA1), cornu ammonis-3 (CA3), gyrus dentatus (DG), ventroposterior parvosellüler nükleus (VPPC), perifornikal nükleus (PeF), dorsomedial hipotalamik nükleus (DMD) ve zona incerta (ZI) alanlarını (Bregma-3.60 mm - Bregma-3.80 mm); üçüncü parafin bloktan rostralventrolateral retiküler nükleus (RVLM), nucleus tractus solitarius (NTS) ve intermediate retiküler nükleus (Irt) alanlarını (Bregma-11.80 mm - Bregma-11.96 mm) içeren kesitlerden altışar adet kesit TUNEL yöntemi için, ikişer adet kesit kaspaz-3 immunohistokimyası için ve birer adet kesit transglutaminaz immunohistokimyası için ayrılarak kodlandı (Şekil-32). Her bloktan birer kesit ise TUNEL yöntemine ait pozitif ve negatif kontroller için ayrıldı.



1. Blok	2. Blok	3. Blok
Median preoptik nükleus (MnPO)	Cornu ammonis-1 (CA1)	Rostralventrolateral retiküler nükleus (RVLM)
Anteroventral periventricüler nükleus (AVPe)	Cornu ammonis-3 (CA3)	Nucleus tractus solitarius (NTS)
Subventriküler bölge (SVZ)	Gyrus dentatus (DG)	Intermediate retiküler nükleus (Irt)
Granüler insular korteks (GI)	Ventroposterior parvosellüler nükleus (VPPC)	
Agranüler insular korteks, posterior parçası (AIP)	Perifornikal nükleus (PeF)	
	Dorsomedial hipotalamik nükleus (DMD)	
	Zona incerta (ZI)	



Şekil 32: Deneysel hayvanların beyinlerinden elde edilen koronal kesit düzeylerinin ve parafin bloklarda immünohistokimyasal olarak incelenen beyin bölgelerinin şematik olarak gösterilmesi. (Paxinos ve Watson, 1997, *The rat brain in stereotaxic coordinates, compact third edition, Academic Press, USA*)

İmmunohistokimya

TUNEL metodu

TUNEL yönteminde, apoptozun immunohistokimyasal olarak saptanması ve değerlendirilmesi amacıyla "In situ cell death detection, POD" kiti (Roche Molecular Biochemicals, 11684817910, Germany) kullanıldı. Preperatlar, 60°C de etüv içerisinde 45 dakika yüksek ısıya tabi tutulduktan sonra ksilol ile deparafinize edildi ve azalan derişiklikte etanol serisi (%100, %95, %80, %70, %40) ve distile su içerisinde rehidrate edildiler. Takiben hücreye ait protein yapıların parçalanarak hücrelerin permeabilize edilmesi ve bu sayede TUNEL karışımının nükleusa ulaşmasının sağlanabilmesi amacıyla oda ısısında 20 dakika boyunca fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde 20µg/ml proteinase K (Roche Applied Sciences, 031158444001, Germany) ile işleme tabi tutulan preperatlar daha sonra PBS ile yıkandılar ve endojen peroksidaz aktivitesinin bloke etmek amacı ile %2'lik Hidrojen Peroksit (60ml metanol içerisinde 4ml %30'luk H₂O₂) ile işleme tabi tutuldular. Daha sonra PBS ile yıkanan kesitler Triton X (Sigma-Aldrich, T-9284, USA) ile permeabilize edildiler ve tekrar PBS ile yıkandılar. Nem odası (humidity chamber) içine alınan kesitler, işaretleme amacıyla 35 µl miktarında TUNEL karışımı eklenerek 37°C etüv ısısında, 60 dakika tutuldular. TUNEL karışımı, 50 µl enzim solüsyonu (saklama tamponu içerisinde terminal deoxynucleotidyl transferase, EC 2.7.7.31, recombinant E. coli) 450 µl işaretleme solüsyonu (reaksiyon tamponu içerisinde nükleotid karışımı) ile karıştırılarak elde edildi ve kullanımdan hemen önce hazırlanarak buz üzerinde bekletildi. Daha sonra, PBS ile yıkanan kesitler, sinyal dönüşümü için 35 µl converter-POD ile 30 dakika boyunca 37°C etüv ısısında işleme tabi tutuldular. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler, substrat solüsyonu içerisinde (35 µl 1:9, diaminobenzidine/metal concentrate: peroxidase buffer, Roche Applied Sciences, 11718096001, Germany) oda ısısında 10 dakika bekletilerek peroksidaz aktivitesi görünür hale getirildi. PBS ile yıkanan kesitler daha sonra Hematoxylin (Harris's hematoxylin, Sigma-Aldrich, HHS16, USA) ile zıt boyama işlemine tabi tutulup yıkanarak kapatıldı (DPX mountant, Fluka, 44581, USA). Negatif ve pozitif preperatlar için ayrılan

kesitler işaretleme aşamasından hemen önce 35 µl DNase (DNase tamponu içerisinde 200 µg/ml konsantrasyonda DNase I (Roche Applied Sciences, Germany); DNase tamponu: 40mM Tris HCl, pH 7.6 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 10mM CaCl₂) ile 10 dakika boyunca 37°C etüv ısısında tutularak DNA zincir kırıklarının oluşması sağlandı. İşaretleme aşamasında pozitif kontrol kesitleri 35 µl TUNEL karışımı ile işleme sokulurken, negatif kontrol kesitleri yalnızca işaretleme solüsyonu (35 µl) ile işleme tabi tutularak TUNEL karışım enzim solüsyonu hariç tutuldu.

Kaspaz-3 immunohistokimyası

Kaspaz-3 immunohistokimyası yönteminde kesitler önce ksilol, azalan konsantrasyonda etanol serisi (%100, %95) ve distile su ile deparafinize ve hidrate edildiler. Kesitler daha sonra PBS ile yıkandıktan sonra 10 mM sodyum sitrat (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) tamponu (pH 6.0) içerisinde 10 dakika süreyle mikrodalga fırında (700W) ısıtılarak antijenik yapıların ortaya çıkarılması (antijen retrieval) işlemine tabi tutuldu. Distile su ile yıkanan kesitlerin etrafı PAP kalem (Sigma, Z377821, USA) ile sınırlandırıldı ve 10 dakika süre ile %3'lik hidrojen peroksit solüsyonu ile işleme tabi tutuldular. Bu işlemi takiben tekrar distile su ve PBS ile yıkanan kesitler daha sonrasında tris tampon içerisinde % 10'luk keçi serumu (tampon çözeltisi: 0.01 M tris HCl, pH 7.4, 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, % 0.1 Triton X-100) ile 30 dakika inkübe edildiler. Kesitler aynı tampon çözeltisi içerisindeki 1:100 dilüsyonda olan aktif kaspaz-3 antikoru (Chemicon, AB3623-rabbit, USA) ile gece boyunca 4°C de bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlere 50-100 µl sekonder antikor (biotinylated anti-rabbit IgG, Vectastain Elite ABC Kit) 30 dakika oda ısısında uygulandı. PBS de yıkanan kesitlere 100 µl Avidin-Biotin Kompleksi (ABC Vectastain Elite ABC Kit, USA) solüsyonu 30 dakika uygulandı. PBS ile tekrar yıkanan kesitlere 50-100 µl DAB solüsyonu (ABC Vectastain Elite ABC Kit, USA) damlatılarak boyanma 5-10 dakika boyunca monitorize edildi. Daha sonra distile su ile yıkanan kesitler hematoksilin ile 20 saniye zıt boyamaya tabi tutuldu. Distile su ile yıkandı ve artan konsantrasyonda etanol serisinde (%95, %100) ve ksilen ile dehidrate edilerek lamel ile kapatıldı.

Transglutaminaz immunohistokimyası

Transglutaminaz immunohistokimyası yönteminde kesitler önce ksilol, azalan konsantrasyonda etanol serisi (%100, %95) ve distile su ile deparafinize ve hidrate edildiler. Kesitler daha sonra PBS ile yıkandıktan sonra 10 mM sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) tamponu (pH 6.0) içerisinde 10 dakika süreyle mikrodalga fırında ısıtılarak antijenik yapıların ortaya çıkarılması (antijen retrieval) işlemine tabi tutuldu. Distile su ile yıkanan kesitlerin etrafı PAP kalemi (Sigma, Z377821, USA) ile sınırlandırıldı ve 10 dakika süre ile %3'lik hidrojen peroksit solüsyonu ile işleme tabi tutuldular. Bu işlemi takiben tekrar distile su ve PBS ile yıkanan kesitler daha sonrasında tris tampon içerisinde % 10'luk keçi serumu (tampon çözeltisi: 0.01 M tris HCl, pH 7.4, 1mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, % 0.1 Triton X-100) ile 30 dakika inkübe edildiler. Kesitler aynı tampon çözeltisi içerisindeki 1:100 dilusyonda olan transglutaminaz antikoru (Chemicon, AB3623-rabbit, USA) ile gece boyunca 4°C de bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlere 50-100 µl sekonder antikor (biotinylated anti-rabbit IgG, Vectastain Elite ABC Kit) 30 dakika oda ısısında uygulandı. PBS de yıkanan kesitlere 100 µl Avidin-Biotin Kompleksi (ABC Vectastain Elite ABC Kit, USA) solüsyonu 30 dakika uygulandı. PBS ile tekrar yıkanan kesitlere 50-100 µl DAB solüsyonu (ABC Vectastain Elite ABC Kit, USA) damlatılarak boyanma 5-10 dakika boyunca monitorize edildi. Daha sonra distile su ile yıkanan kesitler hematoksilin ile 20 saniye zıt boyamaya tabi tutuldu. Distile su ile yıkandı ve artan konsantrasyonda etanol serisinde (%95, %100) ve ksilen ile dehidrate edilerek lamel ile kapatıldı.

Hücre Sayımı

Çalışmada yer alan hayvanlardan elde edilen ve TUNEL yöntemi ile işaretlenen beyin kesitlerinde pozitif olarak işaretlenmiş olan apoptotik hücreler, bir görüntü analiz programı olan Scion Image 4.02 analiz programı kullanılarak sayıldı. Scion Image programıyla hücre sayımının yapılabilmesi için kesitlerden elde edilmiş görüntüler MS Windows uyumlu bilgisayar, mikroskop adaptörlü dijital fotoğraf makinesi (Sony, Cybershot DSC-F717) ve trinoküler mikroskop (Nikon, 4S-2 Alphaphot) kullanılarak dijital ortama

aktarıldı. Çalışmada, TUNEL pozitif hücreler; hem apoptotik hücre ölümüne özgü morfolojik özellikler (hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleusun koyu boyanması gibi) hem de boyanma özellikleri dikkate alınarak belirlendi ve mikroskopun X40'lık büyütmesi altında 1 mm² alandaki tüm TUNEL pozitif hücreler sayıldı. Sayım işlemi her hayvan için toplam beş kesitte tekrarlandı ve bu sayıların ortalaması o hayvan için TUNEL pozitif hücre sayısı olarak belirlendi.

İstatistik

Kan basıncı, kalp atım hızı ve rektal ısı gibi vital parametrelerin, medyan frekans ve SEF 95 gibi ECoG parametrelerinin ve SEP dalgalarına ait amplitüd ve uzama (latency) değerleri gibi SEP parametrelerinin istatistiksel olarak analizi sırasında, deney boyunca her grubun başlangıç değerleriyle olan karşılaştırmalarında “One-Way Repeated Measures ANOVA (Varyans analizi)” istatistik yöntemi kullanıldı. Değişkenler arasında normal dağılımın olmadığı durumlarda ise “Friedman Repeated Measures ANOVA on Ranks” istatistik testi tercih edildi. Daha sonra veriler, deney grupları arasındaki karşılaştırmalar amacıyla, “Kruskal Wallis testi” ile değerlendirildi ve anlamlı farklılıkların bulunduğu durumlarda “Mann-Whitney U testi” yardımıyla grupların ikili olarak karşılaştırılması sağlandı. Beynin değişik alanlarındaki TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan hücre sayılarının ya da kandaki laktat ve hemogram parametrelerinin, gruplar arası farklılıklar açısından karşılaştırılmasında da diğer parametrelerde olduğu gibi “Kruskal Wallis testi” kullanıldı ve bu testin anlamlı farklılık bulunduğu durumlarda “Mann-Whitney U testi” ile gruplar ikili olarak karşılaştırıldı. İstatistik testlerinin uygulanmasında Sigma-stat 3.0 ve SPSS 16.0 programları kullanıldı ve tüm karşılaştırmalarda $p < 0.05$ anlamlı bir farklılık olarak kabul edildi.

BULGULAR:

Klinik ve Laparotomik İnceleme Bulguları

ÇLP grubundaki tüm hayvanlarda çekal bağlama ve delme işleminden sonra piloereksiyon, laterji, titreme, oküler ve nazal akıntı gibi belirgin sepsis bulguları gözlemlendi. Bazılarında bunlara ek olarak ishal de eşlik etmekteydi. Sham ve kontrol grubundaki hayvanlarda ise sepsiste gözlenen bu tür klinik bulgulara rastlanmadı. Çalışmanın 24. saatinde anestezi altında (50 mg/kg, ip, tiyopental sodyum) yapılan laparotomik incelemede kontrol ve sham grubundaki hayvanlarda peritoneal kavitenin temiz olduğu ve peritoneal sıvının şeffaf görünümlü olduğu gözlemlendi. ÇLP grubunda ise peritoneal sıvı kötü kokuluydu ve çekum çevresinde yer yer püy oluştuğu görüldü. Kontrol ve sham grubunda çekum, çevre omentum ve ince barsak kıvrımlarından bağımsız bir şekilde yer almakta ve parlak-canlı görünümlü olarak gözlenmekteydi. ÇLP grubunda ise bağlı olan çekumun ileri derecede ödemli, iskemik ve mat görünümlü olduğu ve çevredeki ince barsak kıvrımlarıyla belirgin bir biçimde yapışıklık gösterdiği gözlemlendi.

Nörolojik Muayene Bulguları

Nörolojik muayene bulguları değerlendirildiğinde; ÇLP ve sham gruplarında, anestezinin etkisi sonucu ilk 2 saatte nörolojik değerlendirme skorunun 0 (sıfır) olduğu görüldü. Bunu takip eden 2 ila 12. saatler arasında anestezinin etkisindeki azalmaya bağlı olarak refleks cevaplar açısından hem sepsis hem de sham gruplarında kısmi cevap alınmaktaydı. 24. saatteki değerlere bakıldığında ise refleks cevapların sham grubunda başlangıç değerleri seviyesine yükseldiği fakat ÇLP grubunda başlangıç değerlerinin %70'ine ulaşabildiği görüldü (Tablo-2). Nörolojik değerlendirme skoru açısından üç grup arasında 2, 6, 12 ve 24. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.001$). Refleks cevaplara ait toplam değerler, 2, 6 ve 12. saatlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sepsis ve sham gruplarında anlamlılık göstermekteydi ($p < 0.05$). 24. saatteki değerlere bakıldığında ise ÇLP ile sham ve ÇLP ile kontrol grupları arasında anlamlı bir

farklılık göze çarpmakta, sham ve kontrol grupları arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı ($p<0.05$) (Tablo-2).

Saat	ÇLP	SHAM	KONTROL
0	10±0	10±0	10±0
2	0±0 [†]	0±0,0 [†]	10±0
6	2±1,1 [†]	2±0,7 [†]	10±0
12	6±1,9 [†]	7±1,4 [†]	10±0
24	7±2,2 ^{†‡}	10±0,5	10±0

Tablo 2: ÇLP, sham ve kontrol gruplarında nörolojik değerlendirme skorları (ortalama±SEM). ([†], kontrol grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$; [‡], sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$)

Mortalite Oranları

ÇLP yapılan 33 hayvandan beş tanesinin anestezinin etkisi sonucu solunum durmasına bağlı olarak öldüğü, altı hayvanın ise ÇLP sonrası ortaya çıkan septik tablo sonucu öldüğü görüldü. Anestezi sonucu ölen beş hayvan hariç tutulduğunda ÇLP yapılan hayvanlardaki mortalite oranı yaklaşık %20 olarak hesaplandı. ÇLP yapıldıktan 24 saat sonra yaşamayı başaran 22 hayvan arasından sekiz tanesi rastgele örneklem yöntemi ile seçildi ve bu çalışmadaki ÇLP grubunu oluşturmak üzere çalışmaya dahil edildi. Sham grubunda yalnızca bir hayvan anestezi nedeniyle kaybedildi ancak hiçbir hayvanda sham operasyona bağlı ölüme rastlanmadı.

ÇLP'nin Vital Parametreler Üzerine Olan Etkisi

Araştırmada kullanılan kontrol, sham ve ÇLP grubu deney hayvanlarından 0, 2, 6, 12 ve 24. saatte elde edilen vital parametrelere ait moniterizasyon sonuçları Tablo 3 ve Şekil 33'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; kan basıncının, ÇLP ve sham gruplarında ilk iki saatte

düşme eğilimine girdiği görüldü. ÇLP grubunda 2 ila 6. saatler arasında artış gösteren kan basıncı değerlerinin, 6. saat sonrasında tekrar düşme eğilimi gösterdiği ve kan basıncındaki düşüşün 12. saatten itibaren başlangıç değerlerine göre anlamlı düzeye ($p= 0.017$) ulaştığı saptandı (Şekil-33A, Tablo-3). Kan basıncı değerlerinin ÇLP grubunda, 24. saatte başlangıç değerlerine göre %43'lük seviyelere gerilediği görülmekteydi ($p= 0.012$). Sham grubunda ilk iki saatte ortaya çıkan düşme eğiliminin, 12. saatte anlamlı bir seviyeye ($p= 0.012$) ulaştığı ve başlangıç değerlerine göre %75 seviyesine kadar gerilediği görüldü. Bu grupta 12. saatten sonra yükselme eğilimine giren kan basıncının 24. saatte başlangıç değerlerine göre %19 oranında daha düşük seviyede seyrettiği ($p= 0.036$) ve düzelme eğilimi içinde olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise ilk iki saatte relatif düşüşe rağmen kan basıncının seyri açısından belirgin bir farklılık görülmedi. Kan basıncı için Kruskal Wallis test analizi, üç deney grubu arasında 24. saatte anlamlıydı ($p= 0.004$). Mann Whitney-U testi ile *post hoc* karşılaştırma sonucunda ise ÇLP grubunda kan basıncındaki düşüşün hem kontrol hem de sham grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmekteydi ($p= 0.002$ ve $p= 0.012$, sırasıyla) (Şekil-33A).

Kalp hızı, ÇLP grubunda, başlangıç monitorizasyonundan itibaren sürekli bir artış eğilimi göstermekte, bu artış 6, 12 ve 24. saatte anlamlılık kazanmakta ($p= 0.03$, $p= 0.016$ ve $p= 0.012$, sırasıyla) ve 24. saatte başlangıç değerlerine göre %144'lük seviyelere yükselmekteydi. Sham ve kontrol grubunda ise kalp hızının seyri açısından belirgin bir değişiklik gözlenmedi (Şekil-33B, Tablo-3). ÇLP, sham ve kontrol gruplarının kalp hızı parametresi açısından Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında, üç deney grubu arasında 6, 12 ve 24. saatlerde anlamlılık görüldü ($p=0.017$, $p=0.012$ ve $p= 0.004$, sırasıyla). Mann Whitney-U testi ile yapılan *post hoc* karşılaştırmalar, ÇLP grubunda görülen kalp atım hızı artışının sham grubuna göre 6, 12 ve 24. saattlerde ($p= 0.012$, $p= 0.009$ ve $p=0.002$, sırasıyla), kontrol grubuna göre ise 12 ve 24. saatlerde ($p= 0.016$ ve $p= 0.003$, sırasıyla) anlamlılık göstermekteydi.

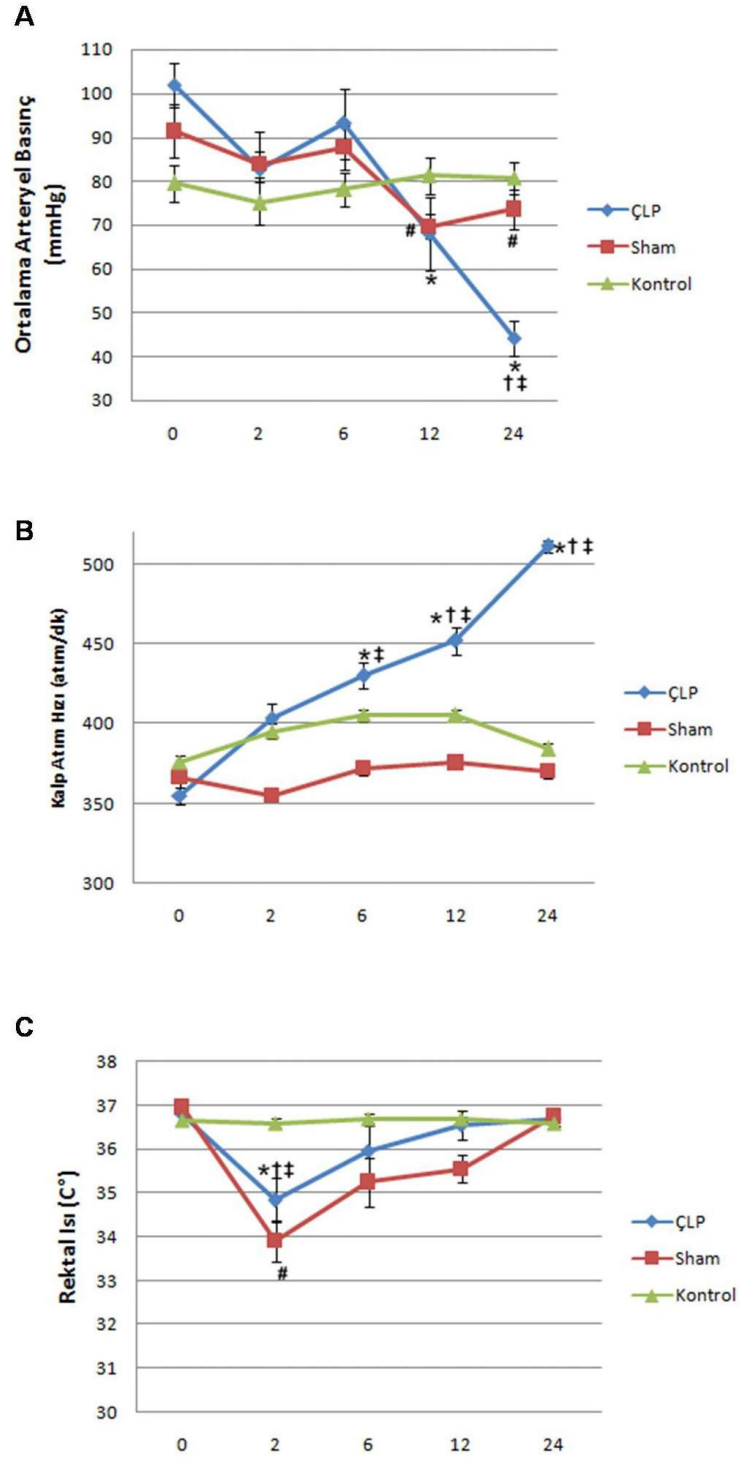
Rektal ısı parametresinin, ÇLP ve sham grubunda ilk iki saatte belirgin bir düşme eğilimine girdiği, ÇLP grubunda başlangıç değerleriyle kıyaslandığında 2. saatte ($p=0.012$) ve sham grubunda ise 2, 6 ve 12. saatte anlamlı düzeyde düşük olduğu ($p= 0.043$, $p= 0,017$ ve $p= 0.024$, sırasıyla) görüldü. Ancak rektal ısının bu iki grupta deney boyunca kademeli olarak artış eğilimi gösterdiği, ÇLP grubunda 12. saatte, sham grubunda ise 24. saatte normal değerlerine yükseldiği saptandı (Şekil-33C, Tablo-3). Kontrol grubunda ise rektal ısının seyri açısından belirgin bir farklılık görülmedi. Kruskal Wallis test analizi, rektal ısı parametresi açısından üç deney grubu arasında ikinci saatte anlamlı farklılık olduğunu gösterdi ($p= 0.029$). Mann Whitney-U testi ile yapılan *post hoc* karşılaştırmada 2. saatte kontrol ile ÇLP ve kontrol ile sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü (sırasıyla $p= 0.024$ ve $p= 0.036$) (Şekil-33C).

Tablo 3: ÇLP, sham ve kontrol gruplarına ait vital parametre değerleri (ortalama±SEM).

	Kan basıncı (mmHg)		
Saatler	ÇLP	Sham	Kontrol
0	102,0±14,0	91,4±17,4	79,5±10,9
2	82,6±24,8	83,9±8,8	75,0±8,4
6	93,0±22,5	87,7±14,1	78,2±6,5
12	68,0±23,8	69,6±7,8	81,2±7,0
24	44,2±11,3	73,6±13,1	80,7±6,2

	Kalp atım hızı (atım/dakika)		
Saatler	ÇLP	Sham	Kontrol
0	354,6±26,5	366,6±16,8	376,2±16,0
2	403,8±45,3	354,6±65,4	395,2±15,3
6	430,1±18,3	372,4±49,1	405,4±18,4
12	451,9±29,2	375,4±31,2	405,1±17,3
24	511,3±29,2	370,1±31,8	384,0±17,3

	Rektal ısı (C°)		
Saatler	ÇLP	Sham	Kontrol
0	36,8±0,4	37,0±0,4	36,7±0,3
2	34,8±1,5	34,1±1,4	36,6±0,2
6	36,0±1,6	35,0±1,5	36,7±0,2
12	36,6±0,9	35,7±0,7	36,7±0,1
24	36,7±0,4	36,7±0,3	36,6±0,1



Şekil 33: Vital fonksiyonların monitorizasyon grafikleri.
 (‡, sham grubuna göre anlamlılık, $p < 0.05$; †, kontrol grubuna göre anlamlılık, $p < 0.05$; *, ÇLP grubunda başlangıç değerlerine göre anlamlılık, $p < 0.05$; #, sham grubunda başlangıç değerlerine göre anlamlılık; $p < 0.05$)

ÇLP'nin kan laktat değerleri, kan kültürleri ve hemogram üzerine olan etkisi

Kan laktat seviyelerinin, ÇLP ve sham gruplarında kontrol grubuna oranla daha yüksek seviyelerde olduğu görüldü (Tablo-4). Bu yükselmenin özellikle ÇLP grubunda belirgin olduğu, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği belirlendi ($p=0.029$). Kontrol ile sham grupları arasında ise kan laktat düzeyleri açısından herhangi bir farklılık görülmedi.

Total beyazküre sayısı, sham ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ÇLP grubunda daha düşük miktarlardaydı. Fakat bu düşüklük Kruskal Wallis testi ile analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi. ÇLP grubunda, kandaki nötrofil yüzdesinde herhangi bir değişiklik görülmez iken lenfosit ve bazofil miktarlarında düşüş, eozinofil ve monosit miktarlarındaysa artış tespit edildi. Bu kan değerlerinin Kruskal Wallis testi ile analizi sonucunda yalnızca monosit yüzdesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.049$). Kandaki monosit miktarlarının ÇLP, sham ve kontrol grupları arasında ikili gruplar arasında Mann Whitney-U testi ile analizi sonucunda kontrol ile sham ve ÇLP ile sham grupları arasında herhangi bir farklılık bulunmazken, ÇLP ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlendi ($p=0.029$) (Tablo-4).

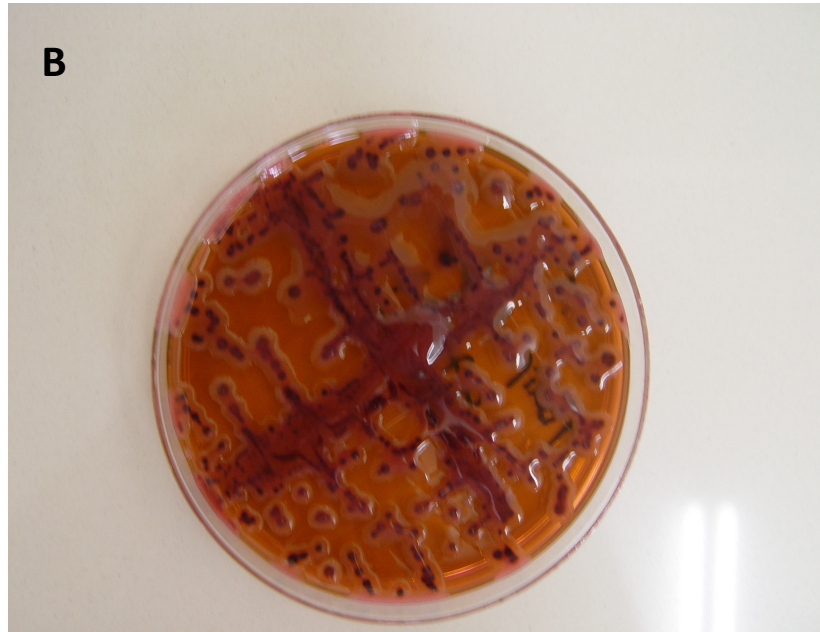
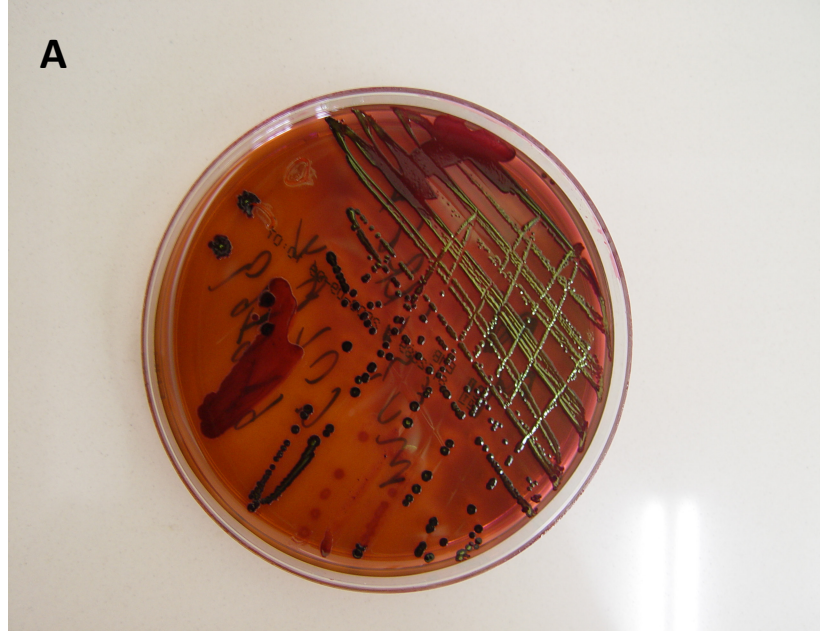
ÇLP grubundaki eritrosit değerlerinin, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yükselmiş olduğu görülmekteydi ($p=0,046$; her iki grup için). Ayrıca ÇLP grubunda kandaki Hb, Htc, MCHC ve MPV değerlerinde artış, MCV ve MCH değerlerinde ise azalış görülse de kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bunlara ek olarak ÇLP'nin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kandaki trombosit miktarlarında anlamlı bir düşüşe sebep olduğu görüldü ($p=0.029$). Kontrol ile sham ve ÇLP ile sham grupları arasında ise trombosit miktarları açısından istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmamaktaydı ($p=0.114$ ve $p=0.200$, sırasıyla) (Tablo-4).

Kan kültürü sonuçlarına bakıldığında ÇLP grubundaki tüm hayvanlarda kan kültürleri pozitif olarak saptandı. ÇLP uygulanan hayvanların

yarısında tek başına E. Coli'nin ürediği, diğer yarısında ise E. Coli ve Klebsiella türlerinin birlikte ürediği görüldü (Şekil-34). Kontrol ve sham gruplarında ise kan kültürlerinde herhangi bir üreme görülmedi

Tablo 4: Kontrol, sham ve ÇLP gruplarına ait kan laktat ve hemogram değerleri (ortalama±SEM). (†, Kontrol grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$; ‡, Sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$)

	Kontrol	Sham	ÇLP
Laktat (mmol/L)	4,20 ± 0,50	4,97 ± 0,30	7,32 ± 0,6 ^{†,‡}
Lökosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	5,18 ± 1,15	6,10 ± 2,31	4,87 ± 2,04
Nötrofil ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	2,80 ± 0,45	4,59 ± 1,72	3,22 ± 1,69
Lenfosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	1,84 ± 0,48	1,02 ± 0,50	0,88 ± 0,16
Bazofil ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	0,22 ± 0,10	0,29 ± 0,11	0,14 ± 0,08
Monosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	0,06 ± 0,04	0,30 ± 0,15	0,60 ± 0,31 [†]
Eozinofil ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Eritrosit ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	7,81 ± 0,25	7,72 ± 0,16	9,04 ± 0,23 ^{†,‡}
Hemoglobin (g/dl)	13,80 ± 0,48	14,03 ± 1,20	15,50 ± 1,02
Hematokrit (%)	40,90 ± 0,98	40,03 ± 1,60	45,72 ± 1,15
MCH (pg)	17,53 ± 0,48	17,58 ± 0,41	17,15 ± 0,58
MCHC (g/dl)	33,35 ± 0,31	33,78 ± 0,21	33,90 ± 0,68
MCV (fL)	52,40 ± 0,83	51,83 ± 1,01	50,55 ± 0,83
MPV (fl)	2,61 ± 0,10	2,83 ± 0,24	3,09 ± 0,05
Trombosit ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	1006 ± 55,90	900 ± 41,10	530,75 ± 111,10 [†]



Şekil 34: EMB agar'da *E. coli* (A) ve *Klebsiella* türlerinin (B) ürediğini gösteren besiyeri plakları.

ÇLP'nin Beyin Elektriksel Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi

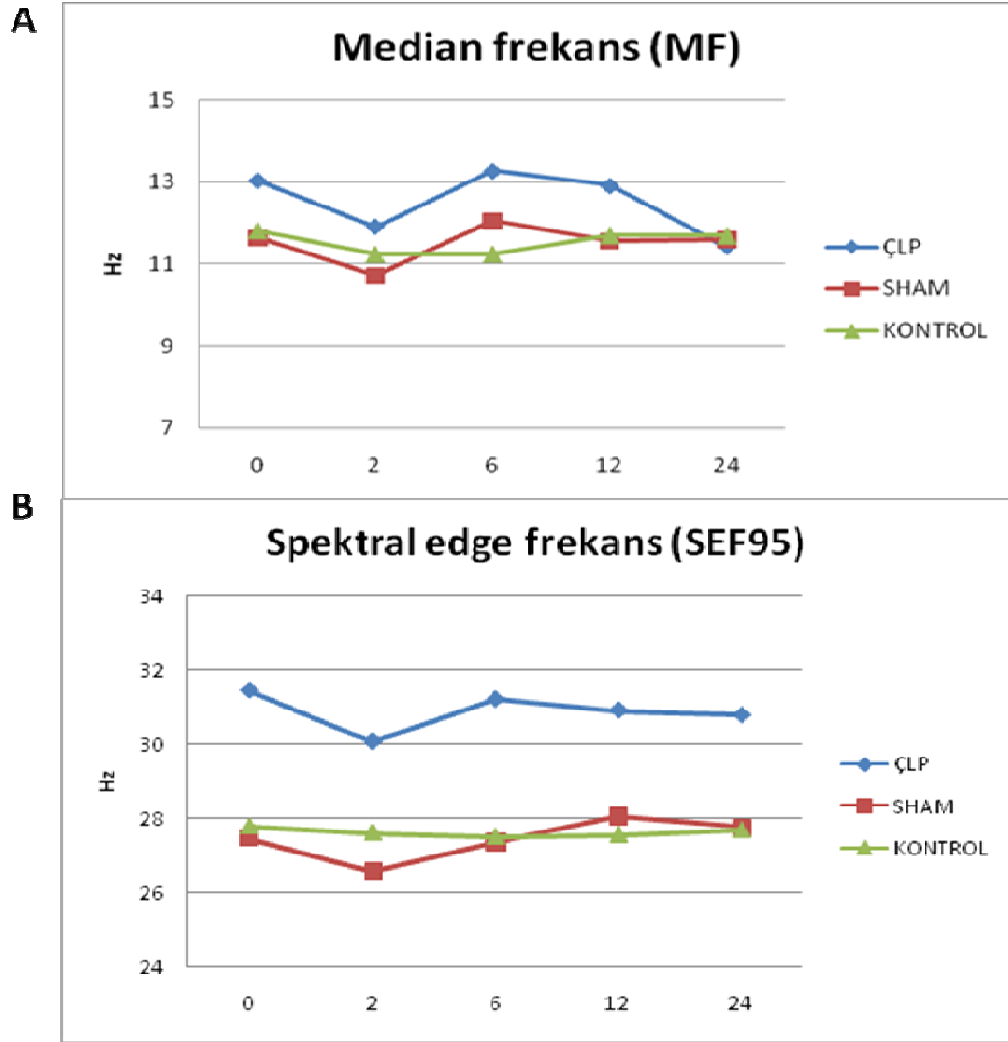
i. Elektrokortikografi (ECoG) Bulguları

Beyin elektiriksel aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile elektrokortigografi (ECOG) kayıtları değerlendirildiğinde (Tablo-5, Şekil-35); MF (medyan frekans)'nin, ÇLP ve sham grubunda ilk iki saatte düşme eğilimine girdiği görüldü. ÇLP grubunda 6. saatte ortaya çıkan artışın ardından deney boyunca düşme eğilimini devam ettiren MF'nin, 24. saatte başlangıç değerlerine göre %12,5 oranında daha düşük seviyede olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı gözlemlendi ($p>0.05$) (Şekil-35A). Sham grubunda ilk iki saatte ortaya çıkan düşme eğiliminin ardından ilerleyen deney süreci içinde MF değerlerinde artış meydana gelmekte ve 24. saatte başlangıç değerleri seviyesine yükselmekteydi. Kontrol grubunda ise medyan frekansın seyri açısından belirgin bir farklılık görülmedi.

SEF 95 (spektral edge frekansı 95), MF'ye benzer şekilde ÇLP ve sham grubunda ilk iki saatte düşme eğilimi göstermekteydi (Tablo-5, Şekil-35B). ÇLP grubunda 6. saatte ortaya çıkan artışın ardından deney boyunca düşme eğilimini devam ettiren SEF 95'in, 24. saatte başlangıç değeriyle karşılaştırıldığında düşük seviyede olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Sham grubunda ilk iki saatte ortaya çıkan düşme eğiliminin ardından ilerleyen deney süreci içinde SEF95 değerlerinde artış meydana gelmekte ve ÇLP grubundan farklı olarak 24. saatteki değerlerin başlangıç değerleri ile aynı seviyelerde seyrettiği görülmekteydi. Kontrol grubunda ise SEF 95'in seyri açısından belirgin bir farklılık görülmedi. MF ve SEF95 için yapılan istatistiksel test analizleri üç deney grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda olduğu gibi grupların kendi içlerinde başlangıç değerlerine göre yapılan karşılaştırmalarda da anlamlı bir farklılık göstermedi.

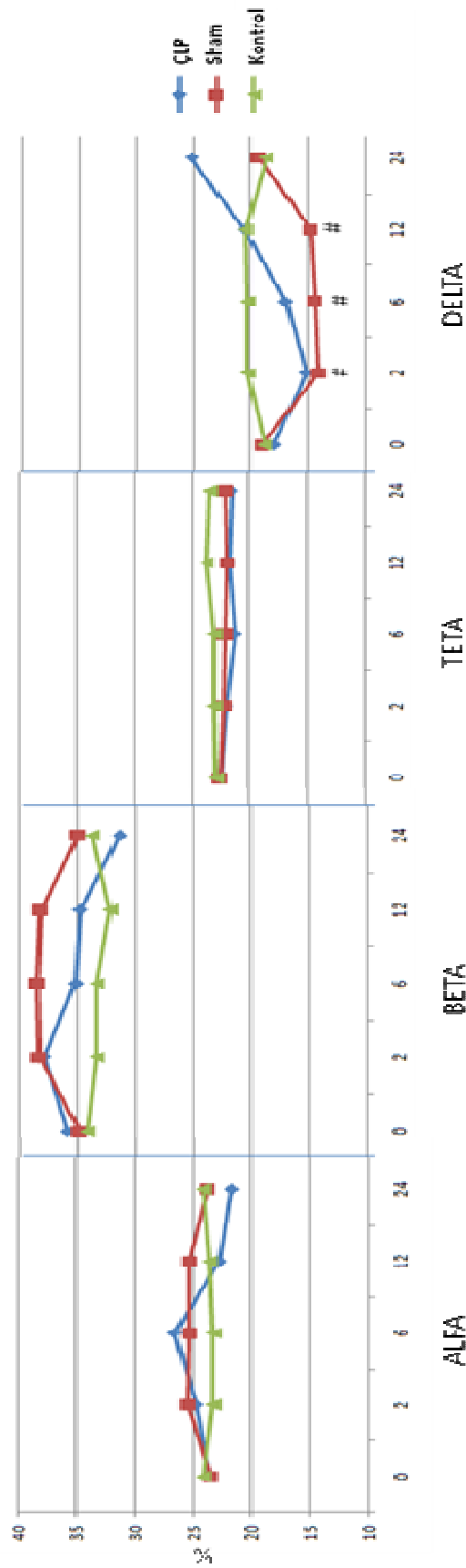
Tablo 5: ÇLP, Sham ve Kontrol gruplarına ait MF ve SEF95 değerleri (ortalama±SEM).

	MF			SEF95		
	ÇLP	SHAM	KONTROL	ÇLP	SHAM	KONTROL
0	13,04±0,22	11,64±2,24	11,81±0,25	31,44±0,70	27,48±1,03	27,80±0,30
2	11,91±1,81	10,72±2,43	11,25±0,23	30,07±0,22	26,58±1,27	27,63±0,30
6	13,27±1,97	12,05±3,03	11,25±1,03	31,20±0,80	27,36±1,22	27,51±0,80
12	12,91±1,33	11,57±2,22	11,70±1,63	30,91±0,70	28,06±1,03	27,57±0,59
24	11,42±1,93	11,60±0,30	11,69±0,91	30,78±1,20	27,76±0,95	27,70±0,42



Şekil 35: ÇLP, Sham ve Kontrol gruplarında MF ve SEF95'e ait 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerdeki frekans değerleri.

ECoG kayıtlarındaki daha önceden belirlenmiş frekans bandlarının (alfa 8-13, beta 13-30, teta 4-8 ve delta 0,5-3 Hz) spektral güç analizlerine bakıldığında; alfa ve beta aktivitesinin, ÇLP ve sham gruplarında ilk iki saatte artma eğilimine girdiği ve ÇLP grubunda 6. saatte de artış trendini devam ettirdiği görüldü (Şekil-36). ÇLP grubunda alfa ve beta aktiviteleri, ilerleyen deney süreci içinde düşme eğilimine girmekte ve 24. saatte başlangıç değerlerine göre sırasıyla %4 ve %8 daha düşük seviyelerde seyretmekteydi. Sham grubundaki ilk iki saatte ortaya çıkan artma eğiliminin ardından 2 ila 12. saatler arasında alfa ve beta aktivitelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemekte iken 12 ila 24. saatler arasında ortaya çıkan düşüşe bağlı olarak 24. saatteki değerlerin başlangıç değerleriyle aynı seviyelerde seyrettiği görüldü. Teta dalga aktivitesi için gerek sham gerekse ÇLP grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil-36). Delta aktivitesine bakıldığında ise hem ÇLP hemde sham grubunda ilk iki saatte düşüş gözlemlendi. ÇLP grubunda bu düşüşü takiben deney süresi boyunca ortaya çıkan artışın 24. saatte başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında %22 oranında daha yüksek seviyeye ulaştığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı belirlendi ($p>0.05$) (Şekil-36). Sham grubunda delta aktivitesinin, 12. saate kadar düşük seviyelerde seyrettiği ancak 12 ila 24 saatler arasında ortaya çıkan artışa bağlı olarak 24. saatte başlangıç değerlerine ulaştığı gözlemlendi. Kontrol grubunda ise alfa, beta, teta ve delta bandlarında spektral güç analizleri açısından belirgin bir farklılık göze çarpmadı (Şekil-36). Spektral güç analizi için Kruskal Wallis testi, üç deney grubu arasında herhangi bir farklılık göstermedi. One-Way Repeated Measures ANOVA testi ile deney gruplarında başlangıç değerlerine göre anlamlı değişimler olup olmadığına bakıldığında sham grubundaki delta aktivitesinde 2, 6 ve 12. saatlerde anlamlı farklılık görüldü ($p<0.05$) (Şekil-36).

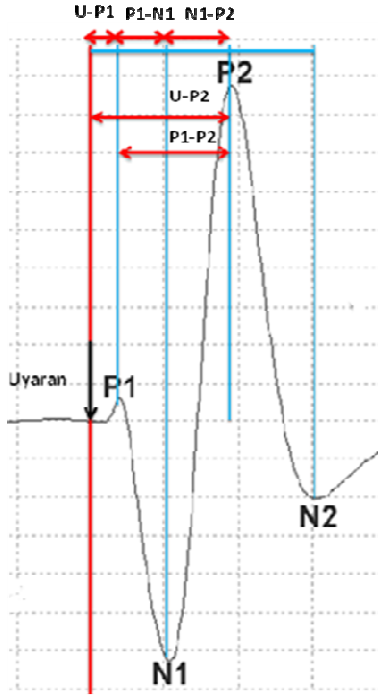


Şekil 36: ÇLP, sham ve kontrol gruplarında spektral güç analizinin 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerdeki frekans band değerleri. (#, sham grubunda başlangıç değerlerine göre anlamlılık; $p < 0.05$)

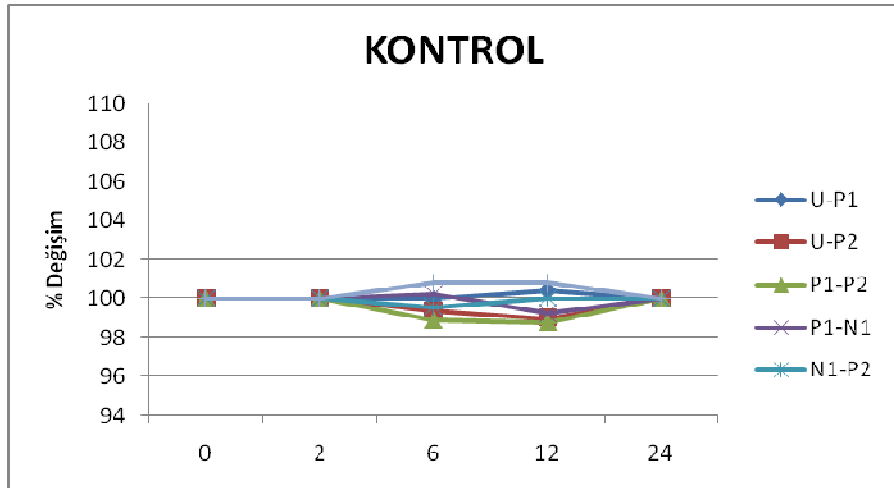
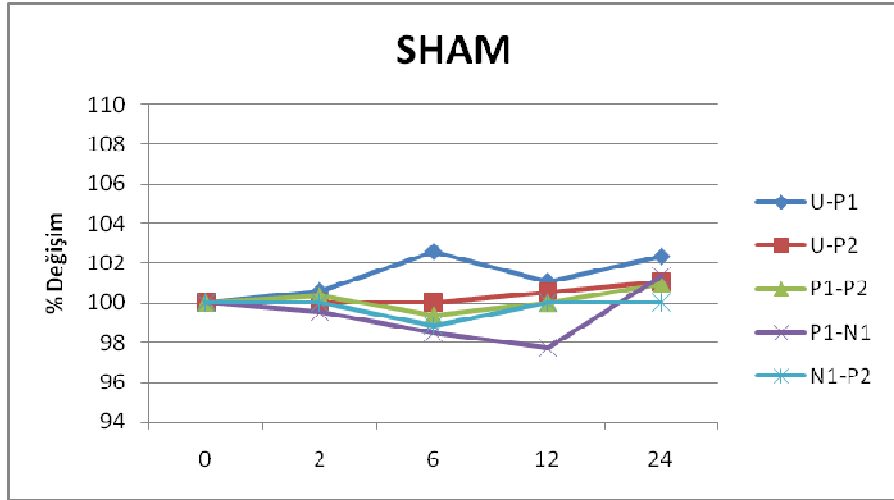
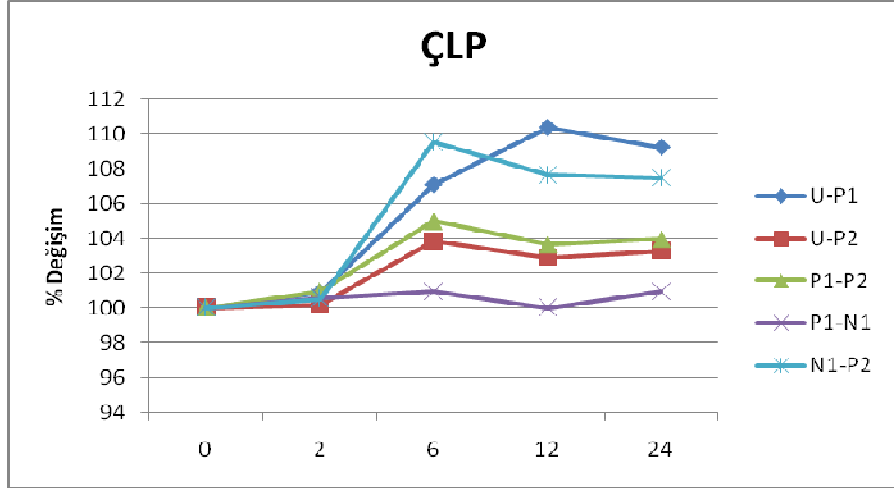
ii. Somatosensoriyal Uyarılmış Potansiyel (SEP) Bulguları

SEP sonuçları değerlendirildiğinde; ÇLP grubunda, uyarının başlangıcı ile pozitif dalga pikleri arasındaki mesafeleri yansıtan U-P1 ve U-P2 mesafelerine bakıldığında U-P1'in ilk iki saatte belirgin bir değişiklik göstermez iken ikinci saatten sonra uzama eğilimi içine girdiği ve 12. saatten itibaren başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde yüksek seyrettiği görüldü ($p < 0.05$) (Tablo-6, Şekil-37). U-P2 mesafesine ait değerlerin ise ilk iki saatte belirgin bir değişiklik göstermezken 6. saatten itibaren hafif derecede yükselmiş olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmediği görüldü ($p > 0.05$). Pozitif dalga pikleri arasındaki mesafeyi yansıtan P1-P2'nin U-P2'ye benzer şekilde ilk iki saatte belirgin bir değişiklik göstermediği, 6. saatten itibaren hafif derecede yüksek seyrettiği fakat bu değerlerin başlangıç seviyesine göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği gözlemlendi ($p > 0.05$). Pozitif ve negatif dalga pikleri arasında yer alan P1-N1 ve N1-P2 mesafelerine bakıldığında ise P1-N1'e ait mesafelerin deney süresince belirgin bir değişiklik göstermezken N1-P2'nin 6. saatten itibaren başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde yüksek seyrettiği görüldü ($p < 0.05$) (Tablo-6, Şekil-37). Sham ve kontrol grubunda ise SEP ölçümünden elde edilen değerler arasında çok küçük farklılıklar bulunmakla birlikte değerlerin genel seyri açısından belirgin bir değişiklik göze çarpmadı (Tablo-6 ve Şekil 37).

Tablo 6: ÇLP, sham ve kontrol gruplarında SEP kayıtlarından elde edilen uzama (latency) değerlerine ait yüzde değerleri. (*, ÇLP grubunda başlangıç değerlerine göre anlamlılık; $p < 0.05$).



ÇLP	U-P1	U-P2	P1-P2	P1-N1	N1-P2
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
2	100,90	100,18	100,94	100,93	100,52
6	107,8	103,86	104,98	100,58	109,54*
12	110,37*	102,90	103,64	100,02	107,64*
24	109,24*	103,30	103,96	100,91	107,49*
SHAM	U-P1	U-P2	P1-P2	P1-N1	N1-P2
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
2	100,59	99,98	100,35	99,56	100,00
6	102,59	99,98	99,35	98,51	98,83
12	101,07	100,51	99,98	97,74	100,00
24	102,34	101,06	100,95	101,34	100,00
KONTROL	U-P1	U-P2	P1-P2	P1-N1	N1-P2
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
2	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
6	100,00	99,37	98,88	100,25	99,56
12	100,44	98,99	98,76	99,25	100,02
24	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00



Şekil 37: SEP dalgalarına ait uzama (latency) mesafelerinin ÇLP, sham ve kontrol gruplarındaki yüzde değişim grafiği. (*, ÇLP grubunda başlangıç değerlerine göre anlamlılık; $p < 0.05$)

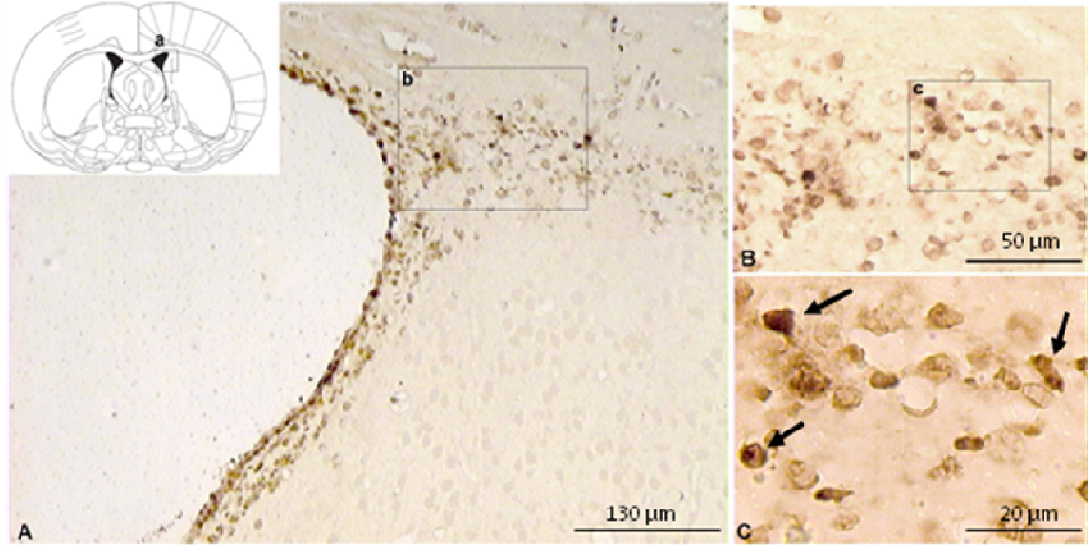
SEP kayıtlarından elde edilen dalgaların amplitüd değerlerine bakıldığında ise ÇLP grubunda P1, P2 ve N1 dalgalarının amplitüplerinde, operasyon sonrası 24. saatteki değerlerin başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında daha düşük düzeylerde olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo-7). Sham grubunda, ÇLP grubundan farklı olarak 24. saatteki P1, P2 ve N1 dalgalarının amplitüd değerlerinin başlangıç değerleriyle aynı seviyelerde olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise SEP ölçümünden elde edilen P1, P2 ve N1 dalgalarına ait amplitüd değerlerinin seyri açısından belirgin bir farklılık göze çarpmadı (Tablo-7). P1 dalgasına ait amplitüd değerleri için Kruskal Wallis test analizi, üç deney grubu arasında 12 ve 24. saatlerde anlamlıydı (sırasıyla $p= 0.007$ ve $p= 0.012$). Mann Whitney-U testi ile grupların *post hoc* değerlendirilmesi sonucunda hem 12. saatte hemde 24. saatte ÇLP ile kontrol grupları arasında (sırasıyla $p= 0.004$ ve $p= 0.006$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü. P2 ve N1 dalgalarına ait amplitüd değerleri açısından ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo-7).

Tablo 7: ÇLP, sham ve kontrol gruplarında SEP dalgalarına ait amplitüd değerleri (ortalama \pm SEM). (*†*, ÇLP grubunda kontrol grubuna göre anlamlılık; $p<0.05$)

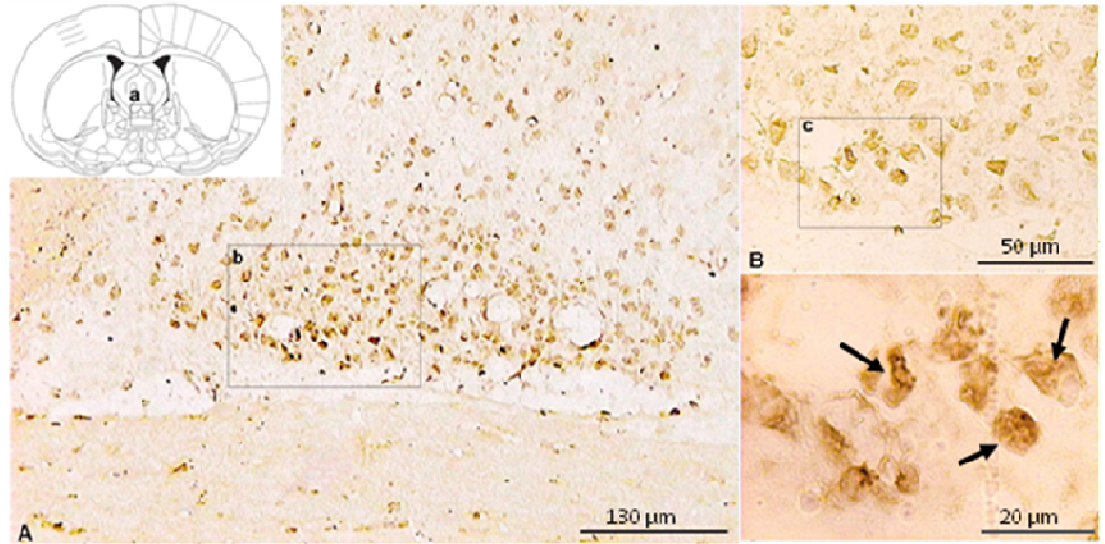
	ZAMAN	ÇLP	Sham	Kontrol
P1	0	20,46 \pm 1,34	22,05 \pm 1,55	21,14 \pm 0,09
	2	19,80 \pm 3,21	24,82 \pm 0,66	21,00 \pm 0,24
	6	20,42 \pm 1,06	24,37 \pm 2,00	21,03 \pm 0,23
	12	17,46 \pm 0,42 [†]	23,60 \pm 1,32	21,03 \pm 0,13
	24	17,34 \pm 1,56 [†]	23,35 \pm 2,30	21,05 \pm 0,17
P2	0	99,71 \pm 31,97	98,88 \pm 43,51	97,96 \pm 15,66
	2	99,14 \pm 15,47	94,76 \pm 32,18	97,47 \pm 16,17
	6	96,44 \pm 27,48	94,79 \pm 36,91	98,50 \pm 16,00
	12	91,79 \pm 30,54	97,69 \pm 35,29	96,47 \pm 15,37
	24	93,48 \pm 37,10	97,19 \pm 40,08	96,86 \pm 15,16
N1	0	86,87 \pm 22,05	75,23 \pm 24,54	76,99 \pm 10,35
	2	87,86 \pm 16,10	79,50 \pm 10,87	76,81 \pm 19,53
	6	89,38 \pm 18,04	76,85 \pm 14,47	74,46 \pm 10,06
	12	80,90 \pm 22,04	75,72 \pm 20,20	76,36 \pm 13,49
	24	83,53 \pm 24,78	75,32 \pm 27,30	74,89 \pm 11,08

ÇLP'nin Beynin Değişik Bölgelerindeki Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Olan Etkisi

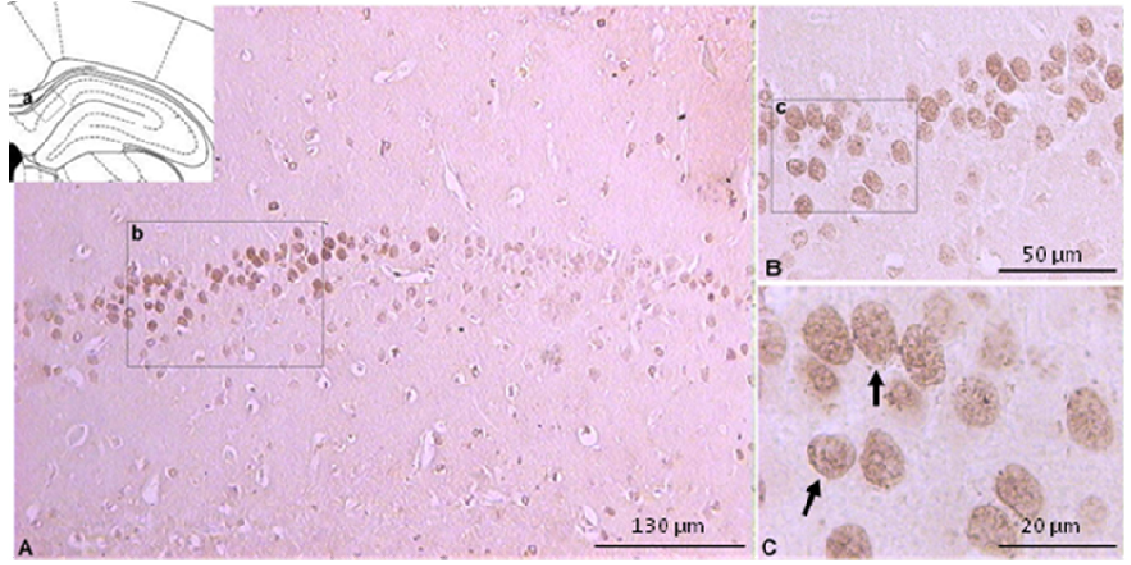
TUNEL yöntemiyle işaretlenen beyin bölgelerinin morfolojik incelemesi sonucu ÇLP grubunda özellikle SVZ (Şekil-38), MnPO (Şekil-39), CA1 (Şekil-40), CA3 (Şekil-41), CA3/4 (Şekil-42) ve DG (Şekil-43) bölgelerinde, TUNEL pozitif hücre nükleusların sıklıkla bulunduğu gözlemlendi.



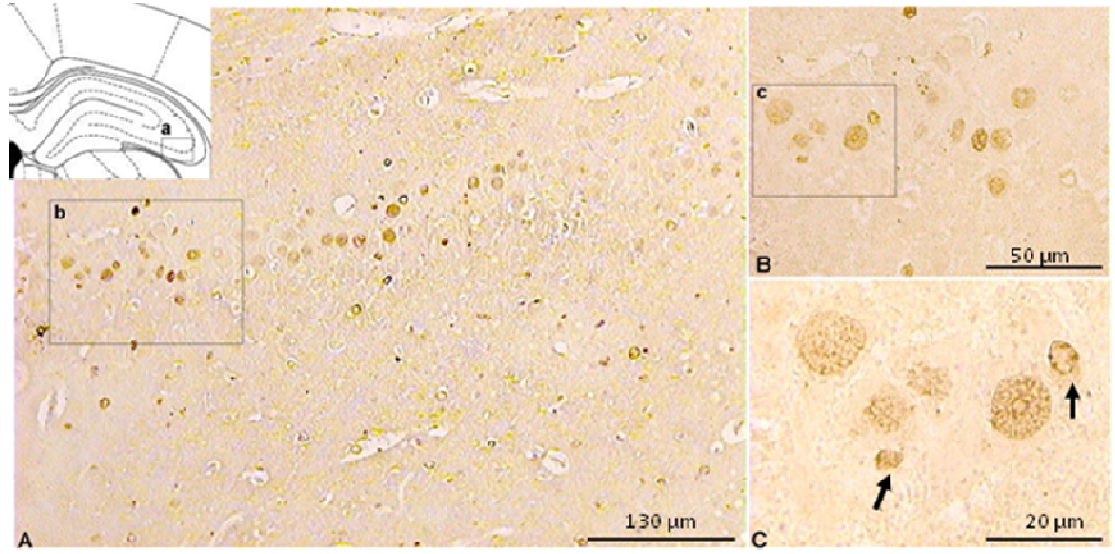
Şekil 38: ÇLP grubundaki bir hayvana ait TUNEL yöntemiyle boyanmış SVZ kesiti. Okların ucu TUNEL pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.



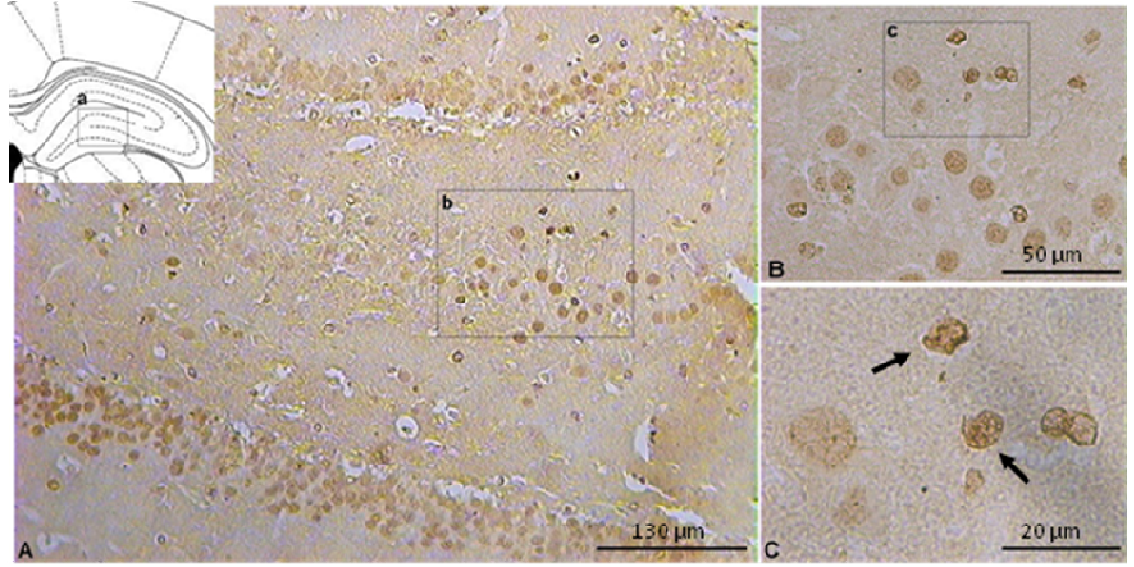
Şekil 39: ÇLP grubundaki bir hayvana ait TUNEL yöntemiyle boyanmış MnPO kesiti. Okların ucu TUNEL pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.



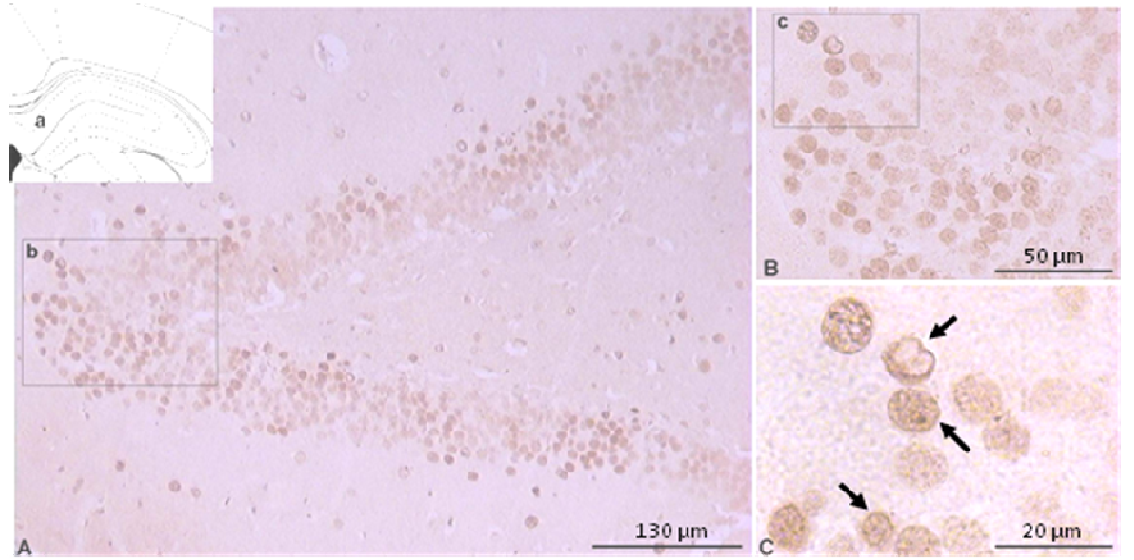
Şekil 40: ÇLP grubundaki bir hayvana ait TUNEL yöntemiyle boyanmış CA1 kesiti. Okların ucu TUNEL pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.



Şekil 41: ÇLP grubundaki bir hayvana ait TUNEL yöntemiyle boyanmış CA3 kesiti. Okların ucu TUNEL pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.



Şekil 42: ÇLP grubundaki bir hayvana ait TUNEL yöntemiyle boyanmış CA3/4 kesiti. Okların ucu TUNEL pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.

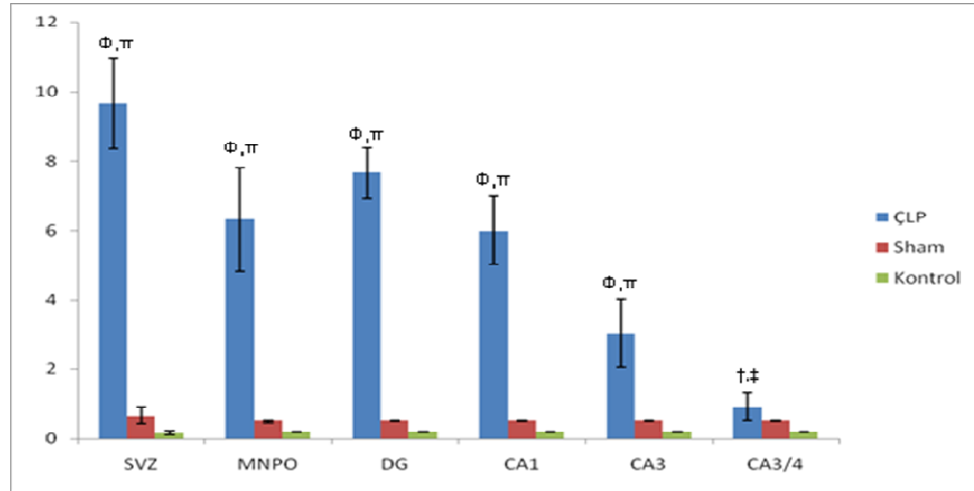


Şekil 43: ÇLP grubundaki bir hayvana ait TUNEL yöntemiyle boyanmış DG kesiti. Okların ucu TUNEL pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.

İmmünohistokimya sonuçları morfometrik olarak değerlendirildiğinde; incelenen beyin bölümleri içerisinde SVZ, MnPO, DG, CA1, CA3 ve CA3/4 bölgelerinde gerek kontrol gerekse sham grubuna kıyasla ÇLP grubunda anlamlı düzeyde yüksek oranda TUNEL pozitif hücre saptandı (Tablo-8, Şekil-44). Sham grubunda MnPO, SVZ, DG, CA1 ve CA3 alanlarındaki TUNEL yöntemiyle belirlenen apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna oranla daha sık görülmekle birlikte, iki grup arasında istatistiki bir fark ise saptanmadı (Tablo-8, Şekil-44).

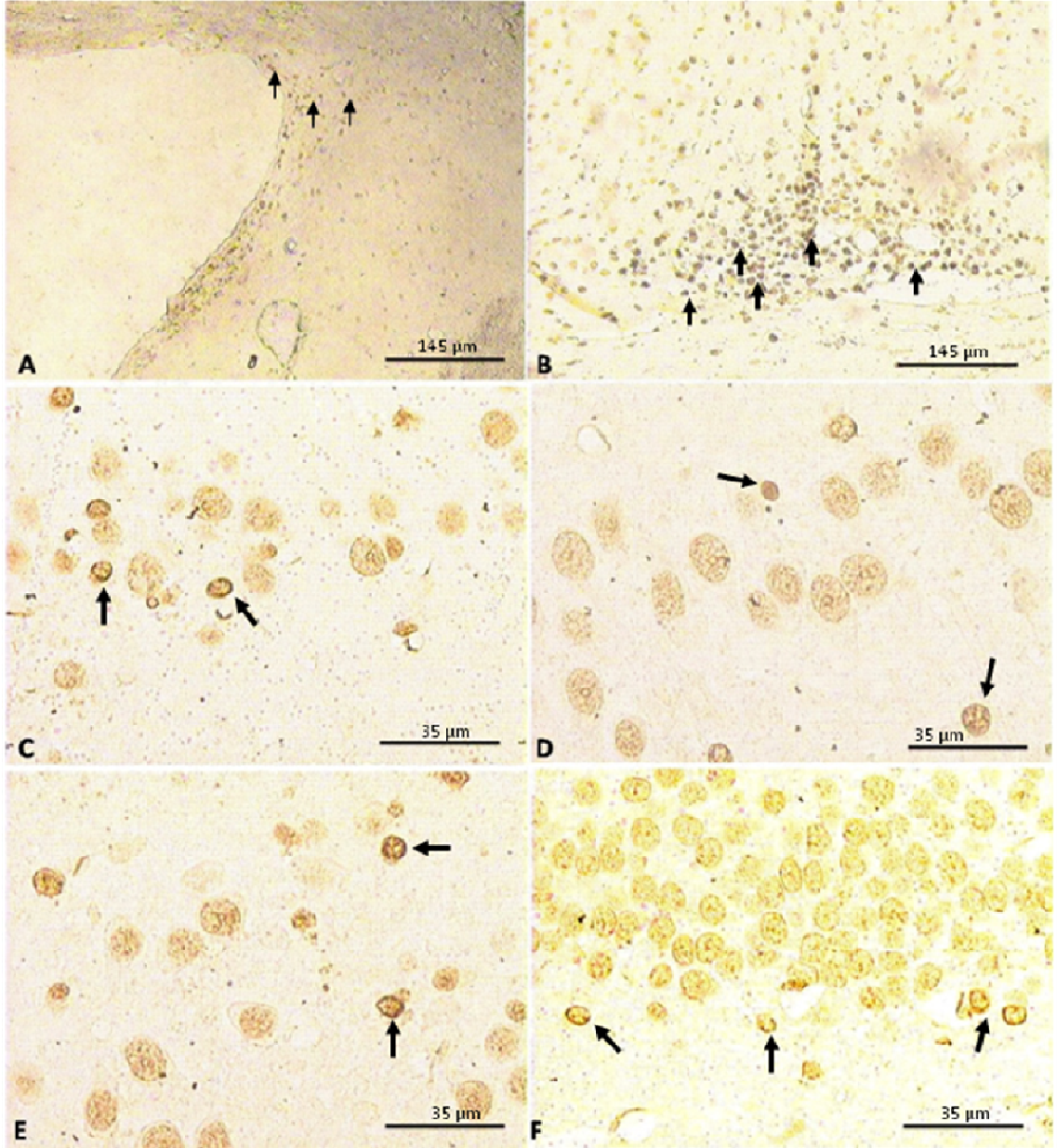
Tablo 8: ÇLP, sham ve kontrol gruplarında TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan mm²'deki hücre sayıları (ortalama±SEM). (Φ , kontrol grubuna göre anlamlılık, $p<0.01$; †, kontrol grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$; π , sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.01$; ‡, sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$).

	SVB	MNPO	DG	CA1	CA3	CA3/4
ÇLP	9,70±1,30 ^{Φ,π}	6,31±1,49 ^{Φ,π}	7,65±0,72 ^{Φ,π}	6,00±0,99 ^{Φ,π}	3,03±0,99 ^{Φ,π}	0,92±0,40 ^{†,‡}
Sham	0,63±0,28	0,50±0,02	0,50±0,02	0,50±0,02	0,50±0,02	0,50±0,02
Kontrol	0,17±0,06	0,20±0,02	0,20±0,02	0,20±0,02	0,20±0,02	0,20±0,02

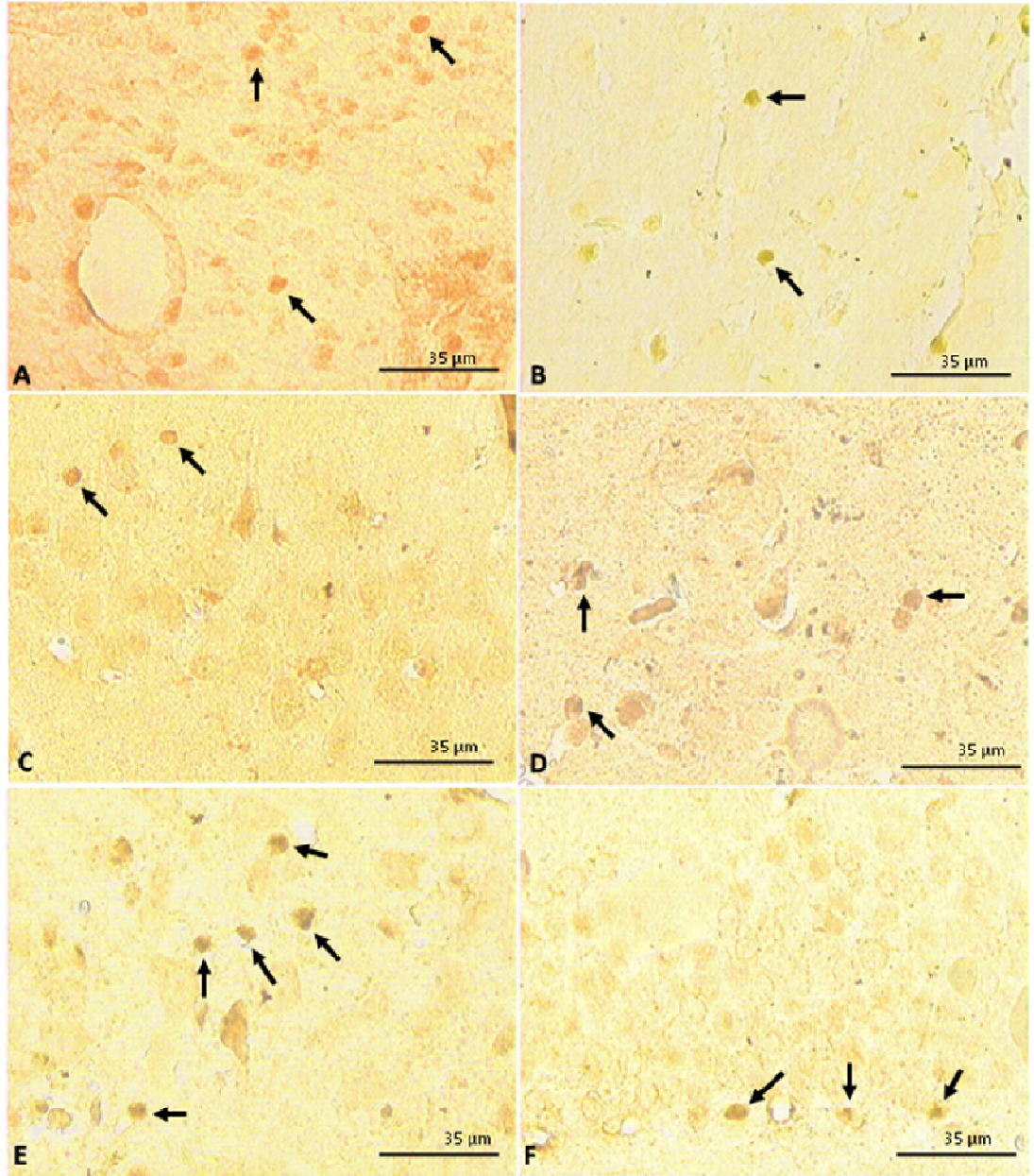


Şekil 44: ÇLP, sham ve kontrol gruplarında TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan mm²'deki hücre sayısı grafiği. (Φ , kontrol grubuna göre anlamlılık, $p<0.01$; †, kontrol grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$; π , sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.01$; ‡, sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$).

Kaspaz immünohistokimya boyaması ve transglutaminaz yöntemiyle boyanan alternatif kesitlerin incelenmesi sonucu ÇLP grubunda, TUNEL boyamasını destekler bir şekilde MnPO, SVZ, DG, CA1 ve CA3 alanlarında kaspaz ve transglutaminaz yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücrelerin sıklıkla bulunduğu görüldü (Şekil-45, 46).



Şekil 45: ÇLP grubunda kaspaz-3 immünohistokimya yöntemiyle boyanmış histolojik kesitler. Okların ucu kaspaz-3 pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.



Şekil 46: ÇLP grubunda transglutaminaz immünohistokimya yöntemiyle boyanmış histolojik kesitler. Okların ucu transglutaminaz pozitif boyanmış bazı hücreleri işaret etmektedir.

TARTIŞMA

ÇLP modeli, sepsisle ilişkili çalışmalarda oldukça sık kullanılan ve sepsis araştırmaları için “altın standart” olarak kabul edilen bir model olarak göze çarpmaktadır (212). Yoğun bakım ünitelerindeki hasta çeşitliliği ve geniş çaplı klinik çalışmaların maliyetinin yüksek olması gibi olumsuz faktörler nedeniyle sepsis patofizyolojisinin açıklanmasında ve yeni tedavi rejimlerinin ortaya konmasında septik hayvan çalışmaları tercih edilmektedir. Fakat ÇLP dışındaki diğer deneysel sepsis modeli çalışmaları dikkate alınarak ortaya konan tedavi yöntemlerinin sepsisli hastalara uygulandığında başarılı sonuçlar vermemesi hatta mortalite oranlarını artırıyor olması, septik hayvan çalışmalarının güvenilirliğini azaltmakta ve insanlardaki klinik sepsisi ne derece yansıtılabileceği konusunu gündeme getirmektedir (184, 185, 187, 201, 202). Birçok araştırmacıya göre ÇLP modeli, hem laboratuvar bulguları açısından hem de ortaya çıkan klinik sepsis tablosu açısından insanlarda gelişen sepsisi iyi bir şekilde taklit edebilmektedir (170, 175, 212, 214, 215, 430, 436). Bizim çalışmamızda da operasyon sonrası 24. saatte ÇLP grubundaki hayvanların tümünde sepsisle ilişkili klinik bulguların gözlenmiş olmasına karşın kontrol ya da sham grubundaki hayvanların hiçbirinde bu tür klinik bulgulara rastlanmamış olması ÇLP yönteminin güvenilir bir model olduğunu ve sepsisli hastalarda ortaya çıkan klinik sepsis tablosunu iyi bir şekilde yansıttığı düşüncesini destekler niteliktedir. Ayrıca sepsise ilişkin klinik bulguların hiçbirinin sham ya da kontrol grubunda gözlenmemiş olması; ileriye yönelik olarak planlanacak çalışmalar açısından sham grubuna ek olarak kontrol grubunun kullanılmasına veya her iki grubun birlikte kullanılmasına gerek olmadığını düşündürmektedir. Bu sayede ÇLP modelinin kullanıldığı deney sepsis çalışmalarında, kullanılacak hayvan sayısı azaltılabilecektir.

Kan Kültürü Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmadan elde edilen kan kültürü sonuçları ÇLP grubundaki tüm kültürlerde üremenin meydana geldiğini göstermektedir. ÇLP sonrası 24.

saatte toraks açımını takiben kardiyak fonksiyon ile alınan kan örneklerinin yarısında tek başına E. Coli'nin, diğer yarısında ise E. Coli ve Klebsiella türlerinin birlikte ürediği saptanmıştır. Sepsis, kanıtlanmış bir enfeksiyöz olay sonucu gelişen SIRS olarak kabul edilmektedir (4). SIRS kriterlerini karşılayan kişilerde sepsis tanısının konabilmesi için kan, periton veya idrar gibi kültür örneklerinde üremenin gösterilmesi ya da gelişmiş görüntüleme yöntemleriyle enfeksiyöz odağın saptanması klinik açıdan oldukça önem taşımaktadır (42). Bizim çalışmamızda ÇLP grubundaki hayvanların tümünde kan kültürü örneklerinde üreme saptanmış iken kontrol ya da sham gruplarındaki hayvanların hiçbirisinde üremenin gösterilememiş olması, ÇLP grubundaki hayvanlarda enfeksiyöz bir tablonun geliştiğini destekler niteliktedir. Brooks ve ark.'larının (430) yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde ÇLP grubundaki hayvanların hepsinde enterik bakterilerin ürediği, kan kültürlerinden izole edilen bakteriler arasında E. Coli, Proteus türleri ve Bacteroides türlerinin ilk üç sırada yer aldığı görülmektedir. Ayrıca ÇLP uygulanan sekiz hayvandan beşinde, birden fazla bakteri türünün birlikte ürediği gösterilmiştir ki bu oran bizdeki ile benzerlik göstermektedir (430). Bizim çalışmamızdaki kültürlerde ise bu sonuçlardan farklı olarak herhangi bir anaerob bakteri türüne rastlanmamıştır. ÇLP modeli kullanılarak yapılan diğer birçok çalışmada da kan kültürlerinde birden fazla bakteri türünün üremesine (mikst üreme) ilişkin olarak bizim çalışmamızdakine benzer oranlar bildirilmektedir (95, 213, 437). Junior ve ark.'larının (438) yaptıkları çalışmada, operasyon sonrası dokuzuncu saatte pozitif kan kültürlerinin oranı ÇLP grubunda %80 iken kontrol grubunda ise %0 olarak saptanmış fakat hangi etkenlerin ürediği hakkında bir bilgi verilmemiştir. Messaris ve ark.'larının (439) yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamızdakine benzer şekilde kan kültürleri açısından ÇLP grubundaki hayvanların tümünde kan kültürlerinin pozitif geldiği görülmekte iken sham grubundaki hayvanların hiçbirisinde pozitiflik saptanmamıştır. Bu çalışmadaki kan kültürlerinde içlerinde Escherichia coli, Proteus mirabilis, Enterobacter faecium, Enterobacter cloacae ve anaeroblar olmak üzere birçok patojenin ürediği gösterilmiştir. Ghiselli ve ark.'larının (440) yaptıkları bir çalışmada

operasyon sonrası 72. saatte ÇLP grubundaki hayvanların hepsinde kan kültürlerinin pozitiflik gösterdiği ve izole edilen bakteriler arasında E. Coli, Klebsiella türleri ve Enterobakter türlerinin yanısıra gram pozitif koklar arasında yer alan enterokokların da sıklıkla saptanmış olduğu görülmektedir. Abdominal enfeksiyon sonucu sepsis gelişen hastalar ile yapılmış bir çalışmada bu hastaların yaklaşık olarak %95'inde kan kültürlerinde pozitiflik saptanmıştır. Bu oran ÇLP modeli kullanarak yapılmış olduğumuz bu çalışmadaki kan kültürlerinde saptanmış olduğumuz %100 üreme oranıyla paralellik göstermektedir (441). Bizim çalışmamızda ÇLP grubundaki hayvanların hepsinde enterik kökenli bir bakteriyeminin ortaya çıkması fakat sham ve kontrol gruplarındaki hayvanların hiçbirisinde böyle bir sonuca rastlanmamış olması ÇLP modelinin, deneysel bir sepsis modelinde bulunması gereken sepsis tanı kriterlerinden birisini yerine getirdiğini göstermektedir (442). İntra-abdominal kaynaklı sepsisteki kan kültürü sonuçları her zaman bakteri florasına ait mikrobiyolojiyi yansıtmaktadır (443). İntraabdominal kaynaklı sepsis, bakteri florasından kaynaklanan birçok aerop ve anaerob bakteri türünü içermekte ve otopsi ya da laparotomi sırasında bifazik patolojik özellik gösterdiği, başlangıçta akut peritonit gelişmekte iken daha sonrasında bu tabloyu intraabdominal abse oluşumunun takip ettiği bildirilmektedir (443). Fakültatif aerop bakterilerin tabloya baskın olduğu durumda akut peritonitin indüklendiği ve ortaya çıkan bakteriyemi sonucu mortalitenin yüksek seyrettiği, anaerobların baskın olduğu durumda ise akut peritoniti takiben intra-abdominal abse oluşumuna yatkınlık geliştiği bildirilmektedir (437, 443). Bakterilerin, fibrin pıhtı içinde intraperitoneal olarak verilmesine ilişkin sepsis modelinde intra-abdominal abse oluşumuna zemin hazırlandığı ve bunun neticesinde bakterilerin direkt olarak periton içine verilmesine kıyasla mortalite oranlarında azalmanın meydana geldiği bildirilmektedir (175). Bizim çalışmamızda ÇLP grubundaki hayvanlara ait kan kültürlerinin hiçbirinde anaerobların ürememiş olmaması ve Brooks ve ark.'larının (430) yapılmış olduğu çalışmada ise ÇLP grubundaki sekiz hayvanın altı tanesinde anaeroblara kıyasla fakültatif aerobların baskın olarak üremiş olması ÇLP modelinin 24. saatte intra-abdominal abse

oluşumuna yol açmaktan ziyade akut peritonit tablosuyla seyretmeye devam ettiğini düşündürmektedir. Gerçekten de hem bizim yaptığımız çalışmada hem de daha önce yapılan birçok ÇLP modeli çalışmasında, ÇLP sonrası 24. saatteki laparotomik değerlendirmede abdominal kavite içinde herhangi bir abse oluşumuna rastlanmamıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışmayla ÇLP yönteminin ilk 24 saatlik dönemde diğer bazı sesis modellerinden farklı olarak intraabdominal abse oluşumuna yol açmadığı, çekuma açılan delikten fekal içeriğin yavaş bir şekilde sızması sonucu akut peritonit tablosuyla seyrettiği ve bunun neticesinde ortaya çıkan bakteriyemi ile kan kültürlerinin hepsinde üremenin meydana geldiği anlaşılmıştır.

Laparotomi Bulgularının Değerlendirilmesi

Mevcut çalışmada, her üç gruptaki deney hayvanlarına çalışmanın 24. saatinde monitorizasyon işlemleri sonrasında anestezi altındayken laparotomi yapılarak batın boşluğu değerlendirildi. Kontrol ve sham grubundaki hayvanlarda peritoneal kavitenin temiz ve peritoneal sıvının şeffaf görünümlü olduğu gözlenir iken ÇLP grubunda ise peritoneal sıvının kötü kokulu olduğu ve çekum çevresinde yer yer püü olduğu görüldü. Bunlara ek olarak ÇLP grubunda, bağlı olan çekumun ileri derecede ödemli, iskemik ve mat görünümlü olduğu ve çevredeki ince barsak kıvrımlarıyla belirgin bir biçimde yapışıklık gösterdiği gözlemlendi. Maier ve ark.'larının (444) fareler üzerinde yaptıkları deneysel sepsis çalışmasında, operasyon sonrası 24. saatte tek ya da iki delik açılarak oluşturulan ÇLP modeli ile CASP modeli (colon ascendens'e takılan stent ile oluşturulan bir peritonit modeli) arasındaki laparotomik bulgular arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada iki delik açılarak ÇLP oluşturulan hayvanlardaki laparotomi bulguları ile bizim çalışmamızdaki ÇLP uygulanan hayvanlardaki laparotomi bulguları arasında benzerlik görülmektedir. Maier ve ark.'larının (444) yaptıkları çalışmada operasyon sonrası 24. saatte çekumda açılan deliklerden persistan bir fekal içerik sızıntısının olmadığı fakat CASP modeli uygulanan hayvanlarda çekuma yerleştirilen stentlerden belirgin bir şekilde feçes çıkışının gerçekleştiği bildirilmektedir. Hem bizim çalışmamızda hem de

Maier ve ark.'larının (444) yaptıkları çalışmada, ÇLP uygulanan hayvanlardaki bağlanmış olan çekumun kendisine komşu ince barsak kıvrımlarıyla belirgin bir biçimde yapışıklık göstermesi, çekuma yakın ince barsak kıvrımlarında belirgin bir vazodilatasyon gözlenirken çekumun uzağındaki ince barsak kıvrımlarının normal görünümde izlenmesi, püy oluşumunun çekum çevresinde yer yer lokalize bir şekilde izlenmiş olması; ÇLP modelinin jeneralize peritonit tablosu oluşturmak yerine çevre organlar tarafından sınırlandırılmış daha lokalize bir peritonit gelişimine yol açtığını düşündürmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda insanlardaki yaygın peritonit tablosunu taklit edecek bir deneysel sepsis çalışması planlandığında ÇLP modeli yerine CASP modelinin tercih edilmesi daha uygun bir yaklaşım gibi gözükmektedir. ÇLP modelinde orta hattan yapılan bir insizyon ile çekum ortaya çıkarılmakta, ileoçekal valvın distalinden istenilen oranlarda çekum bağlanmakta ve değişik kalınlıklardaki bir iğneyle çekumda delik oluşturulmaktadır (213). Bu sayede fekal içeriğin periton içine geçmesi sağlanmaktadır ki bu özelliği sayesinde ÇLP'nin insanlardaki rüptüre apadisiti veya perfore divertiküli taklit eden bir yöntem olduğu düşünülmektedir (175). Bizim yaptığımız çalışmada ÇLP grubundaki hayvanlarda laparotomik bulguların peritonit ile uyum göstermesi ve kan kültürü örneklerinde yalnızca enterik bakterilerin izole edilmiş olması ÇLP modelinin, fekal içerik kökenli bir peritonit modeli olduğu düşüncesini destekler niteliktedir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen klinik, laparotomik ve mikrobiyolojik sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda ÇLP modelinin, insanlarda gelişen klinik sepsis tablosunu iyi bir şekilde taklit ettiği ve bu sebeple de diğer noninvaziv yöntemlerden (iv yoldan canlı patojen veya LPS verilmesi gibi) daha agresif ve daha uzun süreli bir yöntem olmasına rağmen, sepsise yönelik çalışmalarda tercih edilmesi gereken sepsis modeli olma özelliğini hala koruduğu görülmektedir. ÇLP ve CASP modelinin karşılaştırılmasına yönelik gelecekte planlanacak olan yeni çalışmalar ile sepsis için hangi modelin tercih edilmesi gerektiğine ilişkin önemli veriler sağlanabilecektir.

Vital Moniterizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, deneye alınarak monitorize edilen sıçanların ÇLP grubunda, kan basıncının ilk iki saatte azalma eğilimine girdiği, bunu takip eden 2 ila 6. saatler arasında artış gösterdiği ve deney sürecinin 6 ila 24. saatleri arasında tekrar düşüş eğilimi içinde olduğu görüldü. 12. saatle birlikte anlamlı düşüş gösteren kan basıncı, 2 ila 6. saatler arasındaki artış eğilimini 6. saatten sonra bırakmış, hiperdinamik bir safhadan, basınç azalmasıyla birlikte düşüş gösteren bir eğri çizerek 24. saatte başlangıç seviyelerine göre %43'lük değerlere inmiştir. Sham grubunda da ÇLP grubundakine benzer bir şekilde kan basıncının ilk iki saatte azaldığı, 2 ila 6. saatler arasında arttığı ve 6. saatten sonra tekrar düşüş eğilimi içinde olduğu görüldü. 6. saatten itibaren ortaya çıkan düşme eğilimi, 12. saatte en düşük değerlere ulaşmakta ve başlangıç değerlerine göre %75'lik seviyelere gerilediği gözlemlendi. Sham grubunda ÇLP grubundan farklı olarak kan basıncının 12. saatten sonra düzleme eğilimine girdiği ve 24. saate gelindiğinde başlangıç değerlerine göre %80'lik seviyelere yükseldiği görüldü. Çalışmamızda monitorizasyonun 2. saatindeki kan basıncı değerlerine bakıldığında, sepsis grubundaki hayvanlarda %19 oranında, sham grubundaki hayvanlarda ise %8 oranında düşüş görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kan basıncı açısından 2. saatte meydana gelen düşüşün hem ÇLP hem de sham grubunda gözleniyor olması, bu düşüşün operasyon sırasındaki kan kaybına ve kullanılan anestezi maddenin (tiyopental sodyum) kan basıncı üzerindeki düşürücü etkisine bağlı olarak meydana geldiğini düşündürmektedir. Nitekim, literatürde tiyopental sodyumun genel anestezi dozlarında sıçanlara uygulanması sonucu kan basıncında düşüşe yol açtığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (445). ÇLP sonrası 6. saatteki kan basıncı değerleri ÇLP uygulanan her bir hayvan için ayrı ayrı incelendiğinde, hayvanlardan iki tanesinde başlangıç değerlerine göre artmış miktarlarda, dört hayvanda ise 2 ila 6. saatler arasında meydana gelen artışa rağmen anestezinin 2. saatte meydana getirdiği belirgin düşüşe bağlı olarak başlangıç değerlerinin %83'ü seviyesinde kaldığı gözlemlendi. Diğer iki hayvanda ise farklı olarak başlangıçtan itibaren deney boyunca düşüş eğilimi görüldü. Hayvanlar arasında görülen bu

farklı kan basıncı seyrine bağlı olarak ÇLP grubunda 2 ila 6. saatler arasında ortaya çıkan ve hiperdinamik safhayla açıklanabilecek olan kan basıncı artışı, 6. saatte başlangıç değerlerine göre ancak %91'lik seviyelere kadar yükselbilmekteydi. ÇLP grubunda yer alan ve kan basıncında 2 ila 6. saatler arasında belirgin düşüş gözlenen iki hayvanın hariç tutulması durumunda; ÇLP ve sham grupları arasında 6. saatteki kan basıncı değerleri açısından gözlenen farkın iki kat artış gösterdiği görülmekteydi. Buna ek olarak 6. saatte kan basıncı değerleri açısından ÇLP ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmez iken ÇLP grubundaki bu iki hayvan çalışmadan çıkarıldığında ÇLP ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlılık kazanmaktaydı ($p < 0.05$). Sonuç olarak bu bulgular, ÇLP grubundaki hayvanların %75'inde 2 ila 6. saatler arasında hiperdinamik bir fazın geliştiğini destekler nitelikteydi. 6. saatten sonra ise ÇLP grubundaki tüm hayvanlarda hipodinamik bir faz gelişmekte ve kan basıncı çalışma boyunca düşme eğilimini sürdürmekteydi. ÇLP grubunda aynı zaman dilimlerine denk gelen kalp atım hızındaki artış da kan basıncındaki düşüşe uygun korelasyon göstermekteydi. Mevcut çalışmada, kan basıncında düşüş eğilimi ile birlikte buna eşlik eden kalp atım hızında gözlenen artış septik tablonun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Sham grubunda düzleme eğilimine giren kan basıncı ve belirgin bir eğilim göstermeyen kalp atım hızı parametreleri sonuçları da bu bulguyu desteklemektedir.

Rektal ısı parametresi hem ÇLP hem de sham grubunda ilk iki saatte düşüş eğilimi göstermekte fakat sonrasında ise deney boyunca kademeli olarak artış eğilimine girmektedir. Rektal ısı açısından 2. saatte meydana gelen düşüşün hem ÇLP hem de sham grubunda gözleniyor olması nedeniyle kullanılan anestezi maddenin vücut ısısı üzerindeki düşürücü etkisine bağlı olarak meydana geldiği düşünüldü. Tiyopental sodyum gibi barbitürat grubu ilaçların genel anestezi dozlarında sıçanlara uygulandığında vücut ısısında düşüşe yol açtığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (446, 447). Bizim çalışmamızda ÇLP ve sham gruplarına uygulanan operasyonlar sırasında anestezinin indüklediği hipotermiye karşı sıçanların vücut ısısının korunmasını sağlamak amacıyla ısıtıcı bir düzeneğin kullanılmamış olması

nedeniyle 2. saatteki rektal ısı değerlerinde ÇLP grubundaki hayvanlarda %5 oranında, sham grubundaki hayvanlarda ise %8 oranında düşüş meydana geldiği ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturduğu gözlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen vital parametre bulguları, literatürde yer alan benzer çalışmalarla paralellikler göstermekteydi. Xie ve ark.'ları (448) tarafından sıçanlarda oluşturulan sepsis modelinde, operasyon sonrası 24. saatteki kan basıncı değerlerinin ÇLP grubunda sham grubuyla karşılaştırıldığında bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olarak istatistiksel olarak anlamlılık gösteren bir düşüş meydana getirdiği bildirilmiştir. Mansart ve ark.'larının (449) yaptığı çalışmada, operasyon sonrası 24. saatte kan basıncı değerleri ölçülmüş ve sham ya da kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında ÇLP grubundaki değerlerin belirgin bir biçimde düşük olduğu gösterilmiştir. ÇLP grubunda gözlenen bu düşüş sham ve kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık gösterse de bizim çalışmamızda elde ettiğimiz seviyelere kadar düşmediği görülmektedir. İki çalışma arasındaki farklılığın olası sebebi bizim çalışmamızda çekum 22G'luk iğne ile iki kez delinmekte iken Mansart ve ark.'larının (449) çalışmasında kullanılan yöntem gereği çekumun 21G'lik iğne ile yalnızca tek sefer delinmesinden kaynaklanıyor olabilir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar neticesinde ÇLP yöntemi kullanılarak oluşturulan sepsis modelinde, çekumun bağlanma yüzdesindeki artışla ya da çekuma açılan deliğin boyut ve sayısı ile kan basıncındaki düşüş arasında korelasyonun bulunduğu ve hayatta kalma oranlarının etkilendiği gösterilmiştir (450). Song ve ark.'ları (451) tarafından 9G'lik iğne ile çekumun iki kez delinmesi sonucu oluşturulan sepsis modelinde, kan basıncının bizim çalışmamızdan çok daha erken zaman dilimlerinde düşüş gösterdiği ve kalp atım hızının buna uygun şekilde ilk 12 saatte kademeli olarak artış gösterirken daha sonrasında ise giderek azalma eğilimi içine girdiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda ÇLP grubundaki en düşük kan basıncı değeri 24. saatte saptanmış, Song ve ark.'larının yaptığı çalışmada ise aynı kan basıncı değerlerine bizden 8 saat daha önce yani 16. saatte ulaşılmış ve kan basıncı 16 ila 20. saatler arasında da düşme eğilimini

devam ettirerek 20-30 mmHg seviyelerine kadar inmiştir. Song ve ark.'larının (451) çalışmasında, bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında vital parametrelerin daha erken ve belirgin seyreden kötüleşme eğilimi göstermesinin olası nedeni, hayvanlarda oluşturdukları perforasyonun bizim çalışmamızda kullandığımızdan çok daha kalın bir iğne kullanılarak gerçekleştirilmeleri olabilir. Bizim çalışmamızda vital parametrelerin 24. saatten sonra da izlenmeye devam ettirilmesi durumunda, sağ kalan hayvanlarda muhtemelen kan basıncının daha da düşük değerlere ineceği ve kalp atım hızının ilk 24 saatteki kademeli olarak gösterdiği artış eğiliminin yerini giderek azalma eğilimine bırakacağını düşünmekteyiz. Bizim çalışmamızda 12 ve 24. saatlerdeki kalp atım hızının seyri açısından sepsis ve sham grupları arasında saptadığımız farklılık, Yang ve ark.'larının (452) 18 G'luk iğne ile çekumu iki kez delerek yaptıkları çalışmada operasyon sonrası 20. saatte bildirilmektedir. Bu çalışmada ÇLP sonrası 20. saatte kalp atım hızı ve kan basıncı parametrelerine bakılmış ve sham grubu ile karşılaştırıldığında ÇLP grubunda kalp atım hızında anlamlı bir artış saptanmakta iken kan basıncında böyle bir farklılık gösterilememiştir. Bizim çalışmamızdaki kan basıncı açısından gruplar arasında ortaya çıkan farklılığa bakıldığında ise 24. saatte sham ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanırken 12. saatte böyle bir farklılık gözlenmemekteydi. Yang ve ark.'larının (452) 20. saatte ÇLP ve sham grupları arasında kan basıncının seyri açısından anlamlı farklılık saptamamalarının nedeni belkide farkın henüz 20. saatte anlamlı düzeye çıkmamasından kaynaklanmaktadır. Yang ve ark.'larının (452) çalışmayı 20. saatte sonlandırmaları ve bizim çalışmamızda bu zaman diliminde ölçüm yapılmayışı karşılaştırmaya olanak vermemektedir. Feng ve ark.'larının (453) anestezi madde olarak %2'lik sodyum pentobarbital kullandıkları, çekumun %20'sini bağladıkları ve çekumda 20G'luk iğne ile iki kez delik açtıkları sepsis modeli, bizim çalışmamızda kullandığımız sepsis modeli ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada kan basıncı ve kalp atım hızı parametreleri operasyondan sonra 6 saat süre ile saatlik olarak takip edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Bizim çalışmamızda da ilk 6

saatlik dönemde kan basıncının seyri açısından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlılık göstermemekte fakat Feng ve ark.'larından (453) farklı olarak operasyon sonrası 6. saatteki kalp atım hızı parametresinde sepsis ve sham grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğu göze çarpmaktaydı.

Bizim çalışmamızda ÇLP grubunda rektal ısı parametresinin operasyon sonrası 2. saatte belirgin bir biçimde düştüğü görülmektedir. Brooks ve ark.'ları (430), anestezinin indüklediği hipotermiyi önlemek amacıyla operasyon sırasında sıçanların ısıtılmasını sağlayan bir düzenek yardımıyla vücut ısısının korunmasını sağlamışlardır. Bizim çalışmamızda ise böyle bir yöntemin kullanılmamış olması nedeniyle muhtemelen operasyon sonrası 2. saatte anestezinin indüklediği derin bir hipotermi ile karşılaşmaktadır. Vücut ısısında 2. saatte meydana gelen bu düşüşün hem ÇLP hem de sham grubunda gözleniyor olması bu durumu destekler niteliktedir. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS), birçok ağır klinik bulguya neden olan sistemik inflamatuvar cevap olarak tanımlanmakta ve enfeksiyöz ya da enfeksiyöz olmayan (pankreatit, yanık, multipl travma gibi) nedenlere bağlı gelişebilmektedir. SIRS tanısının konulabilmesi için aralarında hipertermi ($>38\text{ C}^\circ$) veya hipotermi ($<36\text{ C}^\circ$)'ninde yer aldığı bir takım tanı kriterlerinden en az ikisinin var olması şartı aranmaktadır (4). Bizim çalışmamızda operasyon sonrası 24. saatte ÇLP grubundaki hayvanlardan üç tanesinin hipotermik kalan beş hayvanın ise normotermik olduğu görüldü. ÇLP grubundaki beş hayvanın vücut ısısında anlamlı bir değişikliğin gözlenmemiş olması bu hayvanların sepsise girmemiş olduğunu akla getirirse de, bu hayvanların rektal ısı dışındaki diğer vital parametre bulgularına ya da kandaki total beyazküre değerlerine bakıldığında SIRS tanı kriterlerinden en az iki tanesini karşıladığı ve bu sebeple de sepsis tanısı almaya hak kazandığı görülmektedir. Bu beş hayvanın rektal ısı değerlerinin normotermik olması toplamda da ÇLP grubu açısından çalışmanın 24. saatindeki rektal ısı değerlerinin normotermi göstermesiyle sonuçlanmaktadır. Brooks ve ark.'larının (430) yaptıkları çalışmada, bizdekinden farklı olarak operasyon sonrası 20. saatte ÇLP grubunda vücut ısısının belirgin bir biçimde düşük

olduğu ve bu düşüşün kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturduğu bildirilmiştir. Lang ve ark.'larının (454) yaptıkları çalışmada ise sepsisin indüklenmesinden 24 saat sonra vücut ısısı parametresine bakılmış ve Brooks ve ark.'larından (430) farklı olarak ÇLP grubunda hiperterminin geliştiği saptanmış olup vücut ısısında meydana gelen bu artışın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık oluşturduğu gösterilmiştir. Eum ve ark.'larının (455) yaptıkları çalışma, operasyon sonrası 24. saatte ÇLP grubuna ek olarak sham grubunda da vücut ısısının düştüğünü ortaya koymaktadır. Bu bulgu bizim çalışmamızın yanısıra literatürdeki diğer pek çok ÇLP modeli çalışmasıyla da uyum göstermemektedir. Daha önce yapılan ÇLP çalışmalarında operasyon sonrası 24. saatteki değerlere bakılır ise vücut ısısının sham operasyon uygulanan gruplarda bizim çalışmamızdakine benzer şekilde normal düzeylerde seyrettiği görülmektedir (430, 441, 444). Bizim çalışmamızda ve ÇLP modelinin kullanıldığı diğer birçok çalışmada (171, 215, 456, 457), ÇLP grubundaki hayvanlarda sepsisli hastalardakine benzer şekilde hiperdinamik ve hipodinamik evrelerin gözleniyor olması, vücut ısısı değerlerinin bazı hayvanlarda hipertermi bazılarında ise hipotermi şeklinde ölçülmesi ÇLP modelinin insanlardaki klinik sepsis tablosunu vital parametreler açısından da iyi bir şekilde taklit ettiğini göstermektedir.

Hemogram ve Kan Laktat Değerlerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada elde edilen önemli verilerden birisi de ÇLP grubunda, kan laktat seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık gösteren düzeylerde yükselmiş olduğunun saptanmasıdır. Kan laktat seviyelerinin sham grubunda da hafif düzeylerde yükseldiği fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür. Brooks ve ark.'larının (430), yaptıkları ÇLP modeli çalışmasında, bizim sonuçlarımızdan farklı olarak kan laktat seviyelerinin, ÇLP öncesi kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında ÇLP sonrası 20. saatte istatistiksel olarak anlamlılık göstermeyen düzeylerde yükselmiş olduğunu bildirmişlerdir. ÇLP modeli kullanılarak yapılmış olan diğer bazı çalışmalarda

ise bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, ÇLP sonrası 24. saatte herhangi bir laparotomik işlem uygulanmamış olan kontrol grubuna kıyasla ÇLP grubundaki hayvanlarda kan laktat seviyelerinin belirgin bir şekilde artmış olduğu gösterilmiştir (458-460). Bizim çalışmamızda kan laktat seviyeleri açısından sham ile ÇLP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmaz iken literatürdeki birçok çalışmada (452, 461-463) sham ile ÇLP grupları arasında ortaya konan farklılığın istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği görülmektedir. Nakagawa ve ark.'larının (461) yaptıkları çalışmada kan laktat seviyeleri sham grubuyla karşılaştırıldığında ÇLP grubunda %200 oranında artış göstermektedir. Bu çalışmaya benzer şekilde Yu ve ark.'larının (462) yaptığı çalışmada da %67 oranında artış bildirilmekte ve her iki çalışmada sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$ olmak üzere istatistiksel olarak anlamlılık gösteren bir düzeyde farklılık saptanmaktadır. Her iki çalışmada da bizim çalışmamıza benzer şekilde 22G'luk iğne ile çekumun iki kez delindiği ancak farklı olarak ileoçekal valvin hemen altından çekumun tamamına yakınının bağlandığı bildirilmektedir. Hui ve ark.'larının (458) yaptıkları bir başka çalışmada ise çekum ileoçekal valvin hemen altındaki bir seviyeden bağlanmış ve bizdekinden daha kalın (18G) bir iğneyle iki kez delinmiş olup ÇLP grubunda, sham grubuna oranla kan laktat değerlerinde belirgin bir artışın meydana geldiği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda ÇLP grubundaki laktat seviyelerinin belirgin bir şekilde yüksek seviyelerde saptanmasının olası nedenlerinden biri yöntemler arasındaki bu farklılık olabilir. Literatür verilerine bakıldığında ÇLP yöntemi ile oluşturulan sepsis modelinde, kandaki laktat düzeylerine çekumun bağlanma yüzdesi, çekuma açılan deliğin boyutu ve sayısının etkili olabildiği gösterilmiştir (430, 464, 465). Nitekim Yang ve ark.'larının (452) ya da Siddiqui ve ark.'larının (463) 18G'luk iğne kullanarak ve çekumu ileoçekal valvin hemen altındaki bir seviyeden bağlayarak ÇLP oluşturdukları çalışmalarında, bizim çalışmamızdan farklı olarak ÇLP grubunda kan laktat düzeyinde sham grubuna oranla anlamlı bir artışın ortaya çıktığı görülmektedir. Koo ve ark.'larının (466) yaptıkları çalışmada, ÇLP sonrası 5, 10 ve 20. saatlerde kan laktat değerlerinin kademeli bir şekilde artış gösterdiği, ÇLP grubunda sham grubuna kıyasla laktat

seviyelerinin 5. ve 10. saatlerde anlamlılık göstermezken 20. saatte anlamlılık kazandığı bildirilmektedir. Benzer şekilde Huang ve ark.'larının (460) yaptıkları çalışmada da ÇLP grubunda sham grubuna kıyasla kan laktat değerleri açısından saptanan farklılığın ÇLP sonrası 4. saatte anlamlılık göstermezken 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaştığı bildirilmektedir. Ayrıca aynı çalışmayla ÇLP grubunda, 24. saatteki kan laktat değerlerinin, 4. saatteki değerlere oranla anlamlı bir şekilde yüksek seyrettiği gösterilmiştir (460). Birçok araştırmacıya göre kan laktat seviyelerindeki artışın erken döneme (hiperdinamik faz) kıyasla ÇLP yönteminin geç döneminde (hipodinamik faz) ortaya çıkması, bu yöntemin temel özellikleri arasında yer almaktadır (171). Bu durumun gözlenmesinde ÇLP'nin hipodinamik evresinde ortaya çıkan hipotansiyon ve şok tablosunun, organların perfüzyonunda bozulmaya ve bunun neticesinde kan laktat seviyelerinde yükselmeye yol açtığı düşünülmektedir (171). Çekumun ileoçekal valvin hemen altındaki seviyelerden bağlandığı ve 18, 21 ya da 22G'luk bir iğneyle delindiği ÇLP modeli çalışmalarında genellikle çalışmanın 24. saatinde hipodinamik evreye denk gelen bir dönemde kan laktat seviyelerinde sham grubuna kıyasla ÇLP grubunda belirgin yükselmenin olduğu görülmektedir (452, 460-463, 466). Bizim çalışmamızda ise ÇLP grubundaki hayvanlarda çekumun $\frac{1}{4}$ gibi daha az bir oranda bağlanmış olmasından dolayı 24 saatlik zaman diliminde muhtemelen kan laktat seviyeleri açısından sham grubuna kıyasla ÇLP grubunda belirgin bir artışın ortaya çıkmadığını ve kan laktat düzeylerinin 24. saatten sonraki dönemlerde de ölçülmesi durumunda laktat seviyelerinin sham grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanabileceğini düşünmek mümkündür. Sun ve ark.'larının (467) yaptıkları çalışmada ÇLP sonrası serum laktat seviyelerinin, organlardaki hasarlanma derecesiyle paralellik gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada serum laktat seviyeleri ile kandaki LPS seviyesi arasında da paralellik olduğu bildirilse de bunun aksi yönünde sonuçlar sunan çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin Bauer ve ark.'larının (468) yaptıkları bir çalışmada LPS'ye dirençli (C3H/HeJ) ve LPS'ye duyarlı (C3HB/FeJ) farelere ÇLP modeli uygulanmış ve her iki hayvan grubunda da kendi sham gruplarına

kıyasla kan laktat seviyelerinde belirgin bir artış saptanmış, LPS'ye dirençli ve LPS'ye duyarlı hayvanlar arasında ise belirgin farklılık görülmemiştir. Bu durum kan laktat seviyelerinin artmasında LPS'nin direkt olarak etkisinin olmadığını düşündürmektedir. ÇLP ve LPS modelinin birlikte kullanıldığı bir diğer çalışmada (460), çalışmanın 4. ve 24. saatlerinde kan laktat seviyeleri ölçülmüş ve iki model arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ÇLP modeli sonrası kandaki LPS seviyelerinin düşük düzeylerde seyrettiği fakat LPS modelinde ise uygulanan miktarlardaki LPS'ye bağlı olarak kandaki LPS seviyelerinin yüksek düzeylerde seyrettiği göz önünde bulundurulduğunda LPS'nin kan laktat seviyelerinin yükselmesinde direkt olarak etkili olmadığı düşüncesi doğrulanmaktadır (212). Sepsisli hastalarda kandaki laktat seviyelerinin yükselmesinde iki farklı mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir; (1) sepsis sonucu ortaya çıkan hipotansiyona, akciğerlerdeki fonksiyon bozukluğuna (*ARDS gibi*) ve şok tablosuna bağlı olarak dokuların perfüzyonunun bozulması ve O₂ ihtiyaçlarının karşılanamaması sonucu ATP üretiminin glikoliz yoluna sapması ile laktik asit seviyelerinde yükselmeye yol açması (tip-1 laktik asidoz), (2) normalde kandaki artmış laktik asit düzeylerini düşürmeye yönelik mekanizmaların (*laktik asitin glukoza çevrilmesi, okside edilmesi veya karaciğer ve böbrek yoluyla vücuttan atılması gibi*) sepsisli hastalarda bozulmuş olması (tip-2 laktik asidoz) (469-471). İnsanlarda laktat seviyelerinin normal sınırı ortalama olarak 1,8±1,2 mmol/l olarak kabul edilmekte ve serum laktat seviyelerinin 3 mmol/l'nin üstüne çıkması durumunda sepsisli hastalarda doku hipoperfüzyonunun geliştiği düşünülmektedir (42). Ayrıca kandaki artmış laktat seviyelerinin sepsisli hastalarda mortalitenin erken bir habercisi olduğu ve yoğun bakım ünitesine yatırılan hastalarda ilk 12 saat içinde serum laktat seviyelerinin 3 mmol/l'den yüksek olmasının genellikle ölüm ile sonuçlandığı bildirilmektedir (472-474). 12 saat sonrasında ise serum laktat seviyeleri 3 mmol/l'nin altında olan sepsisli hastalarda ölüm oranları %16 iken 3 mmol/l'nin üstünde olan hastalarda ise %56 olarak saptanmıştır (474). Sonuç olarak ÇLP modelindeki kan laktat seviyelerinin, sepsisli hastalardakine benzer şekilde ilerleyen

septik süreçle birlikte kademeli olarak artış göstermesi; ÇLP'nin, sepsisi hastalardakine benzer biyokimyasal değişikliklere (*sepsiste ortaya çıkan hipotansiyon sonucu ya da DIC ve ARDS gibi komplikasyonlar sonucu organlarda O₂ kullanımının ve ATP üretiminin hücresel düzeyde bozulması ve enerji üretim yolunun glikolize sapması gibi*) yol açtığı ve metabolizmada ortaya çıkan birtakım bozukluklar açısından da klinik sepsisi iyi bir şekilde yansıttığını düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızdaki diğer kan değerlerine ilişkin parametrelere bakıldığında, ÇLP grubunda, kandaki nötrofil miktarlarında herhangi bir değişiklik görülmez iken total beyazküre sayısında (lökosit), lenfosit ve bazofil miktarlarında düşüş, monosit ve eozinofil miktarlarında ise artış tespit edildi. Bu tam kan sayımı parametreleri arasında yalnızca monosit miktarlarındaki artış, kontrol ile ÇLP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermekteydi. Junior ve ark.'larının (439) yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızdakine benzer şekilde total beyazküre sayısında düşüş tespit edilmiş ancak bizdekinden farklı olarak ÇLP grubunda görülen bu düşüşün sham grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturduğu gösterilmiştir. İki çalışma arasındaki farklılık muhtemelen Junior ve ark.'larının (439) kullandıkları sepsis modelinde çekumun ileoçekal valvin hemen altındaki seviyeden bağlanmış olması ve çekumda delik açmak için kullanılan iğnenin 18G'lik kalınlıkta olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun sonucunda Junior ve ark.'larının (439) ÇLP grubunda yer alan sıçanlarda periton içine feçes sızıışı daha fazla ve hızlı olarak gerçekleşmekte ve bu durum daha ağır bir sepsis tablosunun gelişmesine ve muhtemelen artmış sistemik inflamatuvar cevap sonucu lökositlerin tüketiminde ve periferik dokulardaki birikme eğiliminde ortaya çıkan artışa bağlı olarak kandaki lökosit miktarlarında belirgin bir düşüşe neden olmaktadır. ÇLP yöntemi ile oluşturulan sepsis modelinde, çekumun bağlanma yüzdesindeki artışla ya da çekuma açılan deliğin boyut ve sayısının artırılmasıyla kandaki proinflamatuvar sitokin seviyelerinde artışın meydana geldiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (464, 475). Buna ek olarak artmış proinflamatuvar sitokin seviyelerinin kanda yer alan lenfosit gibi beyazküre hücrelerinde

artmış apoptotik hücre ölümlerine yol açtığı bildirilmektedir (312). Bu bilgiler ışığında Junior ve ark.'larının (439) çalışmasındaki artmış proinflamatuvar sitokin düzeylerinin, kandaki lökositler üzerinde artmış oranlarda apoptoza yol açtığı ve buna bağlı olarak daha ağır bir lökopenik tabloya yol açtığı düşünülebilir. Croner ve ark.'larının (476) ileoçekal valvin hemen altındaki bir seviyeden çekumu bağladıkları ve 18G'lik iğne ile çekumu iki kez delerek oluşturdukları sepsis modelinde de lökositopeninin sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık oluşturacak seviyelerde saptanması yukarıdaki bulguları destekler niteliktedir. Molnar ve ark.'larının (477) yaptıkları bir çalışmada, operasyon sonrası 5. saatte ÇLP grubundaki hayvanlarda kandaki lenfosit miktarlarında düşüş meydana geldiği ve bu düşüşün sham grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık oluşturduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da ÇLP grubundaki hayvanlarda lenfosit yüzdelerinde düşüş meydana gelmekte fakat Molnar ve ark.'larından (477) farklı olarak bu düşüş sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Ayrıca bizim çalışmamızda ÇLP grubunda deneyin 24. saatindeki nötrofil yüzdelerinde herhangi bir farklılık gözlenmez iken Molnar ve ark.'larının (477) yaptıkları çalışmada ise nötrofil miktarlarında sham grubuna kıyasla düşüşün meydana geldiği bildirilmektedir. Daha önce gerçekleştirilen sepsis çalışmalarında, ÇLP sonrası ilk 6 saatlik dönemde nötrofillerin peritoneal kavitede veya karaciğer parankiminde birikme eğilimi içinde olduğu, karaciğerdeki kupffer hücreleri tarafından nötrofillerin fagosite edildiği ve bu sayede dolaşımdan temizlenerek nötropenik tabloda ağırlaşmanın meydana geldiği bildirilmiştir (450, 478, 479). Molnar ve ark.'larının (477) yaptığı çalışmanın ilk beş saatlik dönemi içeriyor olması nötropeninin muhtemelen yukarıda yer alan mekanizmaya bağlı olarak geliştiğini düşündürmektedir. Oysa nötrofil değerlerinin 24. saatte değerlendirildiği bizim çalışmamızda, bu süre içerisinde kemik iliğinde kompanse beyazküre yapımındaki artış ile kandaki nötrofil kaybını bir miktar kompanse edilmesi ve kan nötrofil miktarlarında herhangi bir anlamlı değişiklik meydana gelmemesi söz konusu olabilir. Sepsis modeli oluşturmak için ÇLP'nin kullanıldığı çalışmalarda,

septik olayların başlangıcında pro-inflamatur mediyatörlerin salınımında artışın meydana geldiği ancak sepsis yerleştikçe anti-inflamatur sitokinlerin salınımındaki artışa bağlı olarak immünsüpresif bir safhanın ortaya çıktığı bildirilmektedir (480). Daha önceki yapılan çalışmalarda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi pro-inflamatur sitokinlerin lenfositleri apoptoza sürüklediği, bunun tersi olarak IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi anti-inflamatur sitokinlerin ise lenfositleri apoptozdan koruyucu yönde etkilerinin olduğu gösterilmiştir (481, 482). Bizim çalışmamızda sepsisin hipodinamik fazına uyacak şekilde ileri bir dönemde lenfosit miktarlarına bakıldığından ortaya çıkan lenfopeni tablosunun Molnar ve ark.'larının (477) çalışmasındaki kadar ağır seyretmemesinin muhtemel nedeni bu zaman dilimi içinde kandaki anti-inflamatur sitokin seviyelerindeki artışa bağlı olarak lenfositlerdeki apoptotik hücre ölüm hızında azalmanın olabileceği düşünülebilir. SIRS tanı kriterleri arasında lökositoz, lökopeni veya genç hücre oranının %10'dan fazla bulunması gibi bulguların yer aldığı görülmektedir (4). Bizim çalışmamızdaki tüm septik hayvanlarda lökopenik bir tablo saptanmakta iken Nakagawa ve ark.'larının (461) ve Neto ve ark.'larının (483) yaptıkları çalışmalarda ise bizdekinden farklı olarak ÇLP grubunda lökosit sayısında sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık gösteren bir yükselişin meydana geldiği bildirilmektedir. Brooks ve ark.'larının (430) yaptıkları çalışmada sham ve kontrol gruplarına oranla ÇLP grubundaki nötrofil yüzdelerinin daha yüksek, lenfosit yüzdelerinin ise daha düşük olduğu görülmektedir. Buna ek olarak ÇLP grubunda nötrofil/lenfosit oranlarının sham ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin bir biçimde yükselmiş olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği gözle çarpılmaktadır (430). Bizim çalışmamızda da lenfosit yüzdelerinde görülen düşüğe bağlı olarak bu oran artmakta fakat sham ya da kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamaktadır. Neto ve ark.'larının (483) yaptıkları çalışmada, ÇLP grubunda sham grubuna kıyasla eozinofil yüzdeleri bakımından azalmanın meydana geldiği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmadan farklı olarak ÇLP grubundaki hayvanlarda eozinofil yüzdelerinin artmış düzeylerde olduğu görülmekteydi. Neto ve ark.'larının yaptıkları (483) çalışmada, kullanılan

sepsis modeli gereği çekumun ileoçekal valvin 1 cm distalinden bağlandığı ve sonrasında 22G'lik iğne ile çekumun dört kez delindiği bildirilmektedir. Belki de bizim çalışmamızdan farklı olarak çekumun dört kez delinmesi sonucu bu çalışmadaki sistemik inflamatuvar yanıtta belirgin bir artış meydana gelmekte ve bunu takiben kandaki artmış pro-inflamatuvar sitokinler tarafından eozinofillerin aktive edilmesinde ve eozinofillerin damar endoteline tutunarak periferik dokulara geçişindeki artışa bağlı olarak kandaki eozinofil yüzdelerinde düşüş ortaya çıkmaktadır.

Hem sepsisli hastalarda hemde ÇLP modelinin kullanıldığı birçok çalışmada sepsis sonucu lökositopeninin geliştiği gösterilmiştir (430, 438, 476, 477, 484). Sepsisin indüklediği lökositopeninin yaşlılarda ve yenidoğanlarda sık olarak görüldüğü ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (485). Sepsis sonucu lökositopeninin ortaya çıkmasında rol oynayabilecek birçok mekanizma öne sürülmüş olup bunlardan birisi adezyon moleküllerinde ortaya çıkan disregülasyondur (162, 486). Vasküler adezyon molekülleri, lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunda ve sonrasında ekstravasküler alana transmigrasyonunda önemli rol oynamaktadır (487). Sepsisli hastalarda ve ÇLP modeli kullanılan hayvan çalışmalarında, inflamatuvar mediyatörlerin kandaki artmış seviyelerine bağlı olarak endotel yüzeyindeki intersellüler adezyon molekülü (ICAM)-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)-1'nün sekresyonunda artış meydana geldiği bildirilmektedir (488, 489). Bu sonuçlarla uyumlu olarak sepsisli hastalarda ve hayvan modeli çalışmalarında, kan dolaşımındaki lökositlerin dolaşımdan ayrılarak birçok organda (*akciğer, beyin ve gastrointestinal organlar gibi*) birikme eğilimi içinde oldukları gösterilmiştir (490-492). ÇLP modeli uygulanan sıçanlarda lökositopeninin ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülen bir diğer faktör ise hematofagositozun artmış olması sonucu makakaryositler gibi hematopoetik hücrelerin aktive olmuş monosit veya makrofajlar tarafından fagositoza uğramalarıdır. Sepsisli hastalarda makrofaj-koloni stimüle edici faktör (M-CSF)'ün artmış seviyelerinin kemik iliğindeki makrofajları uyarmasının hematofagositozda rol oynadığı düşünülmektedir

(493). Fakat ÇLP yapılan hayvanlarda bu mekanizmanın gerçekleştiğini gösteren bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

Bizim çalışmamızda ÇLP grubundaki hayvanlardan elde edilen kanlar incelendiğinde Hb, Htc ve eritrosit miktarlarının yükselmiş, trombosit miktarlarının ise anlamlı düzeyde azalmış olduğu görülmektedir. Croner ve ark.'larının (476) ÇLP modeli kullanarak yaptıkları sepsis çalışmasında operasyon sonrası 5, 10 ve 20. saatlerde bir takım kan parametrelerine bakılmış ve buradan elde edilen sonuçlar arasında bizim ÇLP modelinde elde ettiğimiz 24. Saatteki bulgular ile uyumlu olarak Htc değerlerinin zaman içinde kademeli olarak yükseldiği, trombosit miktarlarının ise kademeli olarak düştüğü gösterilmiştir. Sepsiste mononükleer hücrelerden salınan sitokinlerin çoğu trombin yapımını uyarmakta, başlangıçta doku faktörünün (TF) ekspresyonundaki artışa bağlı olarak ekstrinsik yol ve daha sonra faktör 12 aktivasyonu ile intrinsik yol aracılığı ile koagülasyon sistemi aktive olmaktadır (74, 159, 160). Koagülasyon sisteminin aktivasyonu sonucu mikrovasküler yatakta fibrin trombüsleri oluşmakta ve sonuç olarak kandaki trombosit seviyelerinde belirgin bir azalma ortaya çıkmaktadır (140, 141). Eğer tabloya DIC komplikasyonu da eklenmiş ise bu tip vakalarda tüketim koagülopatisi sonucu trombositopenin daha da ağır seyrettiği görülmektedir (162). Bu bilgiler ışığında ÇLP yapılan hayvanlarda trombositopenik bir tablonun ortaya çıkması beklenmektedir. Bizim çalışmamızda da yukarıdaki bilgileri destekler nitelikte trompositopenik bir tablo gelişmiş ve ÇLP uygulanan hayvanların hepsinde trombosit değerleri düşük olarak saptanmıştır. Ayrıca daha önce yapılmış olan birçok ÇLP çalışmasında da trombosit değerlerinin ÇLP grubunda sham ya da kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde düşük olduğu gösterilmiştir (430, 476, 494, 495). ÇLP sonrası Htc değerlerinde ortaya çıkan değişim açısından literatürde farklı sonuçların bildirildiği görülmektedir. Örneğin Nakagawa ve ark.'larının (461) yaptıkları çalışmada Htc değerlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmez iken Yang ve ark.'larının (452) yaptıkları çalışmada Htc değerlerinde artış, Hofer ve ark.'larının (496) yaptıkları çalışmada ise düşüş saptanmıştır. Buna ek olarak Hofer ve ark.'larının (496) yaptıkları çalışmada kan parametrelerinin ölçüldüğü 1, 6 ve 24. saatler

arasında da Htc değerleri açısından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Croner ve ark.'larının (497) yaptıkları çalışmada operasyon sonrası 1, 3, 5, 10 ve 20. saatlerde Htc değerlerine bakılmış ve yine kendileri tarafından 2005 yılında yapmış oldukları çalışmanın (476) tam tersi olarak Htc değerlerinde zaman içinde kademeli bir düşüşün ortaya çıktığı gösterilmiştir. Htc değerlerinin saptanmasına ilişkin yukarıda bahsi geçen bütün çalışmalarda aynı tür hayvanlar kullanılmış, benzer tip ÇLP modeli uygulanmış, ek bir sıvı tedavisi verilmemiştir. Bu çalışmalarda Htc değerlerine operasyon sonrası 20. saatlerde bakılmış olmasına rağmen farklı Htc yüzdelerin ölçülmüş olması muhtemelen Htc değerlerinin ÇLP yapılan hayvanlar arasında oldukça fazla değişkenlik gösterebildiğini ya da Htc değerlerinin ölçümünde birbirinden farklı yöntemlerin veya cihazların kullanılıyor olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Sepsiste, trombositopeni gelişimi prognoz açısından önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (64). Sepsisli hastalardaki düşük trombosit değerlerinin klinik tablonun ciddiyetiyle ve artmış mortalite oranlarıyla korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (498-500). Trombosit değerlerin 50.000'nin altına düştüğü hastalarda %38-54 gibi yüksek mortalite oranları bildirilmektedir (501-505). Sepsisli hastalarda "sepsisle ilişkili koagülopati" sık olarak görülmekte ve buna bağlı olarak koagülasyon sisteminin aktive olması sonucu trombositopeni gelişebilmektedir (506). Sepsisle ilişkili koagülopati gelişen hastaların yaklaşık olarak %20'sinde koagülopatinin daha ciddi bir şekilde seyrettiği ve bunun neticesinde DIC'in ortaya çıktığı bildirilmektedir (506). DIC gelişen sepsisli hastalarda ortaya çıkan yaygın damar içi pıhtılaşma bozukluğu sonucu trombositlerin tüketiminde artış ve kandaki trombosit miktarlarında ise belirgin bir düşüş gözlenmektedir (162, 486). Sepsisli hastalarda trombositopeninin gelişmesiyle birlikte hemostazda meydana gelen bozukluğun yanısıra var olan enfeksiyonun ciddiyetinde artış veya yeni enfeksiyonlara yatkınlık gelişebildiği bildirilmektedir (500, 507). Bizim çalışmamızda ÇLP grubundaki hayvanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin bir trombositopeninin geliştiği görülmektedir. ÇLP yapılan sıçanlarda, insanlardakine benzer şekilde pıhtılaşma sistemindeki

aktivasyona bağlı olarak trombositlerin tüketiminin arttığı ve trombositopeninin geliştiği düşünölmektedir (430). Ravindranath ve ark.'larının (508) LP modeli kullanarak yaptıkları bir çalışmada, LP yapılan hayvanlarda DIC tablosunun da gelişebildiği gösterilmiştir. Yoğun bakım hastalarının %30'unda trombositlere yönelik spesifik olmayan antikorların geliştiği ve bu antikorların bir kısmının ise trombositlerdeki glikoprotein IIb/IIIa'ya karşı otoantikör özelliği gösterdiği bildirilmektedir (509). Sepsisli hastalarda trombositlere karşı oluşan antikorlar sonucu trombositlerin immün sistem hücreleri tarafından yıkıma uğradığı gösterilmiştir (509). Fakat aynı mekanizmanın LP'li hayvanlardaki trombositopenide rolünü araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Ayrıca sepsisli hastalarda etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'ya bağlanabilen antikorların ortaya çıkabildiği ve bunun neticesinde trombositlerin test tübündeki EDTA'ya bağlanması ile psödötrombositopeninin ortaya çıkabildiği bildirilmektedir (510, 511). Yukarıda tanımlanan immün veya non-immün mekanizmalar sonucu ortaya çıkan trombositopeninin sepsisli hastalardaki organ disfonksiyonunu göstermesinde önemli bir belirteç olduğu düşünölmektedir (512). Sepsisle ilişkili koagölopati ve DIC gelişimi sonucu mikrovasköler yatakta meydana gelen fibrin trombüslerinin organlara giden kan akımını engellemesiyle birlikte birçok organın beslenmesi ve oksijenizasyonunun bozulduğu ve bunu takip eden süreç içinde akut organ disfonksiyonu ve MODS tablosunun geliştiği bildirilmektedir (140, 141). LP modelinde, sepsisli hastalardakine benzer şekilde koagölopati ve DIC gelişmesi sonucu MODS'la ilişkili olarak karaciğer, akciğer, ince bağırsak ve kalp gibi organlarda ortaya çıkan fonksiyon bozukluklarının morfolojik ve biyokimyasal düzeyde ortaya konmuş olması (362, 363, 430, 513-515) ve yine sepsisli hastalardakine benzer hematolojik sonuçların LP yapılmış sıçanlarda da gösterilmiş olması (430, 460, 466, 476, 477, 494, 495); LP modelinin insanlarda ortaya çıkan sepsis tablosunu klinik ve laboratuvar bulguları açısında da iyi bir şekilde yansıttığını göstermektedir.

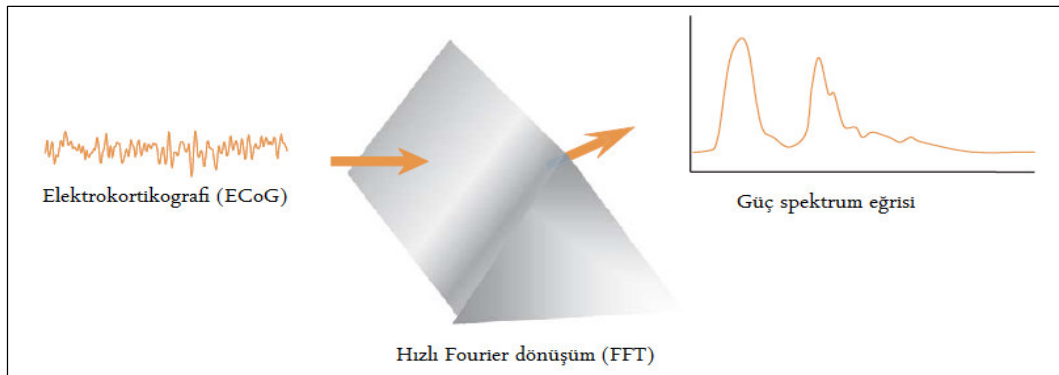
Nörolojik Değerlendirme

Bu çalışmadaki nörolojik değerlendirme sonuçlarına bakıldığında, ÇLP ve sham gruplarında, anestezinin etkisi sonucu ortaya çıkan bilinç kaybına bağlı olarak nörolojik değerlendirme skorunun başlangıçta 0 (sıfır) olduğu, daha sonrasında ise anestezinin etkisindeki azalmaya bağlı olarak 2 ila 12. saatler arasında hem sepsis hem de sham gruplarında kısmi refleks cevap alındığı görülmektedir. Genellikle anestezinin indüksiyonu amacıyla düşük dozlarda (10 mg/kg, ip) kullanılan tiopental sodyum, bizim çalışmamızda genel anestezi oluşturmak amacıyla daha yüksek dozlarda (50 mg/kg, ip) kullanılmış ve bu sebeple de çalışmanın ilk 12 saatinde anestezinin maskeleyeci etkisi sonucu refleks cevaplar net olarak değerlendirilememiştir. Sham ve ÇLP gruplarında 2, 6 ve 12. saatlerdeki nörolojik değerlendirme skorlarının birbiri ile benzerlik göstermesi bu durumu destekler niteliktedir. 24. saatteki değerlere bakıldığında ise refleks cevapların sham grubunda düzelme eğilimi içine girdiği ve başlangıç değerleri seviyesine kadar yükseldiği fakat ÇLP grubunda ise daha düşük seviyelerde kaldığı görüldü. ÇLP grubunda 24. saatte gözlenen düşüş, sham ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermekteydi. Bu bulgu ÇLP grubundaki hayvanların bazılarında ortaya çıkan ensefalopati tablosunun refleks cevaplarda kötüleşme meydana getirdiğini ve sonuç olarak ÇLP grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşturduğunu düşündürmektedir. Kadoi ve ark.'larının (431) sıçanlarda, bizim çalışmamızdakine benzer şekilde bir barbitürat türevi olan pentobarbital (10mg/kg, ip) ile anestezi oluşturdukları sepsis çalışmasında, ÇLP sonrası 30. dk ile 12, 24 ve 48. saatlerde refleks cevaplara bakılmıştır. Bu çalışmada 30. dakikada ve 12. saatte sham, kontrol ve ÇLP grupları arasında herhangi bir değişiklik gözlenmemekte iken 24. saatte ÇLP grubundaki refleks cevap skorunda çok az bir düşüş meydana geldiği ve bu düşüşün 48. saatte daha da belirginleşerek sham ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık oluşturduğu bildirilmektedir (431). Kadoi ve ark.'larının (431) yapmış oldukları çalışmada muhtemelen bizim çalışmamızdan farklı olarak 24. saatte ÇLP grubundaki hayvanların büyük bir kısmı ensefalopati tablosu

göstermemekte fakat 48. saate gelindiğinde ise yaşamaya devam eden hayvanlar arasında ensefalopatinin daha yaygın gözlenmesi sonucu refleks cevaplar açısından diğer gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş ortaya çıkmaktadır.

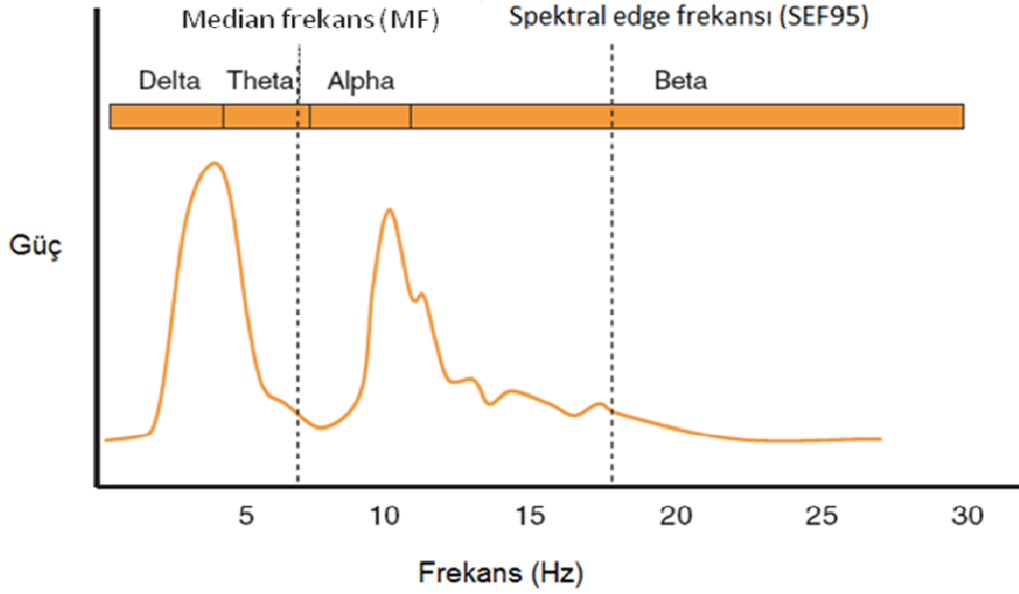
Beyin Elektriksel Aktivitesine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

ECoG kayıtlarından elde edilen verilerin bilgisayar yardımıyla kantitatif olarak analizinde genellikle “hızlı Fourier dönüşüm” (fast Fourier transform: FFT) yöntemi tercih edilmektedir. FFT yönteminde, frekansa karşı güç eğrisi çizilmekte ve güç spektrumunu gösteren spektral bir grafik elde edilmekte ve bu sayede her bir frekans noktasına denk gelen ve amplitüdün karesi (mikrovolt²) olarak gösterilen güç değerinin ortaya konması mümkün olmaktadır (Şekil-47). Elde edilen spektral grafiğin %50'sinin altında kalan alanı yansıtan veya başka bir deyişle toplam gücün %50'sini karşılayan frekans değeri, medyan frekans (MF) olarak adlandırılmakta iken aynı grafik üzerinde toplam gücün %95'ini karşılayan frekans değeri ise spektral edge frekansı (SEF95) olarak adlandırılmaktadır (516). Bunlara ek olarak spektral grafik yardımıyla önceden belirlenmiş olan frekans bandlarının (delta 0,5-3; teta 4-8; alfa 8-13 ve beta 13-30 Hz) her birinin güçleri hesaplanabilmekte ve total güç spektrum'una olan katkısı yüzde değer olarak ifade edilebilmektedir (516) (Şekil-48).



Şekil 47: Elektrokortikografi kayıtlarındaki amplitüd ve frekans değişimlerinin, hızlı fourier yöntemi (FFT) kullanılarak spektral bir eğriye dönüştürülmesi.

(Tonner ve Bein. 2006. Best Pract Res Clin Anaesthesiol.20: 147-159)



Şekil 48: Güç spektrum eğrisinde, medyan frekans (MF) ve spektral edge frekansı (SEF95) değerlerinin gösterilmesi.

(Tonner ve Bein, 2006. Best Pract Res Clin Anaesthesiol.20: 147-159)

Bizim çalışmamızdaki ECoG kayıtlarından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, operasyon sonrası 24. saatte ÇLP grubundaki MF (medyan frekans) ve SEF 95 (spektral edge frekansı) değerlerinde düşüş meydana geldiği görülmektedir. Fakat ÇLP grubunda gözlenen bu düşüş değerlerinin, sham ve kontrol grubundaki değerler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadıkları gözlenmiştir. Sham grubunda ise ilk iki saatte ortaya çıkan düşme eğiliminin ardından ilerleyen deney süreci içinde MF ve SEF 95 değerlerinde artış meydana geldiği ve ÇLP grubundan farklı olarak 24. saatteki değerlerin başlangıç değerleri ile aynı seviyelerde seyrettiği belirlenmiştir. ECoG kayıtlarındaki daha önceden belirlenmiş frekans bantlarının (delta 0,5-3; teta 4-8; alfa 8-13 ve beta 13-30 Hz) spektral güç analizlerine bakıldığında, ÇLP grubunda çalışmanın 24. saatinde alfa, beta ve teta dalga aktivitesinde azalma, delta aktivitesinde ise artmış saptanmıştır. Alfa ve beta bantlarının aktivitelerinde 24. saatte belirlenen azalma öncesinde başlangıçta yükselme meydana geldiği gözlenmiştir. Sham grubunda ise çalışmanın 24. saatindeki dalga aktivitelerinin başlangıç değerleriyle aynı seviyelerde seyrettiği görülmüştür.

Buna ek olarak sham grubundaki delta dalga aktivitesinin, ÇLP grubundan farklı olarak 2, 6 ve 12. saatlerde başlangıç değerlerine göre belirgin bir şekilde düşük seviyelerde seyrettiği gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda, MF ve SEF95 değerleri açısından operasyon sonrası ikinci saatteki ortaya çıkan düşüşün hem ÇLP hemde sham grubunda gözleniyor olması anestezinin etkisi sonucu ortaya çıktığını düşündürmektedir. Barbitüratlar gibi hipno-sedatif ajanların, düşük dozlarda uygulanmasının paradoksal olarak EEG'de aktivasyona (düşük amplitüdü yüksek frekanslı dalgalara) yol açtığı bilinmektedir. Bu durumun beyin sapının kaudal kısmında bulunan ve retiküler aktive edici sistem üzerinde tonik inhibitör etkinlik gösteren merkezlerin barbitüratlar tarafından inhibisyonu sonucu olduğu düşünülmektedir (517-521). Fakat vücuda giren ilaç miktarının artmasıyla birlikte ya da yüksek miktarlarda ilacın en başta uygulanmasına bağlı olarak EEG aktivitesinde azalmanın (yüksek amplitüdü yavaş (5-12 Hz) dalgaların) ortaya çıktığı ve eş zamanlı olarak hastanın bilincinde kayıp meydana geldiği bildirilmektedir (518-521). Bizim çalışmamızda anestezi oluşturmak amacıyla barbitürat türevi bir ilaç olan tiyopental sodyumun yüksek dozları kullanılmış ve yukarıdaki bulguları destekler şekilde çalışmanın ikinci saatinde ECoG kayıtlarındaki dalga frekanslarını yansıtan MF ve SEF 95 değerlerinde azalma saptanmıştır.

Sepsisli hastaların büyük bir kısmı, klinik tablonun ağır seyretmesi nedeniyle yoğun bakım ünitelerinde tedavi görmekte ve SİE sonucu ortaya çıkabilen ajitasyon veya deliryum gibi klinik bulguların engellenebilmesi bakımından ya da mekanik ventilasyon cihazına uyum sağlamaları açısından sedasyon altında tutulmaktadır. Sepsisli hastalarda SİE tanısının konabilmesi için ya da bu hastaların ensefalopatiden ne derece etkilendiğinin ortaya konabilmesi açısından klinik pratikte nörolojik muayene uygulanmakta fakat bu hastalara uygulanan sedasyonun araya girmesi sonucunda çoğu zaman net bilgiler elde edilememektedir. Bu gibi durumlarda hastalardan EEG veya SEP kayıtları alınmakta ya da beyindeki hasarlanmayı yansıttığı düşünülen S100B'nin kandaki seviyelerine bakılmaktadır (366, 369, 522-524). EEG, yoğun bakım ünitelerinde ensefalopati tanısının konmasında ya da

derecesinin belirlenmesinde sık olarak kullanılmakta fakat hastalara uygulanan analjeziden veya sedasyondan etkilenmesi sonucu güvenilirliği azalmaktadır. Sedasyon uygulanan hastalarda SEP'in, EEG'ye göre daha güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Literatür verilerine bakıldığında tiyopental sodyumun anestezik dozlarda sıçan veya insanlara verilmesinin MF ve SEF 95 değerlerinde düşüşe yol açtığı görülmektedir ki bizim çalışmamızda operasyon sonrası 2. saatte (sıçanlarda anestezinin etkisinin devam ettiği bir saatte) elde ettiğimiz sonuçlar bu verileri destekler niteliktedir (525, 526). Bunlara ek olarak Kuizenga ve ark.'ları (527), yüksek dozlarda tiyopental sodyum verdikleri hastalarda bifazik EEG değişikliğinin ortaya çıktığını göstermişlerdir. Buna göre başlangıçta alfa ve beta aktivitesinde artış gözlenmekte fakat daha sonra alfa ve beta aktivitesinde azalma ve eşzamanlı olarak delta aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Bizim çalışmamızdaki alfa, beta ve delta frekanslarına ait spektral güç analizi verileri bu çalışmayla uyum göstermektedir. Young ve ark.'ları (366), SİE'li hastalarda klinik bulguların ciddiyetiyle paralellik gösteren beş sınıf EEG paterni belirlemişlerdir. Bunlar sırasıyla normal EEG, teta dalgalarında orta derecede yavaşlama, diffüz delta dalgaları, trifazik dalgalar ve süpresyon paterninden oluşmaktadır. Straver ve ark.'larının (20) ondört SİE'li hastada yapmış oldukları EEG çalışmasında ise tüm EEG kayıtlarında azalmış bir hız aktivitesi ve artmış oranlarda yavaş dalga oluşumu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ÇLP grubundan elde edilmiş ECoG kayıtlarına ilişkin sonuçlar (*alfa ve beta aktivitesinde azalmaya karşın düşük frekanslı delta aktivitesinde artma ve beyin elektriksel aktivitesindeki azalmaya işaret eder şekilde MF ve SEF95 frekans değerlerinde azalma*), Straver ve ark.'larının (20) sepsisli hastalarda elde ettiği EEG sonuçlarına (*azalmış hız aktivitesi ve artmış oranlarda düşük frekanslı yavaş dalga oluşumu*) benzerlik göstermektedir. ECoG çekimlerinde yöntem gereği elektrodlar direkt olarak kraniyuma takılmakta ve beyin elektriksel aktivitesi duramater üzerinden kayıt edilmekte iken EEG'de ise elektrodlar kafa derisine tutturularak ya da elektrodları içeren bir başlık aracılığı ile kraniyum üzerinden kayıt yapılmaktadır. ECoG kayıtlarında kraniyum devre dışı bırakılmakta ve EEG'ye kıyasla daha az

parazitli ve temiz kayıtlar elde edilebilmektedir. Bizim çalışmamızda ECoG kayıtlarında gözlemlemiş olduğumuz delta aktivitesindeki artış ve dev delta dalgalarının gözlenmesi, Young ve ark.'larının (383) sepsisli hastalarda tanımlamış oldukları EEG patern sınıflandırmasındaki evre-3'e (*delta dalgalarında yoğun bir artış görülmesi*) denk geldiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda ÇLP yapılan hayvanlardan dört tanesinde ECoG verilerinin ensefalopatiyi destekler şekilde daha belirgin olduğu görülmekteydi. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda ÇLP yapılan hayvanların yalnızca bir kısmında ECoG sonuçları açısından ensefalopatik bir tablonun geliştiği ve ÇLP grubundaki tüm hayvanlardan elde edilen verilerin, kontrol ya da sham grubuyla karşılaştırılıyor olması nedeniyle de ÇLP grubundaki MF, SEF 95 ve spektral güç analizi değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemektedir. Bu bulgular neticesinde; ÇLP modeli uygulanan tüm hayvanlarda 24. saatte SİE bulgularının gelişmeyebileceğini ve ÇLP uygulanan tüm hayvanlarda SİE geliştiği varsayımına dayalı deney dizaynlarının yeterli olamayabileceğini, yapılacak beyin çalışmalarında nörolojik değerlendirmenin yanısıra ECoG ve SEP bulguları ile SİE geliştiği düşünülen hayvanların, deney grubuna dahil edilmesinin daha doğru sonuç ve yorumlar elde etmeye yarayacağını ifade etmek mümkündür.

SEP sonuçları değerlendirildiğinde; operasyon sonrası 24. saatte ÇLP grubundaki dalga pikleri arasında ve uyarının başlangıcı ile P1 ve P2 dalga pikleri arasındaki mesafelerde uzamanın meydana geldiği görülmektedir. Fakat ÇLP grubunda gözlenen bu uzama değerleri, sham ve kontrol grubundaki değerler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamaktaydı. Buna ek olarak ÇLP grubundaki 24. saate ait değerler, 0. saatte elde edilen başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında U-P1 ve N1-P2 mesafelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir uzamanın meydana geldiği gözlenmekteydi. SEP kayıtlarındaki pozitif ve negatif dalgaların amplitüd değerlerine bakıldığında ise ÇLP grubunda P1, P2 ve N1 dalgalarının amplitüplerinde, operasyon sonrası 24. saatteki değerlerin başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında daha düşük düzeylerde olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görüldü. Sham

grubunda ise ÇLP grubundan farklı olarak 24. saatteki amplitüd değerleri başlangıç değerleriyle aynı seviyelerde seyretmekteydi. Bunlara ek olarak, ÇLP grubunda P1 dalgasına ait amplitüd değerlerinin 12 ve 24. saatlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalmış olduğu gözlemlendi. ÇLP ve sham gruplarında, kullanılan yüksek dozdaki anestezi maddenin (tiyopental sodyum) SEP komponentleri üzerine olan etkisinin en belirgin olarak gözlenebileceği 2. saatteki SEP kayıtlarına bakıldığında, pozitif ve negatif dalgalara ait amplitüd değerlerinde ve dalga pikleri arasındaki mesafelerde belirgin bir değişiklik göze çarpmamaktadır. Sepsis tanısı konan hastalar, genellikle yoğun bakım ünitelerinde tedavi görmekte ve mekanik ventilasyon cihazına uyum sağlamaları açısından sedatize edilmektedir. SEP yöntemi, hasta başında kolayca uygulanabilmekte ve SİE'nin tanısında güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilmesi için hastalara uygulanan hipno-sedatif ilaçlardan etkilenmemesi gerekmektedir. Gerçekten de literatür verilerine bakıldığında, insanlarda yapılan SEP çalışmaları sonucu hem kortikal hem de subkortikal SEP yollarından elde edilen kayıtlarda amplitüd değerlerinin hastalara uygulanan sedasyondan etkilenmediği gösterilmiştir (368, 369, 528-531). Buna ek olarak insanlardaki kısa-mesafeli SEP komponentlerinin hem amplitüd hem de uzama (latensi) değerleri açısından sedasyondan etkilenmediği gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (532). Bunun tersi olarak sıçanlardaki lazer uyarılmış potansiyellerin (LEP), işitsel uyarılmış potansiyellerin (AEP) ve Vertex üzerinden yapılan somatosensoriyal uyarılmış potansiyellerin (Vx-SEP) sedasyon yapıcı ilaçlardan ve uyarı frekansındaki değişikliklerden etkilendiği bildirilmektedir (533-535). Fakat bizim çalışmamızdakine benzer şekilde primer somatosensoriyal korteks (SI) kullanılarak sıçanlardan elde edilmiş SEP kayıtlarında (SI-SEP), 10-30 msn'lik zaman dilimi içinde yer alan SEP komponentlerinin uyarı frekansındaki değişikliklere karşı duyarsız olduğu ve hipno-sedatif ya da analjezik ilaçlardan etkilenmediği gösterilmiştir (536). Bu sebeple bizim çalışmamızda, SEP kayıtlarındaki 30 msn'lik zaman dilimi içinde yer alan P1, N1 ve P2 dalgalarına ilişkin veriler kullanılmakta iken N2 dalgasına ait

amplitüd değerleri ve uzama mesafesine ilişkin değerler (P2-N2 ve N1-N2 gibi) kullanılmamıştır.

Tiyopental sodyumun sedatize edici dozlarının sepsisli hastalarda SEP kayıtlarını etkilemediği fakat anestezi oluşturmak amacıyla daha yüksek dozlarda verildiğinde SEP dalgaları üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Drummond ve ark.'larının (537) yaptıkları çalışmada, hastalara toplam dozu 77,5 mg/kg olacak şekilde 60 dk. süreyle yüksek doz tiyopental sodyum verilerek anestezi oluşturulmuş ve n. medianus'un uyarılması ile primer somatosensorial korteks'ten elde edilen SEP kayıtlarında dalga pikleri arasındaki mesafelerde uzama, dalga amplitüplerinde ise belirgin bir düşüş geliştiği gösterilmiştir. İnsanların dışında diğer hayvan türlerinde de tiyopental sodyumun yüksek dozlarının SEP kayıtlarını etkilediği gösterilmiştir. Martoft ve ark.'larının (538) domuzlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada anestezi etkisi oluşturacak kadar yüksek dozlardaki tiyopental sodyumun, orta-mesafeli işitsel uyarılmış potansiyelleri (MLAEP) hızlı bir şekilde değiştirdiği bildirilmektedir. Takaya ve ark.'larının (539) yaptıkları çalışmada ise tiyopental sodyum tarafından indüklenen derin koma durumunda, erişkin kedilerden kortikal SEP kayıtları elde edilmiş ve bu kayıtlarda P1 ve N1 dalgasına ait amplitüd değerlerinde düşüş gözlenirken dalga pikleri arasındaki mesafelerde ise kademeli doz artışına rağmen herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda genel anestezi oluşturmak için hipno-sedatif bir ajan olan tiyopental sodyumun yüksek dozları (50 mg/kg, ip) kullanılmış ve tiyopental sodyumun SEP dalgaları üzerine olan etkisinin en fazla gözlenebileceği 2. saatteki SEP kayıtlarında belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durum, hipno-sedatif ilaçların sedasyon oluşturan dozlardan çok daha yüksek dozlarda bile SEP kayıtlarını değiştirmediğini ve böylelikle de SİE'ye yönelik çalışmalarda en azından sıçanlar açısından SEP yönteminin güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ayrıca bizim çalışmamızda operasyon sonrası 24. saatte anestezinin etkisinin ortadan kalktığı göz önünde bulundurulur ise 24. saatte elde edilmiş olan SEP dalga amplitüplerinde ve dalga pikleri arasında gözlenen uzamanın yalnızca sepsisin beyin üzerinde oluşturduğu etkiler sonucunda ortaya çıktığı

düşünülebilir. Yoğun bakım ünitelerindeki sepsisli hastalarda SİE'nin görülme sıklığıyla ilgili olarak %8-70 arasında oranlar bildirilmektedir (16-20, 365-369). Bizim çalışmamızda operasyon sonrası 24. saatteki SEP kayıtlarına bakıldığında P1 dalgasının ÇLP grubunda kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturacak düzeylerde düşük olduğu, U-P1 ve N1-P2 mesafelerinin ise başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında belirgin bir biçimde uzamış olduğu görülmektedir. Bu bakımdan U-P1 ve N1-P2 mesafelerinde ve P1 dalgasındaki amplitüd değerlerinde gözlenen anlamlı değişikliklerin ensefalopatiye ait serebral disfonksiyona işaret ettiği göz önünde bulundurulur ise bizim çalışmamızda ÇLP yapılan hayvanların yaklaşık olarak %40'ında SEP bulguları açısından ensefalopati tablosunun geliştiği ortaya çıkmaktaydı. Bu sonuçlar, SİE'ye yönelik olarak ileride yapılması planlanacak olan beyin çalışmalarında, SEP ya da ECoG kayıtlarından elde edilecek olan veriler doğrultusunda SİE geliştiği düşünülen hayvanların çalışmaya dahil edilmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağını ortaya koymaktadır.

SİE'ye yönelik olarak daha önceki yapılmış SEP çalışmalarında birbiriyle uyuşmayan sonuçlar bildirilmektedir. Literatürde ensefalopati sonucu SEP amplitüplerinde düşüş meydana geldiğini gösteren vaka çalışmalarının dışında SEP parametrelerinde herhangi bir değişiklik oluşmadığını bildiren insan ve hayvan çalışmalarına da rastlanmaktadır. Schwarz ve ark.'larının (540) sepsisle ilişkili olarak yaptıkları vaka çalışmasında, SEP kayıtlarındaki dalga pikleri arasındaki mesafelerde uzama, dalga piklerine ait amplitüd değerlerinde ise düşüşün meydana geldiği ve bu durumun ensefalopatinin ciddiyetiyle ve mortalite oranlarının artışıyla korelasyon gösterdiği bildirilmektedir. Ohnesorge ve ark.'ları (384) pankreatit oluşturdukları domuzlarda deneysel bir SIRS modeli geliştirmişler ve ortaya çıkan SIRS sonucunda beyinde gelişen disfonksiyonu SEP ve EEG kayıtları yardımıyla ortaya koymaya çalışmışlardır. Bu çalışmada da ensefalopatiye bağlı olarak SEP dalgalarındaki amplitüd değerlerinde düşüş ve dalga pikleri arasındaki mesafelerde ise uzamanın meydana geldiği gösterilmiştir (384). SIRS, birçok ağır klinik bulguya neden olan sistemik

inflamatuvar cevap olarak tanımlanmış olup enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan (pankreatit, yanık, multipl travma gibi) nedenlere bağlı gelişebilmektedir (4). Sepsis ise kanıtlanmış bir enfeksiyöz olay sonucu gelişen SIRS olarak tanımlanmaktadır (4). Bu açıdan bakıldığında birçok araştırmacıya göre Ohnesorge ve ark.'larının (384) kullandıkları deneysel SIRS modeli, sepsis modelleri kadar genel kabul görmese de insanlarda gelişen SİE tablosunu aydınlatacak önemli veriler sağlamaktadır. Bu çalışmada SIRS'a ait klinik bulguların ortaya çıkmasından çok daha önce SEP kayıtları sayesinde ensefalopatiye ait serebral disfonksiyonun saptanabileceğine işaret edilmektedir. Ohnesorge ve ark.'larının (384) yaptıkları çalışmada SIRS tablosunun ortaya konmasından 2 ya da 4 saat öncesinde SEP dalga amplitüdlerinde başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında %60'lara varan ve istatistiksel olarak anlamlılık gösteren bir düşüş gözlenmekte fakat buna benzer bir anlamlılık P15-20 mesafesindeki uzama değerlerinde görülmemektedir. Daha önce yapılan deneysel sepsis modeli çalışmaları, ÇLP sonrası 6. saatte genellikle hayvanlarda sepsisin geliştiğini ve çoğunlukla da sepsise ait hiperdinamik bir fazın ortaya çıktığını ortaya koymaktadır (215). Bizim çalışmamızda ÇLP uygulanan sıçanlarda, sepsisin geliştiği varsayılan operasyon sonrası 6. saatten dört saat kadar önce çekilen 2. saat kayıtlarına bakıldığında, amplitüd değerlerinde ve dalgalar arası uzama mesafelerinde Ohnesorge ve ark.'larının sonuçları ile örtüşen benzer bir değişiklik gözlenmemektedir. Ohnesorge ve ark.'larının (384) yaptıkları çalışmada hayvanların SIRS kriterlerini karşıladıkları zamandaki vital parametre değerlerine bakıldığında kan basıncındaki düşüğe karşın kalp atım hızında ve kardiyak out-put'ta artışın ortaya çıktığı görülmektedir. Ohnesorge ve ark.'ları (384) vital parametreler açısından gözlenen bu durumu, hayvanlarda ortaya çıkan hiperdinamik cevaba bağlamışlardır. ÇLP yapılan hayvanlarda genellikle 6 ila 10. saatlerde hiperdinamik bir fazın, 14 ila 20. saatlerde ise hipodinamik bir fazın (septik şok) geliştiği kabul edilmektedir (181, 479, 541-543). Ohnesorge ve ark.'larının (384), çalışmaya alınan hayvanların SIRS kriterlerini karşıladıkları zamanda yani vital parametreler açısından hiperdinamik bir

evreye denk gelen zamanda çektikleri SEP kayıtlarına bakıldığında sekiz hayvanın altısında ensefalopatiyi destekler şekilde P15-20 dalgasının amplitüd değerlerinde düşüş saptanmakta iken bizim çalışmamızda hiperdinamik evreye uyumlu olan 6. saatteki SEP kayıtlarına bakılır ise P1 dalgasında 2/8 hayvanda, P2 ve N1 dalgasında ise 1/8 hayvanda ensefalopatik tabloyu destekleyen bir amplitüd düşüşüne rastlanmaktaydı ki bu oranlar Ohnesorge ve ark.'larının oranlarıyla kıyaslandığında oldukça düşük düzeylerdeydi. Ohnesorge ve ark.'ları ile bizim çalışmamız arasında SEP bulgularının ortaya çıkış zamanı ve amplitüd değerlerindeki düşüş miktarları arasındaki farklılıkların, iki çalışma arasında kullanılan deney hayvanları ve seçilen deney modelleri açısından var olan farklılıklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Zauner ve ark.'larının (369) yaptıkları çalışmada, ciddi sepsis ve septik şok gelişen yoğun bakım hastalarından elde edilen SEP kayıtlarındaki N9, N13, N13-N20, N20, N20-N70 ve N70'e ait uzama (latensi) değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir biçimde uzamış olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada hastaların %34'ünde subkortikal SEP yolaklarını gösteren N13 ve N20 dalga pikleri arasındaki mesafelerde (N13-N20), %84'ünde kortikal SEP yolaklarını gösteren N20-N70 dalga pikleri arasındaki mesafelerde (N20-N70) ve %57'sinde ise periferik sinir ileti hızını gösteren uyarının başlangıcı ile N9 dalga piki arasındaki mesafelerde (N9) belirgin bir uzama göze çarpmaktadır. Hastaların %34'ünde subkortikal, %84'ünde ise kortikal yolaklarda SEP dalga pikleri arasındaki mesafelerde uzamanın saptanmış olması, sepsis sonucu ortaya çıkan ensefalopatik tablodan kortikal yapıların, subkortikal yapılara kıyasla (talamus, beyin sapı ve medulla spinalis gibi) daha fazla etkilenmiş olduğunu ortaya koymaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada SEP kayıtları yalnızca primer somatosensoriyal korteksten alınmış olduğu için kortikal ve subkortikal yolların veya periferik sinirlerin yapısal ve fonksiyonel durumu hakkında tek tek bilgi sahibi olmak ya da sepsisle ilişkili ensefalopatiden bu yapıların herbirinin hangi derecelerde etkilenmiş olduğunu ortaya koymak mümkün olmamıştır. Bizim çalışmamızdaki SEP kayıtlarında gözlediğimiz değişiklikler muhtemelen

yukarıda bahsi geçen SEP yolaklarının tek tek etkilenebileceği gibi birden fazla yolağın birlikte etkilenmiş olmasından dolayı ortaya çıkmaktadır. ÇLP yapılan hayvanlarda n. ischiadicus gibi periferik sinirler üzerinden yapılacak olan sinir ileti hızı çalışmaları ile periferik sinirlerin değerlendirilmesi ya da kuyruğa verilen uyarı sonrası kortikal SEP yolaklarının değerlendirilmesi amacı ile her iki taraf primer somatosensoryal korteksten elde edilen SEP kayıtları arasındaki farkın ortaya konması mümkündür ve mevcut çalışmada SEP kayıtlarında gözlenen değişikliklerin nedenine ışık tutabilir.

Bizim çalışmamız neticesinde ÇLP modeli uygulanan sıçanlarda SİE'nin gelişebildiği, nörolojik değerlendirmeye ek olarak ECoG ve SEP kayıtlarıyla da ortaya konmuştur. Literatür verileri tarandığında ÇLP'nin beyin elektriksel aktivitesi üzerine olan etkilerini göstermeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu duruma ilişkin olarak bizim çalışmamız bu konuda yapılmış ilk çalışma olarak göze çarpmaktadır. ÇLP modeli uygulanan hayvanların bir kısmında sepsisli hastalardakine benzer şekilde MODS'un bir komponenti olarak SİE'nin gözleniyor olması ve ortaya çıkan SİE tablosunun beyin elektriksel aktivitesi açısından sepsisli hastalardakine benzerlik göstermesi nedeniyle ÇLP'nin SİE'yle ilişkili olarak da klinik sepsis tablosunu iyi bir şekilde yansıttığı görülmektedir.

İmmünohistokimya Bulgularının Değerlendirilmesi

Sepsiste ortaya çıkan patofizyolojik değişiklikler sonucu birçok organda fonksiyon bozukluğu gelişebilmekte ve bu durumun ortaya çıkmasında ise apoptotik hücre ölümlerinin de içinde bulunduğu birçok farklı mekanizma devreye girmektedir. Sepsisin kalp, akciğer ve böbrekler gibi vital organlar üzerinde apoptotik hücre ölümleri açısından meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen pek çok çalışma bulunmaktayken, merkezi sinir sisteminde ortaya çıkan apoptotik değişiklikleri göstermeye yönelik çalışmaların sayısı ise sınırlıdır. Sepsis sonucu beyinde ortaya çıkan apoptotik hücre ölümlerini inceleyen yalnızca bir postmortem çalışma bulunmakta ve bu çalışmada septik şoktan ölen hastaların beyinlerindeki supraoptik nükleus, paraventriküler nükleus ve meduller otonomik nükleus

gibi santral otonomik merkezlerde apoptotik hücre ölümlerinin gerçekleştiği bildirilmektedir (364). Sepsis sonucu beyinde ortaya çıkan fonksiyon bozukluğunda apoptozun rolünü ortaya koymaya yönelik kısıtlı sayıda hayvan çalışması yapılmış ve bu çalışmaların tamamına yakınında deneysel sepsis oluşturmak amacıyla LPS modeli kullanılmıştır (29, 407, 544, 545). LPS modeli hernekadar çalışma pratiği açısından kolaylık sağlasa da bu modelin insanlardaki sepsisi iyi bir şekilde taklit edemediği gösterilmiştir (212). Bu nedenle bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar sepsise bağlı olarak insanlarda ortaya çıkan patofizyolojik olayların açıklanmasında yetersiz kalmaktadır. ÇLP modelinin ise insanlardaki sepsis kliniğini iyi bir şekilde yansıttığı düşünülmekte ve bu özelliği sayesinde sepsisli ilişkili çalışmalarda günümüzde hala tercih edilen yöntem olma özelliğini korumaktadır. Mevcut literatür tarandığında sepsisin beyin üzerinde apoptotik hücre ölümleri açısından meydana getirdiği değişiklikleri anlamamıza kaynak sağlayacak yalnızca bir ÇLP modeli çalışmasına rastlanmaktadır (28). Messaris ve arkadaşları (28) tarafından yapılan bu çalışmada hippokampus'un CA1 alanı, koroid pleksus hücreleri ve serebellumun purkinje hücrelerinde apoptozun gerçekleştiği gösterilmiştir. SİE'nin, SVZ ve gyrus dentatus (DG) gibi yetişkin beyinlerinde yeni nöron üretiminin (nörogenez) gerçekleştiği yerlerde meydana getirdiği apoptotik değişikliklerin daha önceden ÇLP modeli kullanılarak incelenmemiş olması nedeniyle bizim çalışmamızda bu bölgelerdeki apoptotik hücre değişiklikleri TUNEL ve kaspaz-3 gibi immünohistokimyasal yöntemlerle ortaya konmaya çalışıldı. SVZ, lateral ventrikül'ün lateral duvarı boyunca uzanmakta iken DG ise hippocampus'da yerleşim göstermekte ve her iki oluşum da yetişkin memeli beyinlerinde yeni nöron üretiminin (nörogenezis) gerçekleştirildiği germinal merkezler olarak kabul edilmektedir. SVZ ve DG'ye ek olarak santral otonomik merkezler üzerinde de apoptotik hücre ölümleri açısından ÇLP yöntemi kullanılarak yapılmış bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu nedenle yapmış olduğumuz bu çalışmada santral otonomik merkezler arasında yer alan median preoptik nükleus (MnPO), anteroventral periventriküler nükleus (AVPe), granüler insular korteks (GI) ve agranüler insular korteks (AIP), ventroposterior

parvosellüler nükleus (VPPC), perifornikal nükleus (PeF), dorsomedial hipotalamik nükleus (DMD) , zona incerta (ZI), rostralventrolateral retiküler nükleus (RVLM), nucleus tractus solitarius (NTS) ve intermediate retiküler nükleus (Irt) alanlarını içeren histolojik kesitlerde apoptotik hücre ölümleri immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmeye çalışıldı.

Nucleus tractus solitarius (NTS), beyin sapının dorsomedialinde yer almakta olup kardiyovasküler afferent liflerin (baroreseptör, kemoreseptör ve kardiyak reseptörlerden gelen lifler gibi) pekçoğunun ilk sinapsını burada yapıyor olması nedeniyle NTS'de ortaya çıkan lezyonlarda hipotansiyona karşı gelişen taşikardik cevapta bozulma meydana geldiği bildirilmektedir (546-552). Bir diğer otonomik merkez olan RVLM, kardiyovasküler reflekslerin düzenlenmesinde görev yapmakta ve üzerinde çok fazla sayıda araştırma yapılan bir alan olarak göze çarpmaktadır (553). Anestezi altında yapılan birçok tavşan, kedi ve sıçan çalışmaları sonrasında birçok hayvan türünde sempatik uyarıların büyük çoğunluğunun, ventrolateral medulla'nın rostral parçasından kaynaklandığı görülmüştür. Bu hayvan türlerinde RVLM'nin inhibe edilmesi sonrasında böbrek, kas ve splanknik yapılara ait vasküler yatakta ve kalbe giden sempatik sinir aktivitesinde azalma meydana gelmekte ve bunun neticesinde ise kalp atım hızı ve ortalama arteriyel basınçta önemli bir düşüş ortaya çıkmaktadır (554, 555). RVLM'nin kardiyovasküler reflekslerin kontrolü dışında respiratuar reflekslerin düzenlenmesinde de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. RVLM'de yer alan "*Bötzinger kompleks*" içinde ekspirasyonla ilişkili nöronların yer aldığı, caudal ve ventral yerleşimli olan "*ventral respiratuar grup*" içinde inspirasyonla ilişkili nöronların yer aldığı ve "*pre-Bötzinger kompleks*" içinde ise respiratuar siklusun düzenlenmesinde görev alan nöronların bulunduğu gösterilmiştir (556). Hipotalamusun otonomik fonksiyonların düzenlenmesinde merkezi bir role sahip olduğu uzun bir süredir bilinmektedir. Hipotalamusta yer alan MnPO ve AVPe'nin lezyonlarında su içme hissinde görülen azalmadan başlayıp plazma osmolarite ve kan basıncında ortaya çıkan bozulmaya kadar ilerleyebilen çeşitli seviyelerde sıvı-elektrolit dengesi bozuklukları görülebilmektedir. Buna ek olarak bu tip lezyonlar termoregülasyonda

bozukluk ve immün stimülasyon sonrası ortaya çıkan ateş cevabında kayıp gibi bulgularla da ilişkilidir (553). Santral otonomik merkezler arasında yer alan insular korteksin elektriksel veya kimyasal olarak uyarılmasının çeşitli otonomik cevaplara yol açabildiği gösterilmiştir. En kaudal bölgenin uyarılması depressör ve bradikardik cevaplara yol açmakta iken biraz daha rostral alanların uyarılması sonucunda taşikardi ile birlikte kan basıncında artış gözlenmektedir (553). Santral otonomik merkezler arasında yer alan bu nükleuslarda meydana gelen fonksiyon bozukluklarının sepsiste ortaya çıkan hemodinamik değişikliklere ya da septik şoklu hastalarda gözlenen dirençli hipotansiyona katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (367). Yapmış olduğumuz bu çalışmada SİE'nin AVPe, GI, AIP, VPPC, DMD, NTS ve RVLM gibi otonom merkezler üzerinde, hippocampus'un CA1, CA3 ve CA3/4 alanları ile erişkin beyinlerinde yeni nöron üretiminin gerçekleştiği SVZ ve DG üzerinde apoptotik hücre ölümleri açısından ortaya çıkardığı değişikliklerin incelenmesi amacıyla kaspaz-3, transglutaminaz ve TUNEL yöntemi gibi immünohistokimyasal işaretleme yöntemleri kullanıldı.

Bu çalışmadaki kaspaz-3, transglutaminaz ve TUNEL immünohistokimya sonuçları değerlendirildiğinde, ÇLP grubuna ait histolojik kesitlerde sham ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MnPO, SVZ, DG, CA1, CA3 ve CA3/4 alanlarında TUNEL pozitif boyanmış hücre sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. AvPE, GI, AIP, VPPC, PeF, DMD, ZI, NTS, Irt ve RVLM alanlarında ise gruplar arasında TUNEL pozitifliği açısından herhangi bir farklılık saptanmadı. Apoptotik hücrelerde DNA internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti ve bunun katları olacak şekilde parçalanmakta ve bu sayede TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerde ortaya çıkan DNA kırıkları *in situ* olarak gözlenebilmektedir (291, 292). Fakat bir diğer hücre ölüm şekli olan nekrotik hücre ölümlerinde de DNA'nın non-spesifik olarak parçalanması neticesinde TUNEL yöntemi ile yanlış pozitiflikler saptanabilmektedir (269). Bu sebeple TUNEL yöntemine ek olarak apoptoza daha spesifik olduğu düşünülen kaspaz-3 yöntemi ya da M30 yöntemi gibi ek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (277). Bizim çalışmamızda da TUNEL pozitif boyalı hücrelerin

gözleendiği beyin alanlarında apoptozun gerçekleştiğinin doğrulanması amacıyla TUNEL yöntemine ek olarak kaspaz-3 ve transglutaminaz immünohistokimya boyaması yapıldı. ÇLP grubunda TUNEL boyamasını destekler şekilde MnPO, SVZ, DG, CA1 ve CA3 alanlarında kaspaz-3 ve transglutaminaz pozitif boyanan apoptotik hücrelerin bulunduğu gözlenmekte iken Gl, AIP, VPPC, AvPE, PeF, DMD, ZI, NTS, Irt ve RVLM gibi TUNEL pozitifliği saptayamadığımız beyin alanlarında kaspaz-3 ve transglutaminaz yöntemiyle de apoptotik hücre bulunmadığı saptandı. Semmler ve ark.'larının (29) sıçanlar üzerinde intraperitoneal olarak LPS vererek yaptıkları sepsis modeli çalışmasında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında LPS verilen grupta korteks, serebellum, hippocampus ve mezensefalon'daki TUNEL pozitif hücre sayısının belirgin bir biçimde artmış olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada LPS sonrası 4, 8 ve 24. saatlerde sıçanlardan elde edilen beyin kesitlerinde TUNEL boyaması yapılmış ve yalnızca 24. saatteki kesitlerde TUNEL pozitifliği açısından LPS verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmiştir. Ayrıca aynı beyin bölgeleri, bax antikoru (apoptozun gösterilmesinde kullanılan bir başka yöntem) ile işaretlenmiş ve LPS verilen grupta TUNEL pozitifliğini destekler şekilde bax immünoaktivitesi açısından kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da, Semmler ve ark.'larınıninkine benzer şekilde ÇLP yapılan gruptaki hippocampus'larda TUNEL pozitif hücre sayısının belirgin bir biçimde artmış olduğu gözlenmekteydi. Fakat bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda, granüler ve agranüler insüler korteks gibi kortikal alanlarda TUNEL pozitifliği açısından kontrol ve ÇLP grupları arasında anlamlı bir farklılık göze çarpmamaktaydı. Hem bizim yaptığımız çalışmada hem de Semmler ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, aynı ağırlıklara (~300gr) sahip benzer tür hayvanlar kullanılmış ve her iki çalışmada da sıçanların beyinleri 24. saatte çıkartılmış olsa da korteksdeki TUNEL pozitif hücre sayısı açısından gözlenen farklılığın muhtemel nedeni bu iki çalışmada farklı sepsis modellerinin kullanılıyor olmasıdır. Semmler ve ark.'ları (29), Bregma'nın 0.20 mm ilerisinden aldıkları beyin kesitlerinde TUNEL pozitifliği açısından kortikal yapıları değerlendirmişler fakat korteksin hangi alanlarından sayım

yaptıklarını net olarak bildirmemişlerdir. Bu seviyeye uyan beyin kesitlerinde primer ve sekonder somatosensoryal alanlara ve cingulat kortekse ek olarak granüler ve agranüler insular korteks de değerlendirilebilmektedir. Bu durum gözönünde bulundurulduğunda Semmler ve ark.'larının (29) yaptıkları çalışmada, granüler ve agranüler kortekste TUNEL pozitif hücrelere rastlanmamış olabileceği gibi tam tersine TUNEL pozitiflik gösteren hücreler sayılarak kortekse ait toplam hücre sayısına eklenmiş de olabilir. Eğer Semmler ve ark.'larının (29) çalışmasında ikinci durum gerçekleşmiş ise yani granüler ve agranüler kortekste TUNEL pozitif hücrelere rastlanmış ise bizim çalışmamızdan farklı bir sonuçla karşılaşılmaktadır. Bizim çalışmamızda, ÇLP grubundaki sıçanlara ait kesitlerin hiçbirinde granüler ya da agranüler kortekste TUNEL pozitif hücreye rastlanmadı. Bu durumun ortaya çıkmasında, hippocampus'e oranla kortikal yapıların, LPS'ye veya sitokinlere karşı daha az duyarlı olması ya da sepsis sonucu ortaya çıkan hipotansiyonun tetiklediği iskemiye karşı hippocampus'un daha duyarlı olması olası nedenler olarak düşünülebilir. Ancak daha önceki yapılmış olan çalışmalara baktığımızda bu olası faktörleri destekleyecek hiçbir literatür verisine rastlanmadı. Aksine Kim ve ark.'larının (557) yaptıkları bir çalışmada, LPS'nin indüklediği nörotoksisiteye duyarlılık açısından sıçan beyinlerindeki bölgesel farklılıklar *in vivo* ve *in vitro* (hücre kültürlerinde) olarak değerlendirilmiş ve mezensefalonda yer alan substantia nigra'nın korteks ve hippocampus'e kıyasla LPS'nin indüklediği nörotoksisiteye daha fazla duyarlı olduğu fakat hippocampus ve korteks arasında LPS nörotoksisitesi açısından herhangi bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda TUNEL pozitifliği açısından kortikal yapılar ile hippocampus arasında gözlenen farklılıkta muhtemelen sepsisle ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisinde rol oynayan birçok farklı mekanizma devreye girmekte ve ortaya çıkan karmaşık olaylar dizisi sonucunda apoptoz açısından bölgesel farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Sepsis sonucunda beyindeki mikroglial aktivasyonda artış gerçekleşmesinin ve buna bağlı olarak aktive olmuş mikroglialardan salınan NO (nitrik oksit) gibi inflamatuvar mediyatörlerin ya da TNF- α ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin komşu nöronlarda apoptoza yol açmasının sepsisli

hastalarda ortaya çıkan ensefalopatik tabloya katkıda bulunduğu düşünülmektedir (15, 18, 21, 23, 24, 29, 71, 364, 393-396, 404, 407, 412-414, 558-577). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda bizim çalışmamızda, apoptotik hücre ölümlerinin daha fazla saptandığı bölgelerde muhtemelen mikrogial aktivasyon da artmış düzeylerdeydi ve bunun neticesinde komşu hücrelerde ortaya çıkan nöronal apoptoza bağlı olarak TUNEL ve kaspaz-3 pozitifliğinde artış gözlenmektedir. Ayrıca bizim çalışmamızda, DG ve SVZ gibi yetişkin memeli beyinlerindeki yeni nöron üretiminin (nörogenesis) gerçekleştiği germinal merkezlerde, artmış düzeylerde TUNEL ve kaspaz-3 pozitifliğine rastlamış olmamız bu bölgelerdeki normal olarak gerçekleşmekte olan apoptotik hücre ölümlerinin sepsis sonrası daha fazla indüklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. SVZ'de üretilen yeni nöronların daha sonrasında rostral göç akımına (RGA) katılarak bulbus olfactorius'a doğru göç ettiği gösterilmiştir (578-581). Fareler ile yapılan çalışmalar neticesinde SVZ'de bilateral olarak hergün 30.000 yeni hücrenin üretildiği hesaplanmış fakat bu hücrelerin ne kadarının RGA'ya katılarak bulbus olfactorius'a göç ettiği ne kadarının ise SVZ'de kalmaya devam ettiği net olarak ortaya konabilmiş değildir (578). Hippocampus'un DG bölgesinde ise SVZ'dekine benzer bir göç yolağı tanımlanabilmiş değildir (578). Bu durumda yeni yapılan hücrelere yer açılabilmesi için eski hücrelerin apoptoz gibi hücre ölüm mekanizmalarıyla ortadan kaldırılması gerekmektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar bu düşünceyi destekler şekilde tarla faresi, laboratuvar faresi ve sıçan gibi kemirgen beyinlerinin SVZ ve DG bölgelerinde yeni nöron üretimine ek olarak apoptozun da gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (581-583). Muhtemelen sepsis sonrası beyin dokusunda ortaya çıkan nöroinflamasyona bağlı olarak bu bölgelerde normal zamanlarda da gerçekleşmekte olan apoptotik hücre ölümleri daha fazla tetiklenmekte ve sonuç olarak artmış düzeylerde TUNEL ve kaspaz-3 pozitifliği ile karşılaşılmaktadır. SVZ, yetişkin beyinlerinde progenitör hücreler açısından önemli bir depo görevi görmekte ve muhtemelen burada yerleşim gösteren nöral kök hücrelerin kullanılması ile nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni açılımlar sağlanabileceği düşünülmektedir. Günümüzde

SVZ-bulbus olfactorius sistemi nöral kök hücre, nörogenezis, genç nöronların migrasyonu ve differansiyasyonu gibi konuların aydınlatılabilmesi açısından gitgide yoğun olarak çalışılan deneysel bir model haline gelmektedir. Literatür verileri tarandığında apoptotik hücre ölümleri açısından SVZ'nin sepsisten ne derece etkilenmiş olduğunu açıklamaya yönelik hayvanlar üzerinde yapılmış olan herhangi bir sepsis modeli çalışmasına rastlanmamaktadır. Bizim çalışmamız, sepsis ilişkili ensefalopati'den SVZ'deki apoptotik hücre ölüm oranlarının nasıl etkilendiğini ortaya koymaya yönelik ilk çalışma olarak göze çarpmaktadır. Laboratuvarımızda, ÇLP modeli kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada, SVZ'deki nörogenezin nasıl etkilendiği aydınlatılmaya çalışılmış ve bu bölgede artmış oranlarda yeni nöron oluşumunun gerçekleştiği yönünde deliller elde edilmiştir (Yayınlanmamış veri). ÇLP sonrası nörogenez açısından sıçan beyinlerindeki SVZ'de gözlenen artışın, apoptotik hücre ölümlerinde gözlenen artışı kompanze etmek için mi gerçekleştiği yoksa artmış nörogeneze uyum sağlamak amacıyla apoptozda mı artış ortaya çıktığı ise gelecekte aydınlatılması gereken bir diğer unsurudur.

Hippocampus, beyindeki diğer birçok bölgeye göre sepsisten etkilenme derecesi yüksek bir beyin dokusu olarak öne çıkmaktadır. Hippocampus'un beyindeki yerleşimine bakıldığında, SİE'nin patofizyolojisinde rol oynadığı düşünülen çözünmüş ligandların (*aromatik aminoasitler ve glutamat gibi*) ve inflamatuvar mediyatörlerin (*TNF- α , IL-1, IL-6 ve NO gibi*), kan ya da beyin omurilik sıvısından hippocampus'a doğru geçiş yapabilecekleri görülmektedir. Hippocampus, zengin kan içeriği ile plexus choroideus'un, BOS açısından da ventriküllerin komşuluğunda yer almakta ve bu özellikleri ile septik durumlar açısından etkilenebilir bir doku konumu arz etmektedir (584). Semmler ve ark.'larının (29) LPS modeli kullanılarak yapmış oldukları deneysel sepsis çalışmasında, LPS'nin indüklediği sistemik inflamatuvar yanıtı karşı hippocampus'un diğer beyin bölgelerine göre daha duyarlı olduğu ve apoptotik hücre ölümlerinde belirgin derecede artış ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu sonuçları destekler şekilde hippocampus'un CA1, CA3, CA3/4 ve DG alanlarında sham ve kontrol

grubuna kıyasla apoptotik hücre ölümlerinde belirgin bir artış saptanmıştır. Hippocampus, limbik sistem yapıları arasında yer almakta ve özellikle kısa süreli hafıza ve uzamsal hafıza olmak üzere bilişsel (kognitif) fonksiyonlarda görev alan anatomik bir yapı olarak göze çarpmaktadır (585-589). LPS injeksiyonu sonucu ortaya çıkan kronik nöro-inflamasyonun, sıçanlarda uzamsal hafızada azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (590). Hafızanın oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülen glutamata ait NMDA reseptörlerinin hippocampus'da yüksek oranlarda bulunduğu saptanmıştır (591, 592). Biegon ve ark.'larının (593) yaptıkları bir çalışmada intrasisternal olarak LPS verilmesinden bir hafta sonra, hippocampus'da aktive olmuş mikrogliya hücrelerinde artış (yaklaşık 2.5 kat) ve NMDA reseptörlerinde aktivasyon azalması olduğu, ayrıca antioksidan tedavinin bu durumu tersine döndürdüğü bildirilmiştir. Rosi ve ark.'larının (594) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada da LPS'nin dördüncü ventrikül içine injeksiyonundan 28 gün sonra hippocampus'un DG, CA3 ve CA4 alanlarında, NMDA-R1 reseptörlerinin sayısında belirgin bir azalmanın meydana geldiği bildirilmektedir. Beyindeki lokal inflamatuvar olayların hafıza ve bilişsel fonksiyonların ayarlanmasında bozukluğa neden olduğunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır. IL-1, IL-2 ve IL-6'nın lokal infüzyonu ile hippocampus'da hafızanın oluşumunda rol oynayan "uzun süreli güçlendirme" (long term potentiation, LTP) fonksiyonunun ve ilgili nöronal platisite işlemlerinin inhibisyona uğradığı bildirilmiştir (595). Sepsis sonucu hippocampus'da inflamatuvar sitokinlerin (*IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi*) artmış seviyelere ulaşması, LPS'nin NMDA reseptörlerinin aktivasyonunda azalmaya yol açması ve hippocampus'daki hücrelerde apoptozun artış göstermesi neticesinde muhtemelen sepsisli hastaların akut dönemlerinde öğrenme ve hafıza ile ilgili problemler ortaya çıkmaktadır. Bu düşünceyi destekler şekilde Shimizu ve ark.'ları (596) tarafından ÇLP modeli kullanılarak yapılan bir sıçan çalışmasında, ÇLP grubundaki hayvanlarda operasyon sonrası 24. saatte pasif kaçma hareketine ilişkin hatırlama yeteneğinde (passive avoidance retention) bozulma meydana geldiği gösterilmiştir. Septik hasarın uzun dönem etkileri olarak ortaya çıkabilen nörolojik ve psikiyatrik problemlerin temelinde de

hippocampus ve prefrontal korteks gibi beyin bölgelerindeki akut dönemde ortaya çıkan ve büyük kısmı geriye dönüşlü olabilecek bu tür hasarlanmaların rol oynadığı düşünülmektedir (18). Yoğun bakım ünitesinde tedavi gördükten sonra taburcu olan sepsisli hastalarda, kognitif fonksiyonların uzun süreli olarak bozulabileceği bildirilmektedir. Sepsisten kurtulmayı başaran bu kişilerde dikkat ve konsantrasyon yeteneğinde azalma, hafızada bozulma, kognitif fonksiyonlarda global bir kayıp, depresif sendromlar ve hayat kalitesinde azalma gibi şikayetler ortaya çıkabilmektedir (597, 598). Genellikle sepsis sonrası ilk bir sene içinde birçok kognitif fonksiyonda kademeli olarak bir düzelmeye meydana gelse de özellikle hafızada tam olarak bir iyileşmenin ortaya çıkmadığı bildirilmektedir (597, 599, 600). ÇLP modeli kullanılarak yapılan hayvan çalışmalarında ÇLP'nin kognitif fonksiyonlar üzerine olan etkisi ortaya konmaya çalışılmıştır (601-606). ÇLP modeli uygulanan ve yaşamayı sürdüren (*kan kültürleri negatif olan, septik süreçten tam olarak çıkmış ve enfeksiyona dair herhangi bir klinik bulgu göstermeyen*) hayvanlarda ÇLP sonrası 10. ve 30. günlerde öğrenme yeteneği, uzamsal hafıza, tehlikeli uyarandan kaçınmaya ya da objelerin tanınmasına ilişkin hafıza gibi kognitif fonksiyonlarda bozulma meydana geldiği bildirilmiştir (602-604, 606). Ayrıca ÇLP sonrasında anksiyete ve depresyon benzeri semptomların da ortaya çıkabileceği bildirilmektedir (605, 606). Hayvan çalışmalarında deneysel bir depresyon modeli olarak kullanılan zorlu yüzme testi (force swimming test) çalışmalarıyla ÇLP grubunda sham grubuna kıyasla depresyon benzeri semptomların belirgin şekilde artmış olduğu ve imipramin gibi antidepresanlar ile bu semptomların azaltılabildiği gösterilmiştir (605, 606). Semmler ve ark.'larının (607) LPS modeli kullanarak sıçanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada LPS verilmesinden 3 ay sonra ışınal-labirent (radial-maze) testiyle değerlendirilen uzamsal (spatial) hafızada bozulmanın olduğu fakat tehlikeli bir uyarandan kaçınmaya ilişkin hafızanın sağlam olduğu gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada hippocampus'un NeuN ile immünohistokimyasal olarak boyanması sonrasında kontrol grubuna göre LPS verilen grupta hippocampus'un CA1 ve CA2 alanlarında mm²'deki nöron sayısında belirgin bir azalmanın olduğu

saptanmıştır (607). Sepsis sonucu bilişsel (kognitif) fonksiyonlarda meydana gelen uzun süreli bozulmanın nörobiyolojik mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değilse de SİE'nin patofizyolojisinde rol oynadığı düşünülen bir takım faktörlerin (*oksidatif stresteki artış, proinflamatuvar sitokinlerin beyindeki artmış düzeyleri, nöron ve glial hücrelerdeki artmış apoptotik hücre ölümleri ve hücresele düzeyde ortaya çıkan mitokondrial fonksiyon bozukluğu gibi*) hipokampus ve prefrontal korteks gibi beynin değişik alanlarında meydana getirdiği hasarlanma sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (607-611). Sepsisten kurtulan bazı hastalarda hafıza gibi kognitif fonksiyonların kalıcı olarak bozulabildiği bildirilmektedir (599, 600). Bu durumun ortaya çıkmasında muhtemelen hipocampus'un geriye dönüşsüz olarak ileri dercede hasarlanmış olması ve bunun sonucunda eskisi gibi fonksiyon görememesi rol oynamaktadır. Bizim çalışmamız da dahil olmak üzere ÇLP yöntemi kullanılarak ya da LPS verilerek yapılmış olan çalışmalarda, hipocampus'daki apoptotik hücre ölümlerini göstermeye yönelik çalışmalar ilk 24 saati kapsamakta fakat 24. saatten sonraki dönemleri kapsayan herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu nedenle ÇLP sonrası hiperdinamik (6-10 saat), hipodinamik (14-24 saat) ya da daha sonraki (>24 saat) evreleri karşılayan zaman dilimlerinde yapılacak olan ÇLP modeli çalışmaları ile hipocampus'da ortaya çıkan apoptozun nasıl bir seyir gösterdiği veya hipocampus'da ortaya çıkan apoptozun derecesi ile kognitif fonksiyonlarda ortaya çıkan bozulma arasında korelasyonun bulunup bulunmadığı gibi konular aydınlatılabilecektir.

Sharshar ve ark.'larının (364) yaptıkları çalışmada, septik şok nedeniyle ölen hastalardan post-mortem olarak beyin dokuları elde edilmiş ve bu beyinlerdeki amigdala, supraoptik nükleus, paraventriküler nükleus ve meduller otonomik nükleuslar gibi kardiyovasküler sistemle ilişkili otonomik merkezlerde ISEL ve kaspaz-3 immünohistokimya boyaması ile nöronal ve glial apoptotik hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmada otonomik merkezlerdeki apoptotik skor ile iskemik skor arasında korelasyon saptanamamış ve bu sebeple beynin bu bölgelerinde meydana gelen apoptozun septik şok sonucu ortaya çıkan iskemi ile açıklanamayacağı

bildirilmiştir (364). Ayrıca bu çalışmada apoptotik skor ile mikroglial TNF- α ekspresyonu arasında korelasyon saptanmaz iken apoptotik skorun beyinde yer alan endotel hücrelerindeki iNOS ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği ve bu durum göz önünde bulundurulduğunda kardiyovasküler otonomik merkezlerde gerçekleşen apoptozun TNF- α 'dan bağımsız bir şekilde beyin parankimindeki artmış NO seviyeleri sonucu indüklendiği gösterilmiştir (364). Semmler ve ark.'larının (29) sıçanlar üzerinde LPS modeli kullanarak yaptıkları çalışmada da apoptotik hücre ölümlerinin artmış olduğu bölgelerde iNOS ekspresyonu gösteren hücre sayısında artış meydana geldiği bildirilmektedir. Semmler ve ark.'larına (29) göre sepsis sonucu beyindeki astrosit ve mikroglial hücrelerde aktivasyon gerçekleşmekte ve daha sonrasında aktive olmuş olan bu hücrelerden salınan NO ile nöronlarda ve mikroglial hücrelerde apoptotik hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Nitrik oksit (NO) sentaz'ın indüklenebilir formu olan iNOS enziminin, sepsis ve SIRS'in patofizyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir. Sepsis sonrasında nöron ve glial hücreler de dahil olmak üzere periferik birçok dokuda iNOS ekspresyonunda artışın olduğu bildirilmiştir (409-411, 563, 564, 567, 612, 613). iNOS enzimi Ca^{+2} 'den bağımsız olarak işlev görmekte ve aktivitesi günlerce sürebilmektedir (614). Bunun sonucunda yüksek miktarlarda üretilen NO'nun, dokularda hasarlanma meydana getirdiği ve hücreleri apoptoza süreklediği bildirilmektedir (29, 412-414, 560, 562, 568, 569, 571). Daha önce yapılan çalışmalarda, NO aracılı apoptotik hücre ölümlerine karşı nöronların belirgin bir biçimde duyarlı olduğu gösterilmiştir (559, 560, 565, 566). Sıçanlardan elde edilmiş nöron ve mikroglial hücrelerin birlikte kullanıldığı *in vitro* kültür çalışmalarında, sitokinler tarafından mikroglial hücrelerin aktive edilmesi sonrasında aktive olmuş bu hücrelerden artmış düzeylerde NO üretiminin gerçekleştiği ve bunun sonucunda ise nöronların hızla apoptoza süreklediği görülmektedir (412-414, 560). LPS'nin tek başına veya IFN- γ ile birlikte sıçan hippocampus'larına injeksiyonu sonrasında ya da hayvanlarda oluşturulan deneysel sepsis model çalışmalarında iNOS ekspresyonundaki artışın nöronal apoptozda artışa yol açtığı gösterilmiştir (29, 568, 569). Bunun tersi olarak L-NNA gibi iNOS inhibitörleri ile NO

üretimini engellenmesi sonucu nöronlardaki artmış düzeylerdeki apoptotik hücre ölümleri azaltılabilmektedir (568). NO'ya maruz kalan nöronların nasıl olupta apoptoza süreklediğine ilişkin değişik mekanizmalar ileri sürülmektedir. Hippocampus'dan elde edilmiş nöronların NO'ya maruz bırakılması sonrasında bu nöronlarda anti-apoptotik bir protein olan bcl-2'nin azaldığı fakat pro-apoptotik bir protein olan bax'ın ise arttığı ve bu sayede sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımındaki artışa bağlı olarak apoptozun intrinsik yolunun aktive olduğu düşünülmektedir (615-617) . Ayrıca iNOS enzimi, NO oluşumu sırasında yan ürün olarak süperoksit anyonu oluşumuna da yol açmakta ve bu durum ise beyindeki oksidatif stresin artışına neden olarak muhtemelen nöronlarda apoptozu indüklemektedir (393, 394). Glial hücrelerdeki arjininosüksinat sentaz ve iNOS aktivitelerindeki artış sonucunda yüksek konsantrasyonlara ulaşan NO'nun mitokondriden enerji üretimini engellediği bildirilmiştir. NO'nun bu etkisini muhtemelen sitokrom-c'nin O₂'ye olan afinitesini azaltarak yaptığı düşünülmektedir. Buna ek olarak NO'nun sitokrom-c gibi hem grubu içeren enzimleri inhibe edebildiği gösterilmiştir (397). Sitokrom-c'nin inhibisyonu sonucunda mitokondri membran potansiyelindeki azalmaya bağlı olarak sitokrom-c'nin mitokondriden salınımında artış meydana geldiği ve sitokrom-c'nin sitoplazmaya çıkması sonucunda ise kaspaz 9'u aktive ederek hücreyi apoptoza götürdüğü bildirilmektedir (352, 415-417). SİE'li hastalarda beyindeki artmış NO seviyelerine bağlı olarak NO'dan peroksinitrit oluşumunun arttığı ve artmış peroksinitrit konsantrasyonu neticesinde ise beyin dokusundaki oksidatif strese artış meydana geldiği gösterilmiştir (151). Peroksinitritin artmış seviyeleri DNA'yı, hücresel proteinleri ve hücre membranındaki lipidleri oksitleyebilmekte ve bu sayede hücrede toksik etkiler meydana getirebilmektedir. Peroksinitrit'in mitokondriyal elektron transport zincirinde yer alan kompleks I, II ve V'i inhibe edici etkisi de bulunmaktadır. Bunlara ek olarak peroksinitritin okside olması vücut için en toksik serbest radikal olan OH⁻ (hidroksil radikali) oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Peroksinitritin oluşturduğu tüm bu etkiler neticesinde apoptozun intrinsik yolunu aktive ettiği ve bu sayede hücreleri apoptoza sürüklediği

düşünülmektedir (23, 151, 352, 419, 420). Sharshar ve ark.'larının (364) post-mortem olarak yaptıkları çalışma ile otonomik merkezlerde gerçekleşen nöronal ve glial apoptotik hücre ölümlerinde NO'nun öneminin ortaya konmuş olması; sepsisli hastalarda ortaya çıkan ensefalopatik tabloda NO'nun önemli bir rol oynayabileceğini ve beyindeki artmış NO seviyelerini azaltmaya yönelik stratejiler (L-NNA, L-NMA, L-NIL ve L-NIO gibi spesifik iNOS inhibitörlerinin verilmesi) ile bu hastalarda ortaya çıkan ensefalopatik tablonun ve bunun sonucunda da mortalite oranlarının azaltılabileceği düşünülmektedir (29, 364). Otonom merkezlerdeki anatomik ve fizyolojik anomalilerin kardiyovasküler homeostazisin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak otonom merkezlerde meydana gelen bu lezyonların septik şoklu hastalarda ortaya çıkan tedaviye dirençli hipotansiyona katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (407). Bu açıdan bakıldığında kardiyovasküler otonomik merkezlerde gerçekleşen apoptozun önlenmesi muhtemelen bu hastaların hemodinamik parametrelerine olumlu yönde katkıda bulunacaktır.

Bizim çalışmamızda TUNEL ve kaspaz-3 yöntemiyle apoptoz saptanan hücrelerin nöron mu yoksa glial kökenli mi olduğunun ayırt edilmesinde hücrelere ait morfolojik karakteristikler kullanılmış iken Semmler ve ark.'larının (29) yaptıkları çalışmada ise hücre morfolojisine ek olarak TUNEL yöntemiyle eş zamanlı olarak NeuN boyaması (nöronlara özgü olduğu düşünülen immünohistokimya boyaması) da yapılmış ve bunun sonucunda apoptoza giden hücrelerin yaklaşık olarak %15'inin nöron, geri kalan hücrelerin büyük bir kısmının ise mikroglial hücreler olduğu gösterilmiştir (29). Bu çalışmada ilginç bir şekilde mikroglial aktivasyonun saptandığı alanlarda eş zamanlı olarak mikroglial apoptozun da artış gösterdiği bildirilmektedir. Sepsis sonucu beyinde gerçekleşen nöroinflamasyona bağlı olarak apoptotik hücre ölümlerinin yalnızca nöronlarda indüklenmeyip mikroglial hücrelerde de indüklenmesi muhtemelen beynin kendisini korumaya yönelik bir mekanizma olarak devreye girmekte ve apoptozla ortadan kaldırılan mikroglialların daha fazla aktive olması ve bunun neticesinde nöronal apoptozun artışı engellenebilmektedir.

Chan ve ark.'larının (407) sıçanlar üzerinde intraperitoneal olarak LPS vererek yaptıkları sepsis modeli çalışmasında, LPS verilen sıçanlarda yükselmiş NO konsantrasyonlarına bağlı olarak rostral ventrolateral medullada (RVLM) yer alan sempatik premotor nöronlarda apoptotik hücre ölümlerinin gerçekleştiği ve RVLM'deki artmış apoptoz sonrasında ise sempatik vazomotor deşarjdaki azalmaya bağlı olarak arteriyel kan basıncında düşüş ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada ise RVLM'deki apoptotik hücre ölümlerinin yansıtan TUNEL ve kaspaz-3 pozitifliğinde herhangi bir değişiklik göze çarpmamaktaydı. Bizim yaptığımız çalışmada, Chan ve ark.'larının (407) kullandıkları LPS modelinden farklı bir sepsis modeli kullanılmış ve bunun neticesinde iki model arasında kan sitokin seviyeleri ve hemodinamik parametreler açısından gözlenen farklılık muhtemelen RVLM'de apoptoz oranları açısından gözlenen farklılığa yol açmaktadır.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada ÇLP grubunda yer alan sıçanların MnPO nükleuslarındaki hücrelerde apoptozun artmış oranlarda gerçekleştiği gösterildi. MnPO nükleusu, hipotalamusta yerleşim göstermekte olup santral otonomik merkezler arasında kabul edilmekte ve bu nükleusa ait lezyonlar neticesinde hemodinamide ve termoregülasyonda bozulma ortaya çıkabilmektedir (553). Bizim çalışmamızdaki ÇLP sonrası MnPO'da ortaya çıkan apoptotik hücre ölümlerinin, sepsiste gözlenen kan basıncı, kalp atım hızı ve rektal ısı parametrelerinde meydana gelen değişikliklere katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Sepsis sonucu kandaki artmış seviyelerde seyreden sitokinler, sirkümventriküler organlar gibi kan-beyin bariyerinin bulunmadığı yerlerden beyin parankimine geçiş yapabilmektedir (21). Buna ek olarak hipotalamusta, kandaki sitokinlere bağlanabilen özel sitokin taşıyıcılarının yer aldığı ve bu sayede sitokinlerin hipotalamus içine geçiş yapabildiği gösterilmiştir (618, 619). Hipotalamusta yerleşim gösteren sitokin taşıyıcılarının engellenmesi ile LPS tarafından indüklenen ateş oluşum mekanizmasının sekteye uğratılabildiği bildirilmektedir (618-621). Bu açıdan bakıldığında bizim yaptığımız çalışmada vücut ısısının düzenlenmesinde görev alan bir hipotalamik nükleusta (MnPO'da) artmış miktarlarda apoptotik

hücre ölümleri ile karşılaşılıyor olmamızda muhtemelen ÇLP sonrası kandaki seviyeleri artan sitokinlerin, sitokin taşıyıcılarını kullanarak MnPO'da birikim göstermeleri ve bunu takiben nöron ve glial hücrelerde apoptozu daha yoğun bir şekilde indüklemeleri rol oynuyor olabilir. Daha önce yapılmış olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda TNF- α ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin, nöronların da içinde yer aldığı pek çok hücre tipinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (622-625). Sharshar ve ark.'larının (364) insanlar üzerinde post-mortem olarak yapmış oldukları çalışmada, hipotalamusa ait paraventriküler ve supraoptik nükleuslarda gerçekleşen apoptotik hücre ölümlerinin TNF- α 'dan bağımsız bir şekilde NO aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiş olsa da sıçanlardaki MnPO'da gerçekleşen apoptozda tam tersi olarak TNF- α rol oynuyor olabilir ya da TNF- α dışında apoptozu indüklediği bilinen diğer sitokinlerin (IL-1 ve IL-6 gibi) MnPO'daki artmış düzeyleri bu nükleustaki nöron ve glial hücreleri apoptoza sürüklüyor olabilir. Hipotamustaki apoptotik hücre ölümleri saptanan nükleuslarda, apoptozun hangi mekanizmalarla gerçekleştiğini ortaya koyabilmek için ya da bu nükleuslar arasında apoptotik hücre ölümleri açısından gözlenen farklılığa açıklık getirebilmek için histolojik (*hücrelerdeki iNOS, bax ve bcl-2 immünoreaktivitesinin gösterilmesi gibi*) ya da moleküler (*NO, sitokin ve sitokin taşıyıcılarına ait mRNA ekspresyon seviyelerinin ortaya konması gibi*) düzeylerde yapılacak olan daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

SONUÇ

Genel Bir Bakış

Sepsis insidansının, yoğun bakım ünitelerindeki teknik gelişmelere ve infeksiyöz hastalıkların tedavisindeki ilerlemelere rağmen artış göstermeye devam ettiği görülmektedir (3, 48). Sepsiste ortaya çıkan sistemik inflamatuvar yanıt neticesinde organlarda fonksiyon bozukları gelişebilmekte ve hastalık süreci ciddi sepsis, septik şok ve en sonunda MODS gelişimine kadar ilerleyebilmektedir (140, 141). Septik şoklu hastalarda ortaya çıkan dirençli hipotansiyon ve MODS gelişmesi sonucu birçok organda ortaya çıkan yetmezlik tablosu, sepsisteki ölümlerin ana nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (156). Sepsiste ortaya çıkan patofizyolojik sürecin septik şok ve MODS'a kadar ilerlemiş olduğu durumlarda mortalite oranları %70-80 gibi yüksek değerlerde bildirilmektedir (7, 164). Bu nedenle sepsisin erken evrelerinde uygulanacak tedavi yöntemleriyle sepsisli hastalarda MODS gelişiminin engellenmesi hayati önem taşımaktadır. Bu amaca yönelik olarak deneysel sepsis modeli (*intravenöz yoldan lipopolisakkarid veya canlı bakteri verilmesi gibi*) çalışmaları dikkate alınarak geliştirilen tedavi yöntemlerinin, sepsisli hastalar üzerinde yapılan geniş çaplı ve çok merkezli klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar vermemesi hatta çoğu kez mortalite oranlarında artışa yol açması; ÇLP dışındaki diğer sepsis modellerinin sepsisli hastalardaki klinik sepsisi tam olarak yansıtamadığını göstermektedir (184, 185, 187, 201, 202). Diğer deneysel sepsis modellerine kıyasla ÇLP modelinin insanlardaki klinik sepsisle daha uyumlu olduğu düşünülmekte fakat bu konuya açıklık getirmek amacıyla Brooks ve ark.'larının (430) yaptıkları çalışma dışında geniş çaplı olarak planlanmış bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu sebeple yapmış olduğumuz bu çalışmada, ÇLP'nin temel karakteristik özelliklerinin anlaşılabilmesi ve insanlardaki klinik sepsisi ne derece yansıtabildiğinin ortaya konabilmesi amacıyla; ÇLP'nin klinik ve laparotomik bulgular, nörolojik değerlendirme bulguları, mortalite oranları, beyin elektriksel aktivitesi, kan kültürü, hemogram, serum laktat seviyesi, kan basıncı, kalp atım hızı ve rektal ısı gibi parametreler üzerine olan etkisi

değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin diğer sepsis modelleri ile yapılacak olan karşılaştırmalarda değerli bir referans noktası oluşturacağını düşünmekteyiz. Ayrıca ÇLP sonucu beyin değişik bölgelerinde apoptotik hücre ölümleri açısından ortaya çıkan artışın TUNEL, kaspaz-3 ve transglutaminaz immonohistokimyasal boyama yöntemleriyle gösterilmiş olması; SİE'nin patofizyolojisinde apoptotik hücre ölümlerinin de rol oynayabileceğine ilişkin önemli ipuçları sağlamıştır.

Bir Klinik Sepsis ve SİE Modeli Olarak ÇLP

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, sıçanlarda uygulanan ÇLP modelinin yaklaşık olarak 24 saatlik dönem açısından sepsisli hastalarda ortaya çıkan klinik sepsis tablosuna benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. ÇLP yapılan hayvanlarda ÇLP sonrası 24. saatte hipotansiyon, taşikardi, letarji (azalmış motor aktivite), bakteriyemi, lökositopeni, trombositopeni ve hiperlaktatemi'nin görülüyor olması; ÇLP modelinin insanlarda gelişen klinik sepsis bulgularını iyi bir şekilde karşılayabildiğini göstermektedir. Bu bulguların hiçbirinin sham ya da kontrol grubunda gözlenmemiş olması nedeniyle ileriye yönelik planlanacak çalışmalar açısından sham grubuna ek olarak kontrol grubunun kullanılmasına ya da her iki grubun birlikte kullanılmasına gerek olmadığı ve bu sayede kullanılacak hayvan sayısının azaltılabilesinin mümkün olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde deneysel bir sepsis modeli kullanılarak yapılmış olan herhangi bir beyin elektriksel aktivitesi çalışmasına (*ECoG, EEG ve SEP gibi*) rastlanmamaktadır. Bu açıdan SEP ve ECoG kayıtlarından elde ettiğimiz veriler septik hayvan çalışmaları açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışma neticesinde beyin elektriksel aktivite kayıtları ve nörolojik değerlendirme sonuçları kullanılarak ÇLP modeli uygulanan sıçanlarda MODS'un bir komponenti olarak SİE'nin gelişebildiği yönünde klinik ve elektrofizyolojik deliller ortaya konmuştur. ÇLP grubundan elde edilmiş ECoG ve SEP kayıtlarına ilişkin bulguların sepsisli hastalarda görülen bulgulara benzerlik göstermesi, ECoG ya da SEP bulguları göz önünde bulundurulduğunda bizim çalışmamızdaki %40'lık SİE gelişme oranının,

sepsisli hastalarda bildirilen oranlar ile benzerlik göstermesi; ÇLP'nin SİE açısından da klinik sepsis tablosunu iyi bir şekilde yansıttığını düşündürmektedir. Bu çalışmadan elde edilen ECoG ve SEP bulguları neticesinde; ÇLP modeli uygulanan tüm hayvanlarda 24. saatte SİE bulgularının gelişmeyebileceğini ve ÇLP uygulanan tüm hayvanlarda SİE geliştiği varsayımına dayalı deneysel dizaynların yeterli olamayabileceğini, gelecekte yapılması planlanacak olan SİE'ye ilişkin beyin çalışmalarında nörolojik değerlendirmenin yanısıra ECoG ve SEP bulguları ile SİE geliştiği düşünülen hayvanların deney grubuna dahil edilmesi neticesinde daha doğru sonuçlar ve yorumlar elde etmenin mümkün olabileceği görülmektedir.

Sonuç olarak mevcut çalışmadan elde edilen veriler ışığında ÇLP modelinin, diğer noninvaziv sepsis modellerinden daha agresif ve daha uzun süreli bir yöntem olmasına karşın bir çok parametre açısından klinik sepsis ve SİE ile benzerlik göstermesi nedeniyle sepsis patofizyolojisini açıklamaya ya da yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda, deneysel bir sepsis modeli olarak tercih edilmesinin uygun bir yaklaşım olacağına dair deliller ortaya konmuştur.

ÇLP ve Beynin Değişik Bölgelerinde Ortaya Çıkan Apoptotik Hücre Ölümleri

SİE'nin patofizyolojisi günümüzde tam olarak anlaşılabilmiş değilse de oluşum mekanizmasının mültifaktöriyel olduğu düşünülmektedir (21). Daha önce yapılmış kısıtlı sayıdaki sepsis çalışması dikkate alındığında apoptotik hücre ölümlerinin, SİE'nin patofizyolojisinde rol oynayabileceği dair bilgiler elde edilmiştir (27-29). SİE sonucu beyinde ortaya çıkan apoptotik değişikliklerin araştırılmasında kullanılan çalışmaların tamamına yakını LPS modeli kullanılarak yapılmış olup ÇLP modelinin kullanıldığı yalnız bir çalışmaya rastlanmaktadır (28). SİE'nin, subventriküler bölge (SVZ) ve gyrus dentatus (DG) gibi yetişkin beyinlerinde yeni nöron üretiminin (nörogenez) gerçekleştiği yerlerde ve santral otonomik merkezlerde meydana getirdiği apoptotik değişikliklerin daha önceden ÇLP modeli kullanılarak incelenmemiş olması nedeniyle bizim çalışmamızda bu bölgelerdeki apoptotik hücre

değişiklikleri TUNEL, kaspaz-3 ve transglutaminaz immünohistokimya yöntemleriyle ortaya konmaya çalışıldı. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar neticesinde, ÇLP grubuna ait histolojik kesitlerde MnPO, SVZ, DG, CA1, CA3 ve CA3/4 alanlarında TUNEL pozitif boyanmış hücre sayısı açısından belirgin bir artış gözlemlendi. TUNEL boyamasında, kullanılan yöntem sonucu nekrotik hücrelerde de yanlış pozitiflik saptanabilmekte ve bu sebeple TUNEL immünohistokimya sonuçlarının başka bir apoptoz saptama yöntemiyle doğrulanmasının uygun bir yaklaşım olacağı bildirilmektedir. Bu amaçla bizim çalışmamızda da TUNEL boyamasına ek olarak kaspaz-3 ve transglutaminaz immünohistokimya boyamaları yapılmış ve TUNEL pozitifliğini destekler şekilde MnPO, SVZ, DG, CA1 ve CA3 alanlarında apoptotik hücre ölümlerindeki artışı doğrulayan kaspaz-3 ve transglutaminaz pozitifliğinde artış saptanmıştır.

Bu çalışmadaki ÇLP sonrasında, santral otonomik merkezlerden biri olarak kabul edilen MnPO nükleusunda ortaya çıkan apoptotik hücre ölümlerinin, sepsiste gözlenen kan basıncı, kalp atım hızı ve rektal ısı parametrelerinde meydana gelen değişikliklere katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Kardiyovasküler otonomik merkezlerde gerçekleşen apoptozun M-791, Z-VAD.fmk, M-867 ve M-826 gibi kaspaz inhibitörleri kullanılarak engellenmeye çalışılması muhtemelen bu hastaların hemodinamik parametrelerine olumlu yönde katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Daha önce yapılmış hayvan çalışmalarıyla sıçan gibi kemirgen beyinlerinin SVZ ve DG bölgelerinde yeni nöron üretimine ek olarak apoptozun da gerçekleştiğini gösterilmiştir (584-587). Bizim çalışmamızda ÇLP grubundaki hayvanlarda SVZ ve DG bölgelerinde artmış düzeylerde TUNEL ve kaspaz-3 pozitifliğinin saptanmış olması, muhtemelen ÇLP sonrası beyin dokusunda ortaya çıkan nöroinflamasyona bağlı olarak bu bölgelerde normal zamanlarda da gerçekleşmekte olan apoptotik hücre ölümleri daha fazla tetiklenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

ÇLP modeli'nin, sıçanlarda operasyon sonrası 24. saatteki pasif kaçma hareketine ilişkin hatırlama yeteneğinde (passive avoidance

retention) bozulmaya yol açtığını ve ÇLP sonrası 10. ve 30. günlerde kognitif fonksiyonlarda daha uzun süreli bir bozulmanın ortaya çıktığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (596, 602, 603, 604, 606). Ayrıca sepsisten kurtulan hastalarda uzun süreli kognitif fonksiyon bozukları gelişebilmekte ve ilk bir sene içinde çoğu bulgu gerilese de hafıza fonksiyonunun tam olarak geriye dönemediği bildirilmektedir (597, 599, 600). Sepsisin kognitif fonksiyonlar üzerinde bu tür kalıcı etkilerinin ortaya çıkmasında SİE'nin patofizyolojisinde rol oynayan akut dönemdeki olayların, geriye dönüşsüz olarak hippocampus'da kalıcı hasarlanma oluşturmaya ve gyrus dentatus'ta üretilen yeni nöronların, sinir ağına (nöronal network'a) katılamayarak fonksiyonel olarak işlev görememesine bağlanmıştır. Mevcut çalışma, ÇLP uygulanan sıçanlarda incelenen tüm hipokampal bölgelerde anlamlı düzeyde apoptotik hücre artışının gerçekleştiğini göstererek, sepsis ve SİE sonrası öğrenme ve hafızayla ilgili kognitif (bilişsel) fonksiyonlardaki bozulmanın patofizyolojisine ışık tutmaktadır.

Çalışmadan Elde Edilen Bulguların Getirdiği Açılımlar

1- Bu çalışmayla ÇLP modeli'nin diğer birçok sepsis modeline (*LPS modeli ve bakteriyel infüzyon modeli gibi*) göre insanlardaki klinik sepsisi daha iyi bir şekilde taklit edebildiği anlaşılmış olsa da yöntem gereği çekumdan periton içine feçes içeriği yavaş bir şekilde sızmakta ve bunun neticesinde sepsisli hastalarda ortaya çıkan hiperdinamik ve hipodinamik fazın tam olarak gözlenebilmesi için 14-24 saat gibi göreceli olarak uzun bir zaman dilimi gerekmektedir. Ayrıca bu çalışmada laparotomi bulgularıyla lokalize bir peritonit tablosunun geliştiği anlaşılmış olup jenarilize peritonit çalışmaları için uygun bir model olmadığı anlaşılmıştır. CASP modeli, deneysel sepsis modeli çalışmalarında kullanılan bir diğer peritonit modeli olup çekuma takılan stent vasıtasıyla sürekli olarak sızan fekal içerik sayesinde jenarilize peritonit tablosuna yol açılması sağlanmaktadır (175). ÇLP ve CASP yöntemi arasındaki farklılıkları birçok parametreyi de içine alacak şekilde karşılaştırmaya yönelik gelecekte planlanacak olan yeni çalışmalar ile hangi

modelin klinik sepsisi daha iyi bir şekilde yansıttığına ilişkin önemli veriler sağlanabilecektir.

2- Bu çalışmada nörolojik değerlendirme amacıyla Kadoi ve ark.'larının (431) kullanmış oldukları bir skorlama sistemi kullanılmıştır. Kullanmış olduğumuz bu nörolojik değerlendirme yöntemi, sepsisli hastalarda yapılan nörolojik muayeneye göre birçok açıdan (kas gücü muayenesi, duyu muayenesi ve kranial sinirlerin tutulumunun değerlendirilmesi gibi) yetersiz kalmaktadır. Sıçan gibi kemirgenlerde nörolojik değerlendirme açısından daha kapsamlı veriler sağlayacak yeni skorlama sistemlerinin geliştirilmesiyle ÇLP modeli sonrası ortaya çıkan SİE'nin klinik açıdan daha iyi bir şekilde değerlendirilmesi mümkün olabilecektir.

3- Yapmış olduğumuz bu çalışma; ÇLP modelinin, beyin elektriksel aktivitesi üzerine olan etkilerini ortaya koymaya yönelik ilk çalışma olarak göze çarpmaktadır. Bu sebeple bizim çalışmamızdaki ECoG ve SEP kayıtlarından elde ettiğimiz verilerin doğrulanması açısından daha fazla sayıda hayvanın kullanıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

4- Bizim çalışmamız da dahil olmak üzere ÇLP yöntemi kullanılarak ya da LPS verilerek yapılmış olan deneysel sepsis modeli çalışmalarında, hippocampus'daki apoptoz açısından ortaya çıkan değişiklikler ilk 24 saati kapsamakta olup 24. saatten sonraki dönemleri kapsayan herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu nedenle ÇLP sonrası hiperdinamik (6-10 saat), hipodinamik (14-24 saat) ve daha sonraki (>24 saat) evreleri karşılayan zaman dilimlerinde yapılacak olan ÇLP modeli çalışmaları ile hippocampus'da ortaya çıkan apoptozun nasıl bir seyir gösterdiği anlaşılabilir.

5- ÇLP modelinin, hafıza ve öğrenme gibi kognitif fonksiyonlar üzerindeki etkilerini ortaya koymaya yönelik çalışmaların oldukça kısıtlı sayıda olduğu görülmekte ve ÇLP sonrası 30. günden sonrasını kapsayan davranış modeli çalışmalarına rastlanmamaktadır. Bu sebeple ÇLP'nin beyinde oluşturduğu uzun dönem etkileri ortaya koymaya yönelik yeni davranış çalışmalarına

ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca hippocampus'da ortaya çıkan apoptozun derecesi ile kognitif fonksiyonlarda ortaya çıkan bozulma arasında korelasyonun bulunup bulunmadığına ilişkin eş zamanlı olarak yapılmış çalışmalara rastlanmamaktadır. Bu nedenle apoptotik hücre ölümlerini inceleyen çalışmaların, davranış modeli çalışmalarıyla birlikte yapılması ile hippocampus'da ortaya çıkan apoptotik hücre ölümlerinin sepsisteki kongenitif fonksiyon bozukluklarında ne derece etkili olduğu anlaşılacaktır.

6- Yapmış olduğumuz bu çalışmadaki SEP kayıtları yalnızca primer somatosensoriyal korteksten alınmış olduğu için kortikal ve subkortikal yolların veya periferik sinirlerin yapısal ve fonksiyonel durumu hakkında tek tek bilgi sahibi olmak ya da sepsisle ilişkili ensefalopatiden bu yapıların herbirinin hangi derecelerde etkilenmiş olduğunu ortaya koymak mümkün olmamıştır. Bizim çalışmamızdaki SEP kayıtlarında gözlediğimiz değişiklikler muhtemelen yukarıda bahsi geçen SEP yollarının tek tek etkilenebileceği gibi birden fazla yolağın birlikte etkilenmiş olmasından kaynaklanabilir. ÇLP yapılan hayvanlarda n. ischiadicus gibi periferik sinirler üzerinden yapılacak olan sinir ileti hızı çalışmaları ile periferik sinirlerin değerlendirilmesi ya da kuyruğa verilen uyarı sonrası kortikal SEP yollarının değerlendirilmesi amacı ile her iki taraf primer somatosensoriyal korteksten elde edilen SEP kayıtları arasındaki farkın ortaya konması ve mevcut çalışmada SEP kayıtlarında gözlenen değişikliklerin temel nedeninin aydınlatılabilmesi mümkündür.

7- SİE'nin eşlik ettiği sepsisli hastalarda mortalite oranlarının belirgin bir biçimde artmış olduğu görülmektedir. Bu sebeple SİE'de ortaya çıkan patofizyolojik değişikliklerin engellenmesi ile mortalite açısından yüz güldürücü sonuçların alınabileceği öngörülmektedir. Bizim yaptığımız çalışmayla SİE'deki patofizyolojik değişikliklerde en azından SVZ, DG, CA1, CA3 ve MNPO alanları için apoptotik hücre ölümlerinin rol oynayabileceğine ilişkin önemli deliller elde edilmiştir. Bu sebeple apoptotik hücre ölümlerinin engellenmesini sağlayan bir takım farmakolojik ajanların (*M-791*, *Z-VAD.fmk*, *M-867* ve *M-826 gibi*) verilerek yapıldığı ÇLP modeli çalışmalarıyla, apoptotik

hücre ölümlerinin SİE'nin patogeneğinde gerçekten de rol oynayıp oynamadığı anlaşılabilmesi ve buna ek olarak sepsisli hastalarda bu ilaçların kullanılmasıyla SİE'de ortaya çıkan yüksek mortalitenin azaltılıp azaltılamıyacağına ilişkin ön veriler elde edilebilmesi mümkündür.

KAYNAKLAR

- 1- Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-69.
- 2- Balk RA. Severe sepsis and septic shock: definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin* 2000;16:179-92.
- 3- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
- 4- Bone RC, Balk RA, Cerra FB. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-55
- 5- Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol* 2008;214:211-23.
- 6- van der Poll T, van Deventer SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:413-26.
- 7- Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207-14.
- 8- Wenzel RP, Pinsky MR, Ulevitch RJ, Young L. Current understanding of sepsis. *Clin Infect Dis* 1996;22:407-12.
- 9- Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998;26:2078-86.
- 10- Vincent JL, Abraham E, Annane D, et al. Reducing mortality in sepsis: New directions. *Crit Care* 2002;6:1-18.
- 11- Padkin A, Golgfrad C, Brady AR, et al. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med* 2003;31:2332-8.
- 12- Brun-Buisson C, Meshaka P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French ICUs. *Intensive Care Med* 2004;30:580-8.
- 13- Picard KM, O'Donoghue SC, Young-Kershaw DA, Russell KJ. Development and implementation of a multidisciplinary sepsis protocol. *Crit Care Nurse* 2006;26:43-53.
- 14- Sands KE, Bates DW, Lanken PN, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *Jama* 1997;278:234-40.
- 15- Wilson JX, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Neurol J Southeast Asia* 2003;8:65-76.
- 16- Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, et al. Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med* 1990;18:801-6.
- 17- Young GB, Bolton CF, Austin TW, et al. The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med* 1990;13:297-304.
- 18- Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, et al. Pathophysiology of septic encephalopathy: A review. *Crit Care Med* 2000; 28: 3019-24.

- 19- Eggers V, Schilling A, Kox WJ, Spies C. Septic encephalopathy. Diagnosis and therapy. *Anaesthesist* 2003;52:294-303.
- 20- Straver JS, Keunen RWM, Stam CJ, et al. Nonlinear analysis of EEG in septic encephalopathy. *Neurol Res* 1998;20:100–6
- 21- Consales G, Gaudio AR. Sepsis associated encephalopathy. *Minerva Anesthesiol* 2005;71:39-52.
- 22- Guerra-Romero L, Tureen JH, et al. Amino acids in cerebrospinal and brain interstitial fluid in experimental pneumococcal meningitis. *Pediatr Res* 1993;33:510-3.
- 23- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996;271:1424–37.
- 24- Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6:79–88.
- 25- Papadopoulos MC, Lamb FJ, Moss RF, et al. Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex. *Clin Sci* 1999;96:461-6.
- 26- Davies DC. Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. *J Anat* 2002;200:639-46.
- 27- Gray F, Sharshar T, De La Grandmaison GL, Annane D. Neuropathology of septic shock. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002;28:159.
- 28- Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, et al. Time-dependent mitochondrial mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:1764-70.
- 29- Semmler A, Okulla T, Sastre M, et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neu* 2005;30:144-57.
- 30- Ari I, Kafa IM, Kurt MA. Perimicrovascular edema in the frontal cortex in a rat model of intraperitoneal sepsis. *Exp Neurol* 2006;198:242-9
- 31- Kafa IM, Ari I, Kurt MA. The peri-microvascular edema in hippocampal CA1 area in a rat model of sepsis. *Neuropathology* 2007;27:213-20.
- 32- Tighe D, Moss R, Boghossian S et al. Multi-organ damage resulting from experimental faecal peritonitis. *Clin Sci* 1989;76:269-76
- 33- Tighe D, Moss R, Hynd J, et al. Pretreatment with pentoxifylline improves the hemodynamic and histologic changes and decreases neutrophil adhesiveness in a pig fecal peritonitis model. *Crit Care Med* 1990;18:243-4.
- 34- Deng X, Wang X, Andersson R. Endothelial barrier resistance in multiple organs after septic and nonseptic challenges in the rat. *J Appl Physiol* 1995;78:2052-61.
- 35- Costa EL, Schettino IA, Schettino GP. The lung in sepsis: guilty or innocent? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006;6:213-6.
- 36- Guo RF, Ward PA. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1991-2002.
- 37- Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation* 2007;116:793-802.
- 38- Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 2007;35:1599-608.

- 39- Vandijck DM, Reynvoet E, Blot SI, et al. Severe infection, sepsis and acute kidney injury. *Acta Clin Belg Suppl* 2007;2:332-6.
- 40- Langenberg C, Bagshaw SM, May CN, Bellomo R. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. *Crit Care* 2008;12:R38.
- 41- Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med* 1997;25:372-74.
- 42- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-6.
- 43- Brili RJ, Goldstein B. Pediatric sepsis definitions: Past, present, and future. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:6-8.
- 44- Marshall JC. Sepsis research: where have we gone wrong? *Critical Care and Resuscitation* 2006;8:241-3.
- 45- Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, et al. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Critical Care* 2004;8:409-13.
- 46- Riedemann NC, Guo R-F, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112:460-7.
- 47- Tsiotou AG, Sakorafos GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 2005;11:76-85.
- 48- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
- 49- Rangel-Frausto M, Pitet D, Costigan M, et al. The natural history of the systematic inflammatory response syndrome. *Jama* 1995;273:117-23.
- 50- Finfer S, Bellomo R, Lipman J, et al. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30:589-96.
- 51- Flaatten H. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. *Crit Care* 2004;8:180-4.
- 52- Silva E, de Almedio Pedro M, Sogayar ACB, et al. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). *Crit Care* 2004;8:251-60.
- 53- van Gestel A, Bakker J, Veraart CPWM, van Hout BA. Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Crit Care* 2004;8:153-62.
- 54- Dombrovskiy VJ, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Facing the challenge: Decreasing case fatality rates in severe sepsis despite increasing hospitalizations. *Crit Care Med* 2005;33:2555-62.
- 55- Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, et al. Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest* 2005;127:942-51.
- 56- Sundararajan V, Maclsaac CM, Presneill JJ, et al. Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. *Crit Care Med* 2005;33:71-6.
- 57- Zahorec R, Firment J, Strakova J, et al. Epidemiology of severe sepsis in intensive care units in the Slovak Republic. *Infection* 2005;33:122-8.

- 58- Esper AM, Moss M, Lewis CA, et al. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med* 2006;34:2576-82.
- 59- Haug JB, Harthug S, Kalager T, et al. Blood-stream infections at a Norwegian university hospital, 1974-1979 and 1988-1989: changing etiology, clinical features, and outcome. *Clin Infect Dis* 1994;19:246-56.
- 60- Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:165-72.
- 61- Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 2006;34:15-21.
- 62- Kieft H, Hoepelman AI, Zhou W, et al. The sepsis syndrome in a Dutch university hospital. Clinical observations. *Arch Intern Med* 1993;153:2241-7.
- 63- Uzun O, Akalin HE, Hayran M, Unal S. Factors influencing prognosis in bacteremia due to gram-negative organisms: evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital. *Clin Infect Dis* 1992;15:866-73.
- 64- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors and outcome of severe sepsis and septic shock in adults: a multicentre prospective study in intensive care units. *Jama* 1995;274:968-74.
- 65- Salvo I, de Cian W, Musicco M, et al. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med. Suppl* 1995;2:244-9.
- 66- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an International multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002;28:108-21.
- 67- Teres D, Rapoport J, Lemeshow S, et al. Effects of severity of illness on resource use by survivors and nonsurvivors of severe sepsis at intensive care unit admission. *Crit Care Med* 2002;30:2413-9.
- 68- van Gestel A, Bakker J, Veraart CPWM, van Hout BA. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care* 2004;8:222-6.
- 69- Bates DW, Yu DT, Black E, et al. Resource utilization among patients with sepsis syndrome. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:62-70.
- 70- Chalfin DB, Holbein ME, Fein AM, Carlson GC. Cost-effectiveness of monoclonal antibodies to gram-negative endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis in ICU patients. *Jama* 1993;269:249-54.
- 71- Lee H, Doig CJ, Ghali WA, et al. Detailed cost analysis of care for survivors of severe sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:981-5.
- 72- Minino AM, Smith BL. Deaths: preliminary data for 2000. *Natl Vital Stat Rep* 2001;49:1-40.
- 73- Carlet J, Cohen J, Calandra T, et al. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med* 2008;36: 964-6.
- 74- Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:57-68.
- 75- Cohen J, Powderly WG. *Infectious diseases*. 2nd edition. Mosby; 2003. Section 2, chapter 56, 1-9.

- 76- Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units. Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34:344-52.
- 77- Danai PA, Sinha S, Moss M, et al. Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. *Crit Care Med* 2007;35:410-5.
- 78- Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, et al. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients in sex specific. *J Trauma* 2000;48:932-7.
- 79- Asai K, Hiki N, Mimura Y, et al. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: Role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock* 2001;16:340-3.
- 80- Diodato MD, Knoferl MW, Schwacha MG, et al. Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 2001;14:162-9.
- 81- Schneider CP, Nickel EA, Samy TS, et al. The aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione, restores immune responses following trauma-hemorrhage in males and decreases mortality from subsequent sepsis. *Shock* 2000;14:347-53.
- 82- Yimm JJ, Ding L, Schaffer AA, et al. A microsatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene: functional implications and racial differences. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;40:163-9.
- 83- Bone R.C. Gram-positive organism and sepsis. *Arch Intern Med* 1994;154:26-34.
- 84- Cohen J, Lynn WA. Microbiological considerations in sepsis. *Sepsis* 1998;2:101-6.
- 85- Vincent JL, DeBacker D. Pathophysiology of septic shock. *Advances in Sepsis* 2001;1:87-92.
- 86- Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, et al. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. Laboratory and epidemiology observations. *Rev Infect Dis* 1983;5:35-53.
- 87- Wilke A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon hastalıkları*. İstanbul: Nobel tıp kitabevi; 1996. 473-85.
- 88- Kreger BE, Craven DE, Carling PC, et al. Gram-negative bacteremia-reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980;68:332-43.
- 89- Spencer RC, Wheat PF, Magee JT, et al. A three year survey of clinical isolates in the United Kingdom and their antimicrobial susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1999;26:435-46.
- 90- Bochud PY, Glauser MP, Calandra T. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med* 2001;27:33-48.
- 91- Pitet D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med* 1995; 155:1177-84.
- 92- Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in Intensive Care (EPIC) Study. *Jama* 1995;274:639-44.

- 93- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J. Bacteremia and severe sepsis in adults: A multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:617-24.
- 94- Valles J, Leon C, Alvarez-Lerma F, et al. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: A multicenter study evaluating epidemiology and prognosis. *Clin Infect Dis* 1997;24:387-95.
- 95- Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990's: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997;24:584-602.
- 96- Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on 'sepsis-related problems' of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998; 26:1793-1800.
- 97- Ed Brooke DL, Hibbert CL, Kingsley JM, et al. The patient-related costs of care for sepsis patients in a United Kingdom adult general intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27:1760-7.
- 98- Jamal W, El-Din K, Rotimi V, et al. An analysis of hospital-acquired bacteremia in intensive care unit patients in a university hospital in Kuwait. *J Hosp Infect* 1999;43:49-56.
- 99- Kedzierska J, Dolezal M. Microbiological profile of bloodstream infections in patients at a University Hospital in Cracow - retrospective study. *Med Sci Monit* 1999;56:1168-74.
- 100- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants group. *Diagn Microbiol Infect* 1999;33:283-97.
- 101- Sriskandan S, Cohen J. Gram-positive sepsis: mechanisms and differences from gram-negative sepsis. *Infect Dis North Am* 1999;13:397-412.
- 102- Richards M, Edwards J, Culver D, et al. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999;27:887-92.
- 103- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Recombinant Human Protein C World Wide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
- 104- Annane D, Sebille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama* 2002;288:862-71.
- 105- Laupland KB, Zygun DA, Davies HD, et al. Population-based assessment of intensive care unit-acquired bloodstream infections in adults: Incidence, risk factors, and associated mortality rate. *Crit Care Med* 2002;30:2462-7.

- 106- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
- 107- Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S, et al. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:461-8.
- 108- Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, et al. Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med* 2007;33:435-43.
- 109- Schaberg DR, Culver DH, Gayners RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991;Suppl B:725-55.
- 110- O'Connell B, Daly PA, McCann SR, Keane CT. Bacteraemia in neutropenic patients. *Ir Med J* 1993;86:203-5.
- 111- Akalin HE, Kanra G. Empirik antibiyotik tedavisi. 1994. Ankara: Güneş kitabevi; 1994. 175-86.
- 112- Oppenheim BA. The changing pattern of infection in neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:7-11.
- 113- Spencer RC. Bacteremia caused by multi-resistant gram-positive microorganism. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:17-28.
- 114- Dominguez de Villota E, Algora A, Rubio JJ, et al. Septicemia in a medical intensive care unit. Clinical, biochemical and microbiological data of 109 cases. *Intensive Care Med* 1983;9:109-15.
- 115- Jarvis WR, Edwards JH, Culver DH, et al. Nosocomial infection rate in adult and pediatric intensive care units in the United States. *Am J Med* 1991;91:185-91.
- 116- Gross PA, Barrett TL, Dellinger PE, et al. Purpose of quality standards for infectious diseases. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 1994;18:421.
- 117- Ferretti G, Mandala M, Di Cosimo S, et al. Catheter-related bloodstream infections, part I: pathogenesis, diagnosis, and management. *Cancer Control* 2002;9:513-23.
- 118- Cohen J, Abraham E. Microbiological findings and correlations with serum tumor necrosis-alpha in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180:116-21.
- 119- Fish DN. Optimal antimicrobial therapy for sepsis. *Am J Health Syst Pharm* 2002;59:13-9.
- 120- Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *Lancet* 2005;365:63-78.
- 121- Hotchkiss RS, Karl IE. Medical progress: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-50.
- 122- Bochud P-Y, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* 2003;326:262-6.
- 123- Reig A, Tejerina C, Codina J, Mirabet V. Infections in burn patients. *Annals of the MBC* 1992;5:91-5.
- 124- Bartley MK, Laskowski-Jones L. Understanding postsplenectomy sepsis. *AJN* 1995;95:56A-56D.
- 125- Nair S, Schoeneman MJ. Septic arthritis in an infant with vesicoureteral reflux and urinary tract infection. *Pediatrics* 2003;111:195-6.

- 126- Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF et al. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanism of pathogenesis. *Annals of Internal Medicine* 1994;120:771-83.
- 127- Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001;7:167-202.
- 128- Calandra T. Pathogenesis of septic shock: implications for prevention and treatment. *J Chemother* 2001;13:173-80.
- 129- Galley HF, Webster NR. The immuno-inflammatory cascade. *Br J Anaesth* 1996;77:11-16.
- 130- Pinsky MR. Pathophysiology of sepsis and multipl organ failure: pro versus anti-inflammatory aspects. 2004;144:31-43.
- 131- Ashare A, Power LS, Butler NS, et al. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:633-40.
- 132- Lugtenberg B, Van Alphen A. Molecular architecture and function of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1983;737:51-115.
- 133- Saez-Llorens X, McCracken GH Jr. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology, and management. *J Pediatr* 1993;123:497-508.
- 134- Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998;64:25-32.
- 135- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol* 2001;1:135-45.
- 136- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885-91.
- 137- Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 2001;29: 21-7.
- 138- Tsitou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 2005;11:76-85.
- 139- Tseng H-W, Juan H-F, Huang H-C, et al. Lipopolysaccharide-stimulated responses in rat aortic endothelial cells by a systems biology approach. *Proteomics* 2006;6:5915-28.
- 140- Levi M, van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJ. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanism in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest* 1997;27:3-9.
- 141- Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multipl organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2001;29:99-106.
- 142- Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996;77:110-17.
- 143- Lorenta JA, Marshall JC. Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis. *Shock* 2005;Suppl 1:107-9.
- 144- Vincent J-L, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Crit Care Med* 2006;173:256-63.
- 145- Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145:201-27.
- 146- Vincent JL, Zhang H, Szabo G, et al. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1781-5.

- 147- Sheehan M, Wong HR. Yet another potential role for nitric oxide in the pathophysiology of septic shock. *Crit Care Med* 2002;30:1393-4.
- 148- Nava E, Palmer RM, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: How much is beneficial? *Lancet* 1991;338:1555-7.
- 149- Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991;338:1557-8.
- 150- Kilbourn RG, Griffith OW, Gross SS. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993;329:1427-8.
- 151- Levy RM, Prince JM, Billiar TR. Nitric oxide: a clinical primer. *Crit Care Med* 2005;33:492-5.
- 152- Bozza FA, Bozza PT, Castro HC. Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:217-21.
- 153- Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:124-8.
- 154- Fink MP. Therapeutic options directed against platelet activating factor, eicosanoids and bradykinin in sepsis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;Suppl. A:81-94.
- 155- Uhlig S, Göggel R, Engel S. Mechanism of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacological Reports* 2005;57:206-21.
- 156- Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? *J Pathol* 2000;190:373-86.
- 157- Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases. 3rd edition. New York: Churchill Livingstone, 1990. 611-36.
- 158- Haeney MR. The role of the complement cascade in sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:41-6.
- 159- van Deventer SJH, Bluller HR, ten Cate JW, et al. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 1990;76:2520-8.
- 160- Bone RC. Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Arch Intern Med* 1992;152:1381-9.
- 161- Levi M, Cate H, Poll T, et al. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 1993;270:975-9.
- 162- Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2003;16:43-7.
- 163- Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest* 1992;101:816-23.
- 164- Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991;163:1177-84.
- 165- Abel T, Lambert G. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney Int* 1998;53:34-37.

- 166- Paterson RL, Webster NR. Sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *J R Coll Surg Edinb* 2000;45:178-82.
- 167- Kollef MH, Schuster DP. The acute respiratory distress syndrome. *New Engl J Med* 1995. 332: 27-37.
- 168- Consales G, Gaudio AR. Sepsis associated encephalopathy. *Minerva Anesthesiol* 2005;71:39-52.
- 169- Zantl N, Uebe A, Neumann B, et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 1998;66:2300-9.
- 170- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000;13:110-6.
- 171- Hubbard WJ, Choundry M, Schwacha MG et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005;Suppl 1:52-7.
- 172- Redl H, Bahrami S. Large animal models: baboons for trauma, shock, and sepsis studies. *Shock* 2005;Suppl 1:88-93.
- 173- O'Reilly LA, Strasser A. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res* 2000;48:5-21.
- 174- Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49:186-96.
- 175- Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001;88:22-30.
- 176- Wyler F, Neutze JM, Rudolph AM. Effects of endotoxin on distribution of cardiac output in unanesthetized rabbits. *Am J Physiol* 1970;219:246-51.
- 177- Coalson JJ, Benjamin B, Archer LT, et al. Prolonged shock in the baboon subjected to infusion of *E. coli* endotoxin. *Circ Shock* 1978;5:423-37.
- 178- Ulevitch RJ, Cochrane CG, Bangs K, et al. The effect of complement depletion on bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced hemodynamic and hematologic changes in the Rhesus monkey. *Am J Pathol* 1978;92:277-80.
- 179- Remick DG, Kunkel SL. Pathophysiologic alterations induced by tumor necrosis factor. *Int Rev Exp Pathol* 1993;Pt B:7-25.
- 180- Hollenberg SM. Mouse models of resuscitated shock. *Shock* 2005;Suppl 1:58-63.
- 181- Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 1998;9:1-11.
- 182- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234:470-4.
- 183- Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, et al. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988;81:1162-72.
- 184- Fisher Jr CJ, Agosti JM, Opal SM, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:1697-1702.

- 185- Abraham E, Glauser MP, Butler T, et al. p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 Study Group. *JAMA* 1997;277:1531-8.
- 186- Abraham E, Marshall JC. Sepsis and mediator-directed therapy: rethinking the target populations. Mediator-directed therapy in sepsis: rethinking the target populations. Toronto, Canada, 31 October-1 November 1998. *Mol Med Today* 1999;5:56-8.
- 187- Abraham E, Laterre PF, Garbino J, et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med* 2001;29:503-10.
- 188- Garrido AG, Figueiredo LFP, Silva MR. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2004;19:82-8.
- 189- Lindsey DC, Emerson TE Jr, Thompson TE et al. Characterization of an endotoxemic baboon model of metabolic and organ dysfunction. *Circ Shock* 1991;34:298-310.
- 190- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature Rev Drug Discov* 2005;4:854-65.
- 191- McCuskey RS, McCuskey PA, Urbaschek R, Urbaschek B. Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity. *Infect Immun* 1984;45:278-80.
- 192- Galanos C, Freudenberg MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunology* 1993;187:346-56.
- 193- Krieg AM. Signal transduction induced by immunostimulatory CpG DNA. *Springer Semin Immunopathol* 2000. 22:97-105.
- 194- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-60.
- 195- Krieg AM. CpG DNA: trigger of sepsis, mediator of protection, or both? *Scand J Infect Dis* 2003;35:653-9.
- 196- Spohn G, Bachmann MF. Therapeutic vaccination to block receptor-ligand interactions. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:469-76.
- 197- Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:265-80.
- 198- Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002;14:103-10.
- 199- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
- 200- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:979-87.
- 201- Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Opal SM, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* 1994;271:1836-43.

- 202- Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*;25:115-24.
- 203- Mathiak G, Szewczyk D, Abdullah F, et al. An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. *Crit Care Med*;28:1947-52.
- 204- Hinshaw LB, Tekamp-Olson P, Chang AC, et al. Survival of primates in LD100 septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF alpha). *Circ Shock* 1990;30:279-92.
- 205- Haberstroh J, Breuer H, Lücke I, et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hemodynamic and cytokine response in a porcine model of *Pseudomonas* sepsis. *Shock* 1995;4:216-24.
- 206- Booke M, Hinder F, McGuire R, et al. Nitric oxide synthase inhibition versus norepinephrine for the treatment of hyperdynamic sepsis in sheep. *Crit Care Med* 1996;24:835-44.
- 207- Hinder F, Booke M, Traber LD, Traber DL. The atrial natriuretic peptide receptor antagonist HS 142-1 improves cardiovascular filling and mean arterial pressure in a hyperdynamic ovine model of sepsis. *Crit Care Med* 1997;25:820-6.
- 208- Pass LJ, Schloerb PR, Pearce FJ, Drucker WR. Cardiopulmonary response of the rat to gram-negative bacteremia. *Am J Physiol* 1984;246:H344-50.
- 209- Sato T, Tanaka J, Kono Y. Hepatic cellular injury following lethal *Escherichia coli* bacteremia in rats. *Lab Invest* 1982;47:304-10.
- 210- Hinshaw LB, Archer LT, Beller BK. Evaluation of naloxone therapy for *Escherichia coli* sepsis in the baboon. *Arch Surg* 1988;123:700-4.
- 211- Crocker SH, Lowery BD, Eddy DO, et al. Pulmonary clearance of blood-borne bacteria. *Surg Gynecol Obstet* 1981;153:845-51.
- 212- Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 2007;81:137-43.
- 213- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189-201.
- 214- Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock* 2005;Suppl 1:7-11.
- 215- Yang RC, Wang CI, Chen HW, et al. Heat shock treatment decreases the mortality of sepsis in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 1998;14:664-72.
- 216- Dodds WJ. An effective mass-screening program for animal models of the inherited bleeding disorders. *Prog Clin Biol Res* 1982;94:117-32.
- 217- Avila A, Warshawski F, Sibbald W, et al. Peripheral lymph flow in sheep with bacterial peritonitis: evidence for increased peripheral microvascular permeability accompanying systemic sepsis. *Surgery* 1985;7:685-95.
- 218- Kinasewitz GT, Chang AC, Peer GT, et al. Peritonitis in the baboon: a primate model which stimulates human sepsis. *Shock* 2000;13:100-9.

- 219- Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1993;14:133-44.
- 220- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*;26:239-57.
- 221- Peter ME, Heufelder AE, Hengartners MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:12736-7.
- 222- Alles A, Alley K, Barrett JC, et al. Apoptosis: a general comment. *FASEB J* 1991;5:2127-8.
- 223- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-54.
- 224- Zhang X, Li XH, Ma X, et al. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:451-8.
- 225- Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000;53:55-63.
- 226- Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology* 1998;138:482-91.
- 227- Choi W-S, Lee E-H, Chung C-W, et al. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *Journal of Neurochemistry* 2001;77:1531-41.
- 228- Allen RT, Hunter WJ, Agrawal D. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal of Pharmacological Methods* 1997;37:215-28.
- 229- Savitz SL, Rosenbaum DM. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery* 1998;42:555-72.
- 230- Rinkerberger JL, Korsmeyer SJ. Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:585-96.
- 231- O'Reilly LA, Strasser A. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res* 2000;48:5-21.
- 232- Hoing LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 2000;108:317-30.
- 233- Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005;258:479-517.
- 234- Gelbard HA, Boustany RM, Schor NF. 1997. Apoptosis in development and disease of the nervous system: Apoptosis in childhood neurologic disease. 1997;16:93-7.
- 235- Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg Oncol* 1997;6:133-42.
- 236- Grodzicky T, Elkon KB. Apoptosis. A case where too much of too little can lead to autoimmunity. *Mt Sinai J Med* 2002;69:208-19.
- 237- Nikitatis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI. The role of apoptosis in oral disease. Mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental disease; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:476-90.

- 238- An SF, Giometto B, Scaravilli T, et al. Programmed cell death in brains of HIV-1 positive AIDS and Pre-AIDS patients. *Acta Neuropathol* 1996;91:169-173.
- 239- Saini KS, Walker NI. Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol Cell Biochem* 1998;178:9-25.
- 240- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995;15:961-73.
- 241- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 2003;283:1-16.
- 242- Vaux DL. Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:786-9.
- 243- Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, et al. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery* 2002;51:2-12.
- 244- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:7162-6.
- 245- Van Cruchten S, Van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002;31:214-23.
- 246- Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. *Eur J Dermatol* 1999;9:413-25.
- 247- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature* 2006;443:796-802.
- 248- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
- 249- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, et al. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276:1071-7.
- 250- Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ* 2000;7:645-53.
- 251- Vance JE, Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* 2005;44:207-34.
- 252- Lettre G, Hengartner MO. Developmental apoptosis in *C. Elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Cell Biol* 2006;7:97-108.
- 253- Yan N, Gu L, Kokel D, Chai J, et al. Structural, biochemical, and functional analyses of CED-9 recognition by the proapoptotic proteins EGL-1 and CED-4. *Mol Cell* 2004;15:999-1006.
- 254- Yan N, Chai J, Lee ES, et al. Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005;437:831-7.

- 255- Yan N, Xu Y, Shi Y. Stoichiometry of the CED-4-CED-9 complex and the tetrameric CED-4: insights into the regulation of CED-3 activation. *Cell Cycle* 2006;5:31-34.
- 256- del Peso L, Gonzalez VM, Nunez G. Caenorhabditis elegans EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J Biol Chem* 1998;273:33495-500.
- 257- Hoepfner DJ, Hengartner MO, Schnabel R. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in Caenorhabditis elegans. *Nature* 2001;412:202-6.
- 258- Chen F, Hersh BM, Conradt B, et al. Translocation of C. elegans CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* 2000;287:1485-9.
- 259- Conradt B, Horvitz HR. The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998;93:519-29.
- 260- Hisahara S, Kanuka H, Shoji S, et al. Caenorhabditis elegans anti-apoptotic gene ced-9 prevents ced-3-induced cell death in Drosophila cells. *J Cell Sci* 1998;111:667-73.
- 261- Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future. *Trends Genet* 1998;14:410-16.
- 262- Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-6.
- 263- Ross PW, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* 2006;12:440-50.
- 264- Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 2006;13:1351-9.
- 265- Newton K, Strasser A. The bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Dev* 1998;8:68-75.
- 266- Cellerino A, Bahr M, Isenmann S. Apoptosis in the developing visual system. *Cell Tissue Res* 2000;301:53-69.
- 267- Adams JM, Cory S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001;26:61-6.
- 268- Lu J, Ashwell KW, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine* 2000;25:1859-66.
- 269- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
- 270- Irene M, Witzig TE, Adjei AA. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Clin* 2005;55:178-94.
- 271- Shibuel T, Taniguchi T. BH3-only proteins: Integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* 2006;119:2036-43.
- 272- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
- 273- Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998;17:3237-45.
- 274- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 1997;22:299-306.

- 275- Platt N, da Silva PR, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends in Cell Biology* 1998;8:365-72.
- 276- Giles KM, Hart SP, Haslett C, et al. An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges. *British journal of haematology* 2000;109:1-12.
- 277- Otsuki Y. Various methods of apoptosis detection. *Acta Histochem Cytochem* 2000;33:235-41.
- 278- Perl M, Chung CS, Ayala A. Apoptosis. *Crit Care Med* 2005;33:526-9.
- 279- Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1101-10.
- 280- van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res* 2000;45:549-59.
- 281- Duan WR, Garner DS, Williams SD, et al. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 2003;199:221-8.
- 282- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997;27:1-20.
- 283- Micoud F, Mandrand B, Malcus-Vocanson C. Comparison of several techniques for the detection of apoptotic astrocytes in vitro. *Cell Prolif* 2001;34:99-113.
- 284- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-51.
- 285- Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 1995;58:181-90.
- 286- Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, et al. A flow cytometric method Using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 1994;17:59-65.
- 287- Shimizu S, Eguchi Y, Ito Y, et al. Induction apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-xl. *Cancer Res* 1996;56:2161-6.
- 288- Louagie H, Cornelissen M, Philippe J, et al. Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes. *Cell Biol Int.* 1998;22:277-83.
- 289- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007;139:143-56.
- 290- Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;301:5-17.
- 291- Collins JA, Schandl CA, Young KK, et al. Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997;45:923-34.
- 292- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119: 493-501.

- 293- Xiong Y, Zhang D. Effect of retinoic acid on apoptosis and expression of Fas proteins in mouse blastocysts cultured in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008;28:239-42.
- 294- Inoki C, Ito Y, Yamashita H, et al. Image analysis and ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labeling techniques in human endometrium. *J Histotechnol* 1997;20:321-8.
- 295- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, et al. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997;272:26159-65.
- 296- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-56.
- 297- Nakao K, Otsuki Y, Akao Y, et al. The synergistic effects of hyperthermia and anticancer drugs on induction of apoptosis. *Med Electron Microsc* 2000;33:44-50.
- 298- Leers MP, Kölgen W, Björklund V, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999;187:567-72.
- 299- Nagata S, Nagase H, Kawane K, et al. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:108-16.
- 300- Melino G, Piacentini M. 'Tissue' transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector? *FEBS Lett* 1998;430:59-63.
- 301- Volokhina EB, Hulshof R, Haanen C, Vermes I. Tissue transglutaminase mRNA expression in apoptotic cell death. *Apoptosis* 2003;8:673-9.
- 302- Fesus L, Thomazy V, Falus A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 1987;224:104-8.
- 303- Aschoff AP, Günther E, Jirikowski GF. Tissue transglutaminase in the small intestine of the mouse as a marker for apoptotic cells. Colocalization with DNA fragmentation. *Histochem Cell Biol* 2000;113:313-7.
- 304- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993;12:3679-84.
- 305- Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, et al. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5506-7.
- 306- McCarthy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 1998;36:259-78
- 307- Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Exp Cell Res* 2002;277:1-14.
- 308- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.

- 309- Wang Y, Rea T, Bian J, et al. Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology. *FEBS Letters* 1999;445:269-73.
- 310- Mahidhara R, Billiar TR. Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:105-13.
- 311- Matsuda N, Hattori Y. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Molecular Pathophysiology and Gene Therapy. *J Pharmacol Sci* 2006;101:189-198.
- 312- Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 1997;7:247-53.
- 313- Koshi R, Mathan VI, David S, Mathan MM. Enteric vascular endothelial response to bacterial endotoxin. *Int J Exp Pathol* 1993;74:593-601.
- 314- Sutton ET, Zhou Z, Baker CH, et al. Differences in arterial and arteriolar endothelial structure during endotoxin shock. *Circ Shock* 1993;41:71-6.
- 315- McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996;32:752-63
- 316- Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997;186:1831-41.
- 317- Fujita M, Kuwano K, Kunitake R, et al. Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;117:202-208.
- 318- Deaciuc IV, Fortunato F, D'Souza NB, et al. Modulation of caspase-3 activity and Fas ligand mRNA expression in rat liver cells in vivo by alcohol and lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:349-56.
- 319- Mutunga M, Fulton B, Bullock R, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:195-200.
- 320- Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L899-L914.
- 321- Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 2007;43:117-37.
- 322- Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, et al. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 1994;214:584-94.
- 323- Bannerman DD, Sathyamoorthy M, Goldblum SE. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J Biol Chem* 1998;273:35371-80.
- 324- Choi KB, Wong F, Harlan JM, et al. Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998;273:20185-8.
- 325- Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1999;55:2322-37.

- 326- Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000;117:841-54.
- 327- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002;168:2493-2500.
- 328- Lindner H, Holler E, Ertl B, et al. Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. *Blood* 1997;89:1931-8.
- 329- DeMeester SL, Qiu Y, Buchman TG, et al. Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit Care Med* 1998;26:1500-9.
- 330- Drab-Weiss EA, Hansra IK, Blazek ER, Rubin DB. Amino thiols protect endothelial cell proliferation against inhibition by lipopolysaccharide. *Shock* 1998;10:423-9.
- 331- Hu X, Yee E, Harlan JM, Wong F, Karsan A. Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood* 1998;92:2759-65.
- 332- Maeda K, Abello PA, Abraham MR, et al. Endotoxin induces organ-specific endothelial cell injury. *Shock* 1995;3:46-50.
- 333- Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000;1:496-501.
- 334- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE. Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003;35:585-92.
- 335- Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002;18:487-94.
- 336- Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999;162:4148-56.
- 337- Oberholzer C, Oberholzer A, Bahjat FR, et al. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11503-8.
- 338- Green DR, Beere HM. Apoptosis. Gone but not forgotten. *Nature* 2000;405:28-9.
- 339- Bohlinger I, Leist M, Gantner F, et al. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol* 1996;149:1381-93.
- 340- Zhou M, Simms H, Wang P. Adrenomedullin and Adrenomedullin Binding Protein-1 Attenuate Vascular Endothelial Cell Apoptosis in Sepsis. *Ann Surg* 2004;240:321-30.
- 341- Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, et al. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol* 2005;7:1087-97.
- 342- Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 2007;43:117-37.
- 343- Cinel İ, Oral U. SIRS, Sepsis, MODS patofizyolojisinde apoptosis. *Türk Anest Rean Cem Mecmuası* 2001;29:52-8.

- 344- Coutinho HB, Robalinho TI, Coutinho VB, et al. Intraabdominal sepsis: an immunocytochemical study of the intestine mucosa. *J Clin Pathol* 1997;50:294-8.
- 345- Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, et al. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997;25:1298–1307.
- 346- Coopersmith CM, Stromberg PE, Davis CG, et al. Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle arrest. *Crit Care Med* 2003;31:1630-7.
- 347- Sayeed MM. Intestinal epithelial regenerative capacity: an “Achilles’ heel” in trauma/burn/sepsis injuries? *Crit Care Med* 2003;31:1864–6.
- 348- Sloane PJ, Gee MH, Gottlieb JE, et al. A multicenter registry of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:419–26.
- 349- Özdülger A, Cinel İ, Köksel O, et al. The protective effect on N-Acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock* 2003;19:366-72.
- 350- Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am. J. Pathol* 1996;149: 845–52.
- 351- Guinee D, Brambilla E, Fleming M, et al. The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 1997;151:999–1007.
- 352- Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, et al. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of Leukocyte Biology* 2005;78:325-37.
- 353- Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, et al. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J Immunol* 1999;163:2217-25.
- 354- Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, et al. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:762-9.
- 355- Serrao KL, Fortenberry JD, Owens ML, et al. Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:298–305.
- 356- Meyrick BO. Endotoxin-mediated pulmonary endothelial cell injury. *Fed Proc* 1986;45:19-24.
- 357- Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, et al. Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am J Pathol* 2000;157:597–603.
- 358- Hotchkiss RS, Dunne WM, Swanson PE, et al. Role of apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Science* 2001;294:1783.
- 359- Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, et al. Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1073-9.

- 360- Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, et al. Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun* 1996;64:734–8.
- 361- Solomon MA, Correa R, Alexander HR, et al. Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994;266:757–68.
- 362- Neviere R, Fauvel H, Chopin C, et al. Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:218–25.
- 363- Fauvel H, Marchetti P, Chopin C, et al. Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:1608–14.
- 364- Sharshar T, Gray F, De La Grandmaison GL, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet* 2003;362:1799-1805.
- 365- Pine RW, Wertz MJ, Lennard ES, et al. Determinants of organ malfunction or death in patients with intra-abdominal sepsis. A discriminant analysis. *Arch Surg* 1983;118:242-9.
- 366- Young GB, Bolton CF, Archibald YM, et al. The electroencephalogram in sepsis associated encephalopathy. *J Clin Neurophysiol* 1992;9:145-52.
- 367- Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, Sprung CL. The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA* 1996;275:470-3
- 368- Zauner C, Gendo A, Kramer L, et al. Metabolic encephalopathy in critically ill patients suffering from septic or nonseptic multiple organ failure. *Crit Care Med* 2000;28:1310-5.
- 369- Zauner C, Gendo A, Kramer L, Funk GC, Bauer E, Schenk P, et al. Impaired subcortical and cortical sensory evoked potential pathways in septic patients. *Crit Care Med* 2002;30:1136-9.
- 370- Bleck TP, Smith MC, Pierre-Louis SJ-C, et al. Neurologic complications of critical medical illnesses. *Crit Care Med* 1993;21:98–103.
- 371- Witt NJ, Zochodne DW, Bolton CF, et al. Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest* 1991;99:176-84.
- 372- Latronico N, Fenzi F, Recupero D, et al. Critical illness myopathy and neuropathy. *Lancet* 1996;347:1579-82.
- 373- Tennilä A, Salmi T, Pettilä V, et al. Early signs of critical illness polyneuropathy in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:1360-3.
- 374- Druschky A, Herkert M, Radespiel-Tröger M, et al. Critical illness polyneuropathy: clinical findings and cell culture assay of neurotoxicity assessed by a prospective study. *Intensive Care Med* 2001;27:686-93.
- 375- Bolton CF. Neuromuscular manifestations of critical illness. *Muscle Nerve* 2005;32:140-63.
- 376- Visser LH. Critical illness polyneuropathy and myopathy: clinical features, risk factors and prognosis. *Eur J Neurol* 2006;13:1203-12.

- 377- Freund HR, Ryan JA Jr, Fischer JE. Amino acid derangements in patients with sepsis: treatment with branched chain amino acid rich infusions. *Ann Surg*. 1978;188:423-30.
- 378- Freund HR, Muggia-Sullam M, LaFrance R, et al. Regional brain amino acid and neurotransmitter derangements during abdominal sepsis and septic encephalopathy in the rat. The effect of amino acid infusions. *Arch Surg* 1986;121:209-16.
- 379- Sprung CL, Cerra FB, Freund HR. Amino acid alterations and encephalopathy in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1991;19:753-7.
- 380- Bogdanski R, Blobner M, Becker I, et al. Cerebral histopathology following portal venous infusion of bacteria in a chronic porcine model. *Anesthesiology* 2000;93: 793-804.
- 381- Sharshar T, Gray F, Poron F, et al. Multifocal necrotizing leucoencephalopathy in septic shock. *Crit Care Med* 2002;30:2371-5.
- 382- Tamada F. Brain injury induced by continuous infusion of endotoxin in rats. Protective effects of methylprednisolone on intracerebral blood vessels. *No To Shinkei* 1993;45:49-56.
- 383- Young GB, Bolton CF, Archibald YM, et al. The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy. *J Clin Neurophysiol* 1992;9:145-52.
- 384- Ohnesorge H, Bishoff P, Scholz J, et al. Somatosensory evoked potentials as predictor of systemic response syndrome in pigs? *Int Care Med* 2003;29:801-7.
- 385- 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;161:79-84.
- 386- Endo S, Inada K, Inoue Y, et al. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock* 1992;38:264-74.
- 387- Hinshaw LB, Emerson TE Jr, Taylor FB Jr, et al. Lethal *Staphylococcus aureus*-induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. *J Trauma* 1992. 33:568-73.
- 388- Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993;119:771-8.
- 389- McAllister SK, Bland LA, Arduino MJ, et al. Patient cytokine response in transfusion-associated sepsis. *Infect Immun* 1994;62:2126-8.
- 390- Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. *JAMA* 1995;274:172-7.
- 391- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 2002;25:154-9.
- 392- Maes M. Major depression and the activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol* 1999;461:25-46.
- 393- Sewerynek E, Abe M, Chen L, et al. Oxidative changes in the liver, brain and lens of lipopolysaccharide-treated rats. *Arch Med Res* 1995;26:S109-S115.

- 394- Tolias CM, McNeil CJ, Kazlauskaitė J, Hillhouse EW. Superoxide generation from constitutive nitric oxide synthase in astrocytes in vitro regulates extracellular nitric oxide availability. *Free Radic Biol Med* 1999;26:99-106.
- 395- Heneka MT, Schmidlin A, Wiesinger H. Induction of argininosuccinate synthetase in rat brain glial cells after striatal microinjection of immunostimulants. *J Cerebral Blood Flow Metab* 1999;19:898-907.
- 396- Korcok J, Wu F, Tymiński K, et al. Sepsis inhibits uptake of ascorbate and redox cycling of dehydroascorbic acid: intracellular ascorbate depletion increases nitric oxide synthase induction and glutamate uptake inhibition. *J Neurochem* 2002;81:185-93.
- 397- Brown GC. Nitric oxide as a competitive inhibitor of oxygen consumption in the mitochondrial respiratory chain. *Acta Physiol Scand* 2000;168:667-74.
- 398- Nicoletti VG, Caruso A, Tendi EA, et al. Effect of nitric oxide synthase induction on the expression of mitochondrial respiratory chain enzyme subunits in mixed cortical and astroglial cell cultures. *Biochimie* 1998;80:871-81.
- 399- Basler T, Meier-Hellmann A, Bredle D, Reinhart K. Amino acid imbalance early in septic encephalopathy. *Intensive Care Med* 2002;28:293-8.
- 400- Freund HR, Muggia-Sullam M, Peiser J, Melamed E. Brain neurotransmitter profile is deranged during sepsis and septic encephalopathy in the rat. *J Surg Res* 1985;38:267-71.
- 401- Soejima Y, Fujii Y, Ishikawa T, et al. Local cerebral glucose utilization in septic rats. *Crit Care Med* 1990;18:423-7.
- 402- Yousef KA, Lang CH. Modulation of endotoxin-induced changes in hemodynamics and glucose metabolism by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Shock* 1994;1:335-42.
- 403- Koppel BS, Hauser WA, Politis C, et al. Seizures in the critically ill: the role of imipenem. *Epilepsia* 2001;42:1590-3.
- 404- Kadoi Y, Goto F. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. *Anesth Analg* 2004;99:212-20.
- 405- Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:1149-63.
- 406- Schorah CJ, Downing C, Piripitsi A, et al. Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients. *Am J Clin Nutr* 1996;63:760-5.
- 407- Chan SHH, Wu KLH, Wang L-L, Chan JYH. Nitric oxide- and superoxide-dependent mitochondrial signaling in endotoxin-induced apoptosis in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2005;39:603-18.
- 408- Hauser B, Bracht H, Matejovic M, et al. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg* 2005;101:488-98.

- 409- Bhat NR, Zhang P, Bhat AN. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 1999;72:472-8.
- 410- Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 1992;10945-9.
- 411- Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem* 1992; 59:897-905.
- 412- Chao CC, Hu S, Sheng WS, et al. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 1996;16:276-84.
- 413- Hu S, Peterson PK, Chao CC. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. *Neurochem Int* 1997;30:427-31.
- 414- Kingham PJ, Cuzner ML, Pocock JM. Apoptotic pathways mobilized in microglia and neurones as a consequence of chromogranin A-induced microglial activation. *J Neurochem* 1999;73:538-47.
- 415- Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000;10:369-77.
- 416- Boyd CS, Cadenas E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol Chem* 2002;383:411-23.
- 417- Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:214-20.
- 418- Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002;368:545-53.
- 419- Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim biophys Acta* 1999;1411:351-69.
- 420- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role cell death. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1440-50.
- 421- Aliprantis AO, Yang R-B, Weiss DS, et al. The apoptotic signalling pathway activated by Toll-like receptor-2. *The EMBO Journal* 2000;19:3325-6.
- 422- Fan J, Frey RS, Malik AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest* 2003;112:1234-43.
- 423- Janiszewski M, Carmo AO, Pedro MA, et al. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med* 2004;32:818-25.
- 424- Gambim MH, Carmo AO, Marti L, et al. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Critical Care* 2007;11:R107.
- 425- Rodriguez P, Dojat M, Brochard L. Mechanical ventilation: changing concepts. *Indian J Crit Care Med* 2005;9:235-43.
- 426- Shedlofsky SI, Israel BC, McClain CJ, et al. Endotoxin administration to humans inhibits cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Clin Invest* 1994;94:2209-14.

- 427- Wijdicks EFM, Sharbrough FW. New-onset seizures in critically ill patients. *Neurology* 1993;43:1024-42.
- 428- Pine RW, Wertz MJ, Lennard ES, et al. Determinants of organ malfunction or death in patients with intra-abdominal sepsis. A discriminant analysis. *Arch Surg* 1983;118:242-9.
- 429- Filbin MR, Stapszczyński JS. Septic Shock. *eMedicine J* 2006. 2:13.
- 430- Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, et al. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis* 2007;22:353-73.
- 431- Kadoi Y, Goto F. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. *Anesth Analg* 2004;99:212-20.
- 432- Kadoi Y, Hinohara H, Kunimoto F, et al. Cannabinoid antagonist AM 281 reduces mortality rate and neurologic dysfunction after cecal ligation and puncture in rats. *Crit Care Med* 2005;33:2629-36.
- 433- Noyan A. *Fizyoloji*. Ankara: Anadolu Üniversitesi Yayınları; 1980. 534-535.
- 434- Bir LS, Ercan S. Effects of intrathecal anandamide on somatosensory evoked responses in rats. *Exp Neurol* 2006;197:386-90.
- 435- Lebrun P, Manil J, Colin F. Formalin-induced central sensitization in the rat: somatosensory evoked potential data. *Neurosci Lett* 2000;283:113-6.
- 436- Pancoto JA, Corrêa PB, Oliveira-Pelegrin GR, Rocha MJ. Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Auton Neurosci* 2008;138:57-63.
- 437- Bartlett JG, Condon RE, Gorbach SL, et al. Veterans Administration Cooperative Study on Bowel Preparation for Elective Colorectal Operations: impact of oral antibiotic regimen on colonic flora, wound irrigation cultures and bacteriology of septic complications. *Ann Surg* 1978;188:249-54.
- 438- Salgado Júnior W, Santos JS, Cunha F de Q. Development of a lethal model of peritonitis for assessment of laparoscopic and laparotomic treatments in rats. *Acta Cir Bras* 2007;22:39-42.
- 439- Messaris E, Kekis P, Memos N, et al. Sepsis: prognostic role of apoptosis regulators in gastrointestinal cells. *World J Surg* 2007;31:787-94.
- 440- Ghiselli R, Cirioni O, Giacometti A, et al. The cathelicidin-derived tritrpticin enhances the efficacy of ertapenem in experimental rat models of septic shock. *Shock* 2006;26:195-200.
- 441- Sinanan M, Maier RV, Carrico CJ. Laparotomy for intra-abdominal sepsis in patients in an intensive care unit. *Arch Surg* 1984;119:652-8.
- 442- Naaber P, Smidt I, Tamme K, et al. Translocation of indigenous microflora in experimental model of sepsis. *J Med Microbiol* 2000;49:431-9.
- 443- Dunn L, Simmons RL. The role of anaerobic bacteria in intraabdominal infections. *Rev Infect Dis* 1984;Suppl 1:S139-46.

- 444- Maier S, Traeger T, Entleutner M, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004;21:505-11.
- 445- Sumitra M, Manikandan P, Rao KV, et al. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats--a comparative analysis. *Life Sci* 2004;75:1887-96.
- 446- Milde LN, Milde JH, Lanier WL, Michenfelder JD. Comparison of the effects of isoflurane and thiopental on neurologic outcome and neuropathology after temporary focal cerebral ischemia in primates. *Anesthesiology* 1988;69:905-13.
- 447- Kiyatkin EA, Brown PL. Brain and body temperature homeostasis during sodium pentobarbital anesthesia with and without body warming in rats. *Physiol Behav* 2005;84:563-70.
- 448- Xie XQ, Shinozawa Y, Sasaki J, et al. The effects of arginine and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor on pathophysiology of sepsis in a CLP model. *J Surg Res* 2008;146:298-303.
- 449- Mansart A, Bollaert PE, Giummelly P, et al. Effects of dexamethasone and L-canavanine on the intracellular calcium-contraction relation of the rat tail artery during septic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1177-82.
- 450- Torres-Dueñas D, Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock* 2006;25:267-76.
- 451- Song XM, Li JG, Wang YL, Zhou Q, et al. Effects of ketamine on proinflammatory cytokines and nuclear factor kappaB in polymicrobial sepsis rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:7350-4.
- 452- Yang S, Lim YP, Zhou M, et al. Administration of human inter-alpha-inhibitors maintains hemodynamic stability and improves survival during sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:617-22.
- 453- Feng X, Yan W, Liu X, et al. Effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 on pulmonary capillary leakage and cytokines production and NF-kappaB activation in CLP-induced sepsis in rats. *J Surg Res* 2006;135:129-36.
- 454- Lang CH, Nystrom G, Frost RA. Beta-adrenergic blockade exacerbates sepsis-induced changes in tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in skeletal muscle and is associated with impaired translation initiation. *J Trauma* 2008;64:477-86.
- 455- Eum HA, Park SW, Lee SM. Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis. *Nitric Oxide* 2007;17:126-33.
- 456- Piper RD, Pitt-Hyde M, Li F, et al. Microcirculatory changes in rat skeletal muscle in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996. 154:931-7.
- 457- Molnar RG, Wang P, Chaudry IH. Does neutrophil-mediated oxidative stress play any significant role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis? *J Surg Res* 1998;80:75-9.
- 458- Hui Y, Du J, Tang C, et al. Changes in arterial hydrogen sulfide (H₂S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. *J Infect* 2003;47:155-60.

- 459- Fischer LG, Freise H, Hilpert JH, et al. Modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction is time and nitric oxide dependent in a peritonitis model of sepsis. *Intensive Care Med* 2004;30:1821-8.
- 460- Huang W, McCaig LA, Veldhuizen RA, et al. Mechanisms responsible for surfactant changes in sepsis-induced lung injury. *Eur Respir J* 2005;26:1074-9.
- 461- Nakagawa NK, Jukemura J, Aikawa P, et al. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control. *Clinics* 2007;62:321-6.
- 462- Yu HP, Lui PW, Hwang TL, et al. Propofol improves endothelial dysfunction and attenuates vascular superoxide production in septic rats. *Crit Care Med* 2006;34:453-60.
- 463- Siddiqui AM, Cui X, Wu R, et al. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Crit Care Med* 2006;34:1874-82.
- 464- Gibot S, Buonsanti C, Massin F, et al. Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infect Immun* 2006;74:2823-30.
- 465- Yu HP, Lui PW, Hwang TL, et al. Propofol improves endothelial dysfunction and attenuates vascular superoxide production in septic rats. *Crit Care Med* 2006;34:453-60.
- 466- Koo DJ, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. Plasma alpha-glutathione S-transferase: a sensitive indicator of hepatocellular damage during polymicrobial sepsis. *Arch Surg* 2000;135:198-203.
- 467- Sun D, Muthukumar AR, Lawrence RA, Fernandes G. Effects of calorie restriction on polymicrobial peritonitis induced by cecum ligation and puncture in young C57BL/6 mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:1003-11.
- 468- Bauer P, Lush CW, Kvietys PR, et al. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R1140-7.
- 469- Cryan B, Corbett-Feeney G, Flynn J. Comparison of the API Staph. kit and a two sugar maltose/trehalose fermentation test in the identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Ir J Med Sci* 1986;155:353-5.
- 470- Levraut J, Ciebiera JP, Chave S, et al. Mild hyperlactatemia in stable septic patients is due to impaired lactate clearance rather than overproduction. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1021-6.
- 471- Chrusch C, Bands C, Bose D, et al. Impaired hepatic extraction and increased splanchnic production contribute to lactic acidosis in canine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:517-26.
- 472- Bakker J, Coffernils M, Leon M, et al. Blood lactate levels are superior to oxygen-derived variables in predicting outcome in human septic shock. *Chest* 1991;99:956-62.
- 473- Bakker J, de Lima AP. Increased blood lactate levels: an important warning signal in surgical practice. *Crit Care* 2004;8:96-8.

- 474- Duke TD, Butt W, South M. Predictors of mortality and multiple organ failure in children with sepsis. *Intensive Care Med* 1997;23:684-92.
- 475- Andrejko KM, Chen J, Deutschman CS. Intrahepatic STAT-3 activation and acute phase gene expression predict outcome after CLP sepsis in the rat. *Am J Physiol* 1998;275:G1423-9.
- 476- Croner RS, Kulu Y, Hoerer E, et al. Intravenous glycine after cecal ligation and puncture has no effect on impaired hepatic microperfusion, leukocyte adhesion, and mortality in septic rats. *Microvasc Res* 2005;69:71-8.
- 477- Molnar RG, Wang P, Ayala A, et al. The role of neutrophils in producing hepatocellular dysfunction during the hyperdynamic stage of sepsis in rats. *J Surg Res* 1997;73:117-22.
- 478- Schlayer HJ, Karck U, Ganter U, et al. Enhancement of neutrophil adherence to isolated rat liver sinusoidal endothelial cells by supernatants of lipopolysaccharide-activated monocytes. Role of tumor necrosis factor. *J Hepatol* 1987. 5:311-21.
- 479- Hewett JA, Jean PA, Kunkel SL, Roth RA. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. *Am J Physiol* 1993;265:G1011-5.
- 480- Echtenacher B, Urbaschek R, Weigl K, et al. Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology* 2003;208:381-9.
- 481- Cohen SB, Crawley JB, Kahan MC et al. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology* 1997;92:1-5.
- 482- Taga K, Cherney B, Tosato G. IL-10 inhibits apoptotic cell death in human T cells starved of IL-2. *Int Immunol* 1993;5:1599-608.
- 483- Souza Neto JL, Araújo Filho I, Rego AC, et al. Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cir Bras* 2006;Suppl 4:8-12.
- 484- Baskurt OK, Gelmont D, Meiselman HJ. Red blood cell deformability in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:421-7.
- 485- Funke A, Berner R, Traichel B, et al. Frequency, natural course, and outcome of neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2000;106:45-51.
- 486- Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 2003;60:26-39.
- 487- Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990;62:3-6.
- 488- Laudes IJ, Guo RF, Riedemann NC, et al. Disturbed homeostasis of lung intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 during sepsis. *Am J Pathol* 2004;164:1435-45.
- 489- Whalen MJ, Doughty LA, Carlos TM, et al. Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in the plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure. *Crit Care Med* 2000;28:2600-7.
- 490- Yong KL, Linch DC. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor differentially regulates neutrophil migration across IL-1-activated and nonactivated human endothelium. *J Immunol*. 1993;150:2449-56.

- 491- Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1999;66:10-24.
- 492- Guo RF, Riedemann NC, Laudes IJ, et al. Altered neutrophil trafficking during sepsis. *J Immunol* 2002;169:307-14.
- 493- François B, Trimoreau F, Vignon P, et al. Thrombocytopenia in the sepsis syndrome: role of hemophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor. *Am J Med* 1997;103:114-20.
- 494- Møller S, Laigaard F, Olgaard K, Hemmingsen C. Effect of 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in experimental sepsis. *Int J Med Sci* 2007;4:190-5.
- 495- Remick DG, Bolgos G, Copeland S, Siddiqui J. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. *Infect Immun* 2005;73:2751-7.
- 496- Hofer S, Bopp C, Hoerner C, et al. Injury of the blood brain barrier and up-regulation of icam-1 in polymicrobial sepsis. *J Surg Res* 2008;146:276-81.
- 497- Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, et al. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Crit Care* 2006;10:R15.
- 498- Lotem J, Shabo Y, Sachs L. Clonal variation in susceptibility to differentiation by different protein inducers in the myeloid leukemia cell line M1. *Leukemia* 1989;3:804-7.
- 499- Sigurdsson GH, Christenson JT, el-Rakshy MB, Sadek S. Intestinal platelet trapping after traumatic and septic shock. An early sign of sepsis and multiorgan failure in critically ill patients? *Crit Care Med* 1992;20:458-67.
- 500- Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2:2096-102.
- 501- Baughman RP, Lower EE, Flessa HC, Tollerud DJ. Thrombocytopenia in the intensive care unit. *Chest* 1993;104:1243-7.
- 502- Marshall LA, Hall RH, Winkler JD, et al. SB 203347, an inhibitor of 14 kDa phospholipase A2, alters human neutrophil arachidonic acid release and metabolism and prolongs survival in murine endotoxin shock. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:1254-62.
- 503- Hanes SD, Quarles DA, Boucher BA. Incidence and risk factors of thrombocytopenia in critically ill trauma patients. *Ann Pharmacother* 1997;31:285-9.
- 504- Stéphan F, Hollande J, Richard O, et al. Thrombocytopenia in a surgical ICU. *Chest* 1999;115:1363-70.
- 505- Stephan F, Montblanc Jd, Cheffi A, Bonnet F. Thrombocytopenia in critically ill surgical patients: a case-control study evaluating attributable mortality and transfusion requirements. *Crit Care* 1999;3:151-8.
- 506- Kleinpell R. Advances in treating patients with severe sepsis. Role of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care Nurse* 2003;23:16-29.
- 507- Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis* 1997;25:951-68.

- 508- Ravindranath TM, Goto M, Demir M, et al. Tissue factor pathway inhibitor and thrombin activatable fibrinolytic inhibitor plasma levels following burn and septic injuries in rats. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:379-85.
- 509- Warkentin TE. Platelet count monitoring and laboratory testing for heparin induced thrombocytopenia. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1415-23.
- 510- Visentin GP, Moghaddam M, Beery SE, et al. Heparin is not required for detection of antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis. *J Lab Clin Med* 2001;138:22-31.
- 511- Mori M, Kudo H, Yoshitake S, et al. Transient EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a patient with sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:218-20.
- 512- Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, et al. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:451-7.
- 513- Piel DA, Gruber PJ, Weinheimer CJ, et al. Mitochondrial resuscitation with exogenous cytochrome c in the septic heart. *Crit Care Med* 2007. 35:2120-7.
- 514- Koyluoglu G, Bagcivan I, Karadas B et al. Alterations in spontaneous contractions of rat ileum and jejunum after peritonitis. *Eur J Pharmacol* 2008. 580:250-5.
- 515- Coopersmith CM, Chang KC, Swanson PE et al. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med* 2002. 30:195-201.
- 516- Tonner PH, Bein B. Classic electroencephalographic parameters: median frequency, spectral edge frequency etc. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2006;20:147-59.
- 517- Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 2. Baskı. Ankara: Taş Kitabevleri; 1981.
- 518- Stanski DR, Maitre PO. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of thiopental: the effect of age revisited. *Anesthesiology* 1990;72:412-22.
- 519- Ebling WF, Danhof M, Stanski DR. Pharmacodynamic characterization of the electroencephalographic effects of thiopental in rats. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991;19:123-43.
- 520- Tomoda K, Shingu K, Osawa M, et al. Comparison of CNS effects of propofol and thiopentone in cats. *Br J Anaesth* 1993;71:383-7.
- 521- Maclver MB, Mandema JW, Stanski DR, Bland BH. Thiopental uncouples hippocampal and cortical synchronized electroencephalographic activity. *Anesthesiology* 1996;84:1411-24.
- 522- Nguyen DN, Spapen H, Su F, et al. Elevated serum levels of S-100beta protein and neuron-specific enolase are associated with brain injury in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1967-74.
- 523- Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med* 2007;33:941-50.

- 524- Piazza O, Russo E, Cotena S, et al. Elevated S100B levels do not correlate with the severity of encephalopathy during sepsis. *Br J Anaesth* 2007;99:518-21.
- 525- Hudson RJ, Stanski DR, Saidman LJ, Meathe E. A model for studying depth of anesthesia and acute tolerance to thiopental. *Anesthesiology* 1983;59:301-8.
- 526- Naguib M, Schmid PG 3rd, Baker MT. The electroencephalographic effects of IV anesthetic doses of melatonin: comparative studies with thiopental and propofol. *Anesth Analg* 2003;97:238-43.
- 527- Kuizenga K, Wierda JM, Kalkman CJ. Biphasic EEG changes in relation to loss of consciousness during induction with thiopental, propofol, etomidate, midazolam or sevoflurane. *Br J Anaesth* 2001;86:354-60.
- 528- Madl C, Grimm G, Kramer L, et al. Early prediction of individual outcome after Cardiopulmonary resuscitation. *Lancet* 1993;341:855–8.
- 529- Madl C, Grimm G, Ferenci P, et al. Serial recording of sensory evoked potentials: a noninvasive prognostic indicator in fulminant liver failure. *Hepatology* 1994;20:1487-94.
- 530- Madl C, Kramer L, Yeganehfar W, et al. Detection of nontraumatic comatose patients with no benefit of intensive care treatment by recording of sensory evoked potentials. *Arch Neurol* 1996;53:512-6.
- 531- Madl C, Kramer L, Domanovits H, et al. Improved outcome prediction in unconscious cardiac arrest survivors with sensory evoked potentials as compared to clinical assessment. *Crit Care Med* 2000;28:721-6.
- 532- Chiappa KH. Electrophysiologic monitoring. In: *Neurological and Neurosurgical Intensive Care*. Ropper AH (Ed). New York: Raven Press; 1993. 165–183.
- 533- Franken ND, van Oostrom H, Stienen PJ, et al. Evaluation of analgesic and sedative effects of continuous infusion of dexmedetomidine by measuring somatosensory- and auditory-evoked potentials in the rat. *Vet Anaesth Analg* 2008.
- 534- Stienen PJ, van den Brom WE, de Groot HN, et al. Differences between primary somatosensory cortex- and vertex-derived somatosensory-evoked potentials in the rat. *Brain Res* 2004;1030:256-66.
- 535- Rosengarten B, Hecht M, Auch D, et al. Microcirculatory dysfunction in the brain precedes changes in evoked potentials in endotoxin-induced sepsis syndrome in rats. *Cerebrovasc Dis* 2007;23:140-7.
- 536- van Oostrom H, Stienen PJ, van den Bos R, et al. Somatosensory-evoked potentials indicate increased unpleasantness of noxious stimuli in response to increasing stimulus intensities in the rat. *Brain Res Bull* 2007. 71:404-9.
- 537- Drummond JC, Todd MM, U HS. The effect of high dose sodium thiopental on brain stem auditory and median nerve somatosensory evoked responses in humans. *Anesthesiology* 1985;63:249-54.
- 538- Martoft L, Jensen EW, Rodriguez BE, et al. Middle-latency auditory evoked potentials during induction of thiopentone anaesthesia in pigs. *Lab Anim* 2001;35:353-63.

- 539- Takaya M, Moritake K, Konishi T, et al. Effects of pentobarbital anesthetic induction on sensory evoked potentials in the cat. *No To Shinkei* 1986;38:961-6.
- 540- Schwarz S, Schwab S, Fabian CW, et al. Infection: impaired consciousness as the initial symptom. Clinical and pathophysiologic aspects of septic encephalopathy. *Nervenarzt* 1997;68:292-7.
- 541- Wang P, Zhou M, Rana MW, et al. Differential alterations in microvascular perfusion in various organs during early and late sepsis. *Am J Physiol* 1992;263:G38-43.
- 542- Wang P, Wood TJ, Zhou M, et al. Inhibition of the biologic activity of tumor necrosis factor maintains vascular endothelial cell function during hyperdynamic sepsis. *J Trauma* 1996;40:694-700.
- 543- Yang S, Cioffi WG, Bland KI, et al. Differential alterations in systemic and regional oxygen delivery and consumption during the early and late stages of sepsis. *J Trauma* 1999;47:706-12.
- 544- Sheh YL, Hsu C, Chan SH, Chan JY. NADPH oxidase- and mitochondrion-derived superoxide at rostral ventrolateral medulla in endotoxin-induced cardiovascular depression. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1610-23
- 545- Chang AY, Chan JY, Chou JL, et al. Heat shock protein 60 in rostral ventrolateral medulla reduces cardiovascular fatality during endotoxaemia in the rat. *J Physiol* 2006;574:547-64.
- 546- Chalmers J, Pilowsky P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *J Hypertens* 1991;9:675-94.
- 547- Biaggioni I, Whetsell WO, Jobe J, Nadeau JH. Baroreflex failure in a patient with central nervous system lesions involving the nucleus tractus solitarius. *Hypertension* 1994;23:491-5.
- 548- Schmitt P, Soluier V, Pequignot JM, et al. Ventilatory acclimatization to chronic hypoxia: relationship to noradrenaline metabolism in the rat solitary complex. *J Physiol* 1994;477:331-7.
- 549- Blessing WW, Yu Y, Nalivaiko E. Medullary projections of rabbit carotid sinus nerve. *Brain Res* 1999;816:405-10.
- 550- Akemi SM, Vanderlei MJ, Ubriaco LO, Colombari E. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001;38:560-4.
- 551- Wang WZ, Gao L, Pan YX, et al. Differential effects of cardiac sympathetic afferent stimulation on neurons in the nucleus tractus solitarius. *Neurosci Lett* 2006;409:146-50.
- 552- Yang Z, Coote JH. The role of supraspinal vasopressin and glutamate neurones in an increase in renal sympathetic activity in response to mild haemorrhage in the rat. *Exp Physiol* 2006;91:791-7.
- 553- Paxinos G. Central autonomic system. In *The Rat Nervous System*. 2th edition. Australia: Academic Press; 1995. 107-28.
- 554- Hayes K, Weaver LC. Selective control of sympathetic pathways to the kidney, spleen and intestine by the ventrolateral medulla in rats. *J Physiol* 1990;428:371-85.
- 555- Beluli DJ, Weaver LC. Areas of rostral medulla providing tonic control of renal and splenic nerves. *Am J Physiol* 1991;261:1687-92.

- 556- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K et al. Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 1991;254:726-9.
- 557- Kim WG, Mohny RP, Wilson B, et al. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 2000;20:6309-16.
- 558- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990;347:768-70.
- 559- Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992;587:250-6.
- 560- Chao CC, Hu S, Molitor TW, et al. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 1992;149:2736-41.
- 561- Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, et al. Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11393-7.
- 562- Peterson PK, Hu S, Anderson WR, Chao CC. Nitric oxide production and neurotoxicity mediated by activated microglia from human versus mouse brain. *J Infect Dis* 1994;170:457-60.
- 563- Wong ML, Rettori V, al-Shekhlee A, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med* 1996;2:581-4.
- 564- Jacobs RA, Satta MA, Dahia PL, et al. Induction of nitric oxide synthase and interleukin-1beta, but not heme oxygenase, messenger RNA in rat brain following peripheral administration of endotoxin. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;49:238-46.
- 565- Leist M, Fava E, Montecucco C, Nicotera P. Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 1997;9:1488-98.
- 566- Heneka MT, Löschmann PA, Gleichmann M, et al. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem* 1998;71:88-94.
- 567- Satta MA, Jacobs RA, Kaltsas GA, Grossman AB. Endotoxin induces interleukin-1beta and nitric oxide synthase mRNA in rat hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology* 1998;67:109-16.
- 568- Matsuoka Y, Kitamura Y, Takahashi H et al. Interferon-gamma plus lipopolysaccharide induction of delayed neuronal apoptosis in rat hippocampus. *Neurochem Int* 1999;34:91-9.
- 569- Quan N, Stern EL, Whiteside MB, Herkenham M. Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *J Neuroimmunol* 1999;93:72-80.
- 570- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000. 407:802-9
- 571- Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 2001;21:6480-91.

- 572- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2001;21:1179-88.
- 573- Lee YB, Yune TY, Baik SY, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2000;166:190-5.
- 574- Liu B, Wang K, Gao HM, et al. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem* 2001;77:182-9.
- 575- Li J, Baud O, Vartanian T, et al. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9936-41.
- 576- Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D, Annane D. Science review: The brain in sepsis--culprit and victim. *Crit Care* 2005;9:37-44.
- 577- Wang H, Wu YB, Du XH. Effect of dexamethasone on nitric oxide synthase and Caspase-3 gene expressions in endotoxemia in neonate rat brain. *Biomed Environ Sci* 2005;18:181-6.
- 578- Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994;264:1145-8.
- 579- Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4752-7.
- 580- Pancea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 2001;172:1-6.
- 581- Bauer S, Patterson PH. The cell cycle-apoptosis connection revisited in the adult brain. *J Cell Biol* 2005;171:641-50.
- 582- Amrein I, Slomianka L, Lipp HP. Granule cell number, cell death and cell proliferation in the dentate gyrus of wild-living rodents. *Eur J Neurosci* 2004;20:3342-50.
- 583- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 2000;291:17-20.
- 584- Lathe R. Hormones and the hippocampus. *J Endocrinol* 2001;169:205-31.
- 585- Abrahams S, Pickering A, Polkey CE, Morris RG. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia* 1997;35:11-24.
- 586- Bohbot VD, Kalina M, Stepankova K, et al. Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex. *Neuropsychologia* 1998;36:1217-38.
- 587- Holdstock JS, Mayes AR, Cezayirli E, et al. A comparison of egocentric and allocentric spatial memory in a patient with selective hippocampal damage. *Neuropsychologia* 2000;38:410-25.
- 588- Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *T Klin Tıp Bilim* 2001;21:427-31.

- 589- Spiers HJ, Burgess N, Hartley T, et al. Bilateral hippocampal pathology impairs topographical and episodic memory but not visual pattern matching. *Hippocampus* 2001;11:715-25.
- 590- Hauss-Wegrzyniak B, Vannucchi MG, Wenk GL. Behavioral and ultrastructural changes induced by chronic neuroinflammation in young rats. *Brain Res* 2000;859:157-66.
- 591- Baker KB, Kim JJ. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 2002;9:58-65.
- 592- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, et al. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 2000;3:238-44.
- 593- Biegón A, Alvarado M, Budinger TF, et al. Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain. *J Neurochem* 2002;82:924-34.
- 594- Rosi S, Ramirez-Amaya V, Hauss-Wegrzyniak B, Wenk GL. Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *J Neuroinflammation* 2004;1:12
- 595- Patterson PH, Nawa H. Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. *Cell* 1993;72 Suppl:123-37.
- 596- Shimizu I, Adachi N, Liu K, et al. Sepsis facilitates brain serotonin activity and impairs learning ability in rats. *Brain Res* 1999;830:94–100
- 597- Heyland DK, Hopman W, Coo H, et al. Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med* 2000;28:3599-605.
- 598- Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, et al. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit Care* 2004;8:R91–R98.
- 599- Hopkins RO, Weaver LK, Pope D, et al. Neuropsychological sequelae and impaired health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;161:50–6.
- 600- Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, et al. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1389–94.
- 601- Shimizu I, Adachi N, Liu K, et al. Sepsis facilitates brain serotonin activity and impairs learning ability in rats. *Brain Res* 1999;830:94–100.
- 602- Barichello T, Martins MR, Reinke A, et al. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med* 2005;33:221-223.
- 603- Barichello T, Martins MR, Reinke A, et al. Long-term cognitive impairment in sepsis survivors. *Crit Care Med* 2005;33:1671.
- 604- Barichello T, Machado RA, Constantino L, et al. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med* 2007;35:2186–90.
- 605- Tuon L, Comim CM, Antunes MM, et al. Imipramine reverses the depressive symptoms in sepsis survivor rats. *Intensive Care Med* 2007;33:2165–7.

- 606- Tuon L, Comim CM, Petronilho F, et al. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med* 2008;34:1724-31.
- 607- Semmler A, Frisch C, Debeir T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol* 2007;204:733-40.
- 608- Barrientos RM, Higgins EA, Biedenkapp JC, et al. Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiol Aging* 2006;27:723-32.
- 609- Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, et al. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:1764-70.
- 610- Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med* 2006;34:886-9.
- 611- Barichello T, Machado RA, Constantino L, et al. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med* 2007;35:2186-90.
- 612- Thiernemann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 1997;29:159-66.
- 613- Wong ML, Rettori V, al-Shekhlee A, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med* 1996;2:581-4.
- 614- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-8.
- 615- Elibol B, Söylemezoglu F, Unal I, et al. Nitric oxide is involved in ischemia-induced apoptosis in brain: a study in neuronal nitric oxide synthase null mice. *Neuroscience* 2001;105:79-86.
- 616- Tamatani M, Ogawa S, Niitsu Y, Tohyama M. Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J Neurochem* 1998;71:1588-96.
- 617- Tamatani M, Ogawa S, Nuñez G, Tohyama M. Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. *Cell Death Differ* 1998;5:911-9.
- 618- Roth J, Zeisberger E, Vybíral S, Janský L. Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. *Front Biosci* 2004;9:816-26.
- 619- Scholz H. Fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R913-5.
- 620- Ivanov AI, Scheck AC, Romanovsky AA. Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E2 in lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R698-706.
- 621- Gourine AV, Gourine VN, Tesfaigzi Y et al. Role of alpha(2)-macroglobulin in fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R218-26.
- 622- Zimmerman KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001;92: 57-70.

- 623- Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:255-60.
- 624- Mollinedo F, Gajate C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2006;9:51-73.
- 625- Natoli G, Costanzo A, Guido F et al. Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signalling. *Biochem Pharmacol* 1998;56: 915-20.

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince her zaman desteğini gördüğüm, bizleri araştırma yapmaya ve bilimselliğe özendirerek, sevgi ve saygı duyduğum çok değerli tez hocam Doç. Dr. M. Ayberk KURT'a,

Birlikte çalıştığım süre boyunca her zaman yardımlarını gördüğüm değerli uzmanımız Dr. İlker M. KAFA'ya,

Akademik eğitime katkıda bulunan değerli bölüm hocalarımız; Prof. Dr. İlknur ARI, Prof. Dr. N. Şimşek CANKUR, Prof. Dr. İhsaniye İKİZ, Prof. Dr. İ. Hakan OYGUCU ve Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR'e,

Son derece sıcak ve uyumlu çalışma ortamı bulduğum mesai arkadaşlarım Dr. Sinan BAKIRCI ve Dr. Ozan GERENLİ'ye,

Tezimle ilgili laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan laborantımız Hüseyin UZABACI'ya,

Her zaman beni destekleyen ve sevgileriyle yanımda olan başta ablam Dr. Funda UYSAL olmak üzere aileme,

Bölümümüzün değerli personeline,

Teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Kütahya'da doğdum. İlkokul öğrenimimi 1985-1990 yılları arasında Gemlik 100. Yıl İlkokulu'nda, ortaokul öğrenimimi 1990-1992 yılları arasında Gemlik Gazi İlköğretim Okulu'nda ve Lise öğrenimimi 1992-1994 yılları arasında Gemlik Lisesi'nde yaptım. 1994 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesinde yüksek öğrenimime başladım. 2001 yılında tıp fakültesinden mezun olduktan sonra 2003 yılı Eylül ayında Tıpta Uzmanlık Sınavı'nı kazandım ve 2003 yılından itibaren Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimi almaya devam etmekteyim.