



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SEPSİS OLUŞTURULAN
ERİŞKİN SIÇANLARIN BEYİNLERİNDE NÖROGENEZİN İNCELENMESİ

Dr. Sinan BAKIRCI

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2009



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SEPSİS OLUŞTURULAN
ERİŞKİN SIÇANLARIN BEYİNLERİNDE NÖROGENEZİN İNCELENMESİ

Dr. Sinan BAKIRCI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. M. Ayberk KURT

Bursa-2009

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet	iii
İngilizce Özet	iv
Giriş	1
Sepsis	1
Sepsis Epidemiyolojisi	3
Sepsis Etyolojisi	4
Sepsis Patofizyolojisi	5
Sepsisle İlişkili Ensefalopati	8
Sepsisle İlişkili Ensefalopati'nin Patofizyolojisi	10
Deneysel Sepsis Modelleri	14
Endotoksin ve Endotoksikoz Modeli	15
Bakteriyel İnfüzyon Modelleri	18
Peritonit modelleri	19
Erişkin Nörogenez	21
Subventriküler Zon ve Nörogenez	23
Hippocampus ve Nörogenez	27
Nörogenezin Kontrolü	31
Nörogenezin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	35
Patolojik Durumlar ve Nörogenez	41
Nörogenezin Fonksiyonel Önemi	42
Çalışmanın Amacı	45
Gereç ve Yöntem	47
Deney Hayvanları	47
Abdominal Cerrahi	48
Nörolojik Değerlendirme	50
Vital Parametrelerin Monitorizasyonu	51
Beyin Elektriksel Aktivitesinin Değerlendirilmesi	53
Kan Örnekleri ve Kan Kültürleri	55
Dokuların Elde Edilmesi	56

Bromodeoksiuridin immünohistokimyası	58
Hücre Sayımı	59
İstatistik	59
Bulgular	61
Mortalite Oranları	61
Klinik ve Laparotomik İnceleme Bulguları	61
Nörolojik Muayene Bulguları	62
Vital Parametre Bulguları	63
Elektrokortikografi Bulguları	68
Somatosensoriyel Uyarılmış Potansiyel Bulguları	72
İmmunohistokimyasal Bulgular	75
Tartışma ve Sonuç	77
Kaynaklar	85
Teşekkür	99
Özgeçmiş	100

ÖZET

Sepsis, cerrahi hastaları ve travma kurbanlarında karşılaşılan önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Sepsisle ilişkili ensefalopati mortalite ve morbiditeyi artıran ciddi bir komplikasyondur. Sepsis ve sepsisle ilişkili ensefalopatinin temel patofizyolojisini anlamamızda farklı hayvan modellerinden elde edilen sonuçlar yardımcı olmaktadır. Bu hayvan modellerinden elde edilen sonuçların kliniğe uyarlanması ise her zaman mümkün olamamaktadır. Mevcut çalışmada sıçan sepsis modelinin (caecum ligasyon ve perforasyonu); (1) kan basıncı, kalp hızı, rektal ısı değerleri, (2) nörolojik refleksler ve beyin elektriksel aktivitesi, (3) hematolojik ve kan kültürü verileri ve (4) bromodeoksiuridin immünohistokimyasal yöntemiyle beyin subventriküler zonunda nörogenez, üzerine olan etkileri araştırıldı. Ortalama arteriyel basınçtaki anlamlı azalma ve kalp hızındaki anlamlı artış, stabil olmayan vücut ısısı, pozitif kan kültür sonuçları, trombositopeni ve kan laktat seviyelerindeki anlamlı yükselme kullanılan modelin insanlarda görülen sepsis ile önemli benzerlikler taşıdığını göstermiştir. İnsanlarda görülen sepsisle uyumlu olarak caecum ligasyon ve perforasyonu uygulanan sıçanların bir bölümünde nörolojik reflekslerde bozulma, elektrokortikografik kayıtlarda, median ve spektral uç frekanslarında azalma ve delta aktivitesinde anlamlı artma, somatosensoriyel potansiyelde anlamlı uzama saptanmıştır. Çalışmanın bir diğer sonucu olarak caecum ligasyon ve perforasyonu uygulanan sıçanlarda subventriküler zonda bromodeoksiuridin ile pozitif olarak işaretlenen çoğalmakta olan hücre sayısının anlamlı oranda artmış olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, caecum ligasyon ve perforasyon modelinin sepsis ve sepsisle ilişkili ensefalopati için önemli bir köprü görevi görebileceğini ve sıçanlarda caecum ligasyon ve perforasyonu ile oluşturulan sepsisin, beyinde oluşan olası yıkıcı etkiyi dengelemek üzere nöronal rejenerasyonu uyarabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Sepsis, sepsisle ilişkili ensefalopati, nörogenez, subventriküler zon, caecum ligasyon ve perforasyonu

SUMMARY

Neurogenesis in Adult Rat Brain: An Experimental Animal Model of Sepsis

Sepsis is one of the most significant challenges in surgical patients and trauma victims. Sepsis associated encephalopathy is a severe complication of sepsis associated with increased morbidity and mortality. Our understanding of the basic biology of sepsis and sepsis associated encephalopathy has been guided by observations made using various animal models. However, outcome predicted by animal studies are not always representative of actual outcome in the clinic. We, therefore, have (1) monitored blood pressure, heart rate and rectal temperature, (2) examined the neurological reflexes and recorded brain electrical activity, (3) performed hematology tests and blood cultures, (4) investigated the neurogenesis at the subventricular zone with bromodeoksiuridine immunohistochemistry in cecal ligation and perforation model of sepsis to reveal possible relation with neurogenesis. Significant decrease in mean arterial pressure, increased heart rate and unstable body temperature together with positive blood culture results, thrombocytopenia and increased blood lactate levels provided strong support for the possible similarities to the human sepsis. Consistent with the human sepsis, deteriorated neurological reflexes, decreased median and spectral edge frequencies together with significantly increased delta activity in electrocorticographic recordings and elongated latencies in somatosensorial potentials were observed in some but not in all rats cecal ligated and perforated. Significantly higher number of bromodeoksiuridine positive proliferating cells in subventricular zone were also observed. These results collectively advocate that cecal ligation and perforation model may provide an important preclinical bridge for sepsis and sepsis associated encephalopathy and sepsis induced by cecal ligation and perforation in rats induces region spesific increases in neuronal regeneration in a possible

attempt to compensate for the devastating effect of sepsis and sepsis associated encephalopathy onto the brain.

Key words: Sepsis, sepsis associated encephalopathy, neurogenesis, subventricular zone, cecal ligation and perforation.



GİRİŞ

Sepsis

Sepsis, yıllar boyunca tıp dünyasının tedavisi güç ve mortalitesi yüksek sorunlarının başında yer almıştır. Özellikle son yıllarda kaydedilen bilimsel ve teknolojik gelişmelere, sepsis patofizyolojisinin daha da iyi anlaşılması olmasına, tanı ve tedavideki olumlu gelişmelere ve organ destek sistemlerinde yaşanan ilerlemeye rağmen, yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda önde gelen mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Tıptaki tanı ve tedavide yaşanan gelişmeler ve yaşam koşullarının iyileşmesine bağlı olarak yaşam süresinin uzaması, immünespresif ajanların daha yaygın kullanımı, farklı nedenlerle kateter kullanımı ve diğer invaziv yöntemlerin kullanımındaki artış gibi nedenlerle, günümüzde de sepsis ve septik şok sıklıkla görülmekte ve yoğun bakım ünitelerindeki en sık ölüm nedeni olmayı sürdürmektedir. Sepsis ve septik şoka bağlı mortalite oranlarının %30-60 arasında değişebildiği bildirilmektedir (1).

Grekçe'de pislenmek anlamına gelen sepsis ve septik şok konusundaki terminolojiye açıklık getirilmesi amacıyla "Amerikan Göğüs Hekimleri Koleji" (*American College of Chest Physicians*) ve "Yoğun Bakım Derneği" (*Society for Critical Care Medicine*) 1992 yılında yapılan uzlaşma konferansı ile yeni tanımlamalar ve sınıflandırmalar getirmişlerdir (2). Kabul edilen terminolojiye göre tanımlamalar Tablo-1'de gösterilmektedir (2). Avrupa Yoğun Bakım Derneği (*European Society of Intensive Care Medicine*), Yoğun Bakım Derneğinin (*Society of Critical Care Medicine*) ve Amerikan Göğüs Cerrahisi Derneği (*American Thoracic Surgery*)'nin sponsorluğunda 2001 yılında düzenlenen Uluslararası Sepsis Tanımlamaları Konferansında (*International Sepsis Definitions Conference*) 1992 yılındaki uzlaşma konferansından çıkan sepsis tanımlamaları yeniden gözden geçirilerek güncellenmiş ve sepsis evrelerinin belirlenmesinde PIRO (*predisposition=yatkınlık, infection=sepsise neden olduğu bilinen bir*

enfeksiyon, *response*=sistemik inflamatuvar yanıt, *organ failure*= organ yetmezliği) sisteminin kullanılması önerilmiştir. Bugünkü haliyle PIRO sisteminin sepsis evrelerinin belirlenmesinde yetersiz kaldığı ve geliştirilmesi gerekliliği de tartışma konusudur (3).

Tablo-1: Sepsis tanımlamaları.

Enfeksiyon	Mikroorganizmaların konakçı dokularında bulunmasına bağlı olarak gelişen inflamatuvar yanıttır.
Bakteriyemi	Canlı bakterinin kanda bulunması durumudur.
Sistemik inflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS= Systemic Inflammatory Response Syndrome)	Enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan (pankreatit, yanık, çoklu travma gibi) nedenlere bağlı olarak aşağıdaki bulgulardan en az ikisinin bulunduğu klinik tablodur. <ul style="list-style-type: none"> • Hipertermi $>38\text{ C}^{\circ}$ veya hipotermi $<36\text{ C}^{\circ}$ • Kalp hızı > 90 atım/dk • Solunum hızı > 20 ss/dk veya $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg • Beyaz küre sayısı $> 12.000/\text{mm}^3$ veya $< 4000/\text{mm}^3$ ya da genç hücre oranı $> \%10$
Sepsis	Enfeksiyöz bir olaya bağlı olarak gelişen SIRS tablosudur. Enfeksiyon etkeninin kan kültürü ile kanıtlanmış olması gerekir.
Ağır sepsis	Sepsisle birlikte; aşağıdakilerden birisinin bulunmasıdır. <ul style="list-style-type: none"> • 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	Sepsis bulguları bulunan ve yeterli sıvı tedavisine rağmen perfüzyon bozukluğunun devam etmesi ve hipotansiyonun sürmesi ile ortaya çıkan tablodur.
Yanıtsız septik şok	Sıvı tedavisine ve vazopressör ajanlara cevap vermeyen, bir saatten daha uzun süren septik şoktur.
Multipl Organ Disfonksiyon Sendromu (MODS)	Sepsis ve SIRS sonucu iki veya daha fazla organ ya da organ sisteminin ilerleyici fizyolojik bozukluğudur..

Sepsis Epidemiyolojisi

1- Sepsis insidansı: Sepsis ve septik şok insidansını saptamak oldukça zor olmakla beraber yapılan pek çok çalışma sepsisin görülme sıklığının tüm dünya genelinde gittikçe arttığını göstermektedir (4-6). Çeşitli toplumlar arasında önemli farklılıklar göstermekle beraber, sepsisin toplumda görülme sıklığının 0.5/1000 ile 3/1000 arasında değiştiği (7-9) hastaneye yatan hastalarda ise bu oranın 0.95/100 ile 3.3/100 arasında olduğu bildirilmiştir (7, 10-14). Amerikan toplumunda yapılan bir çalışma, ağır sepsis görülen hasta sayısının yıllık %1,5 arttığını ve bu artışın nüfus artış oranından fazla olduğunu göstermektedir (10). Ülkemizde 1990'lı yıllarda yapılan bir çalışmada hastanede yatan hastalarda sepsis insidansı 0.42/100 olarak bulunmuştur (15). Yoğun bakım ünitelerine yatırılan hastaların ise %14-37'sinde sepsis, %10-27'sinde ağır sepsis saptanmaktadır (9, 10-12). Ağır sepsisli vakaların yaklaşık yarısının yoğun bakım ünitelerinde tedavi edilmek zorunda kaldığı, yoğun bakım ünitelerinde yatış sürelerinin en az 2-3 hafta olduğu göze alındığında, sepsisin önemli bir toplum sağlığı sorunu olmanın yanında dikkate değer bir ekonomik boyutu bulunduğu da vurgulanmaktadır (10, 16).

2- Mortalite oranları: Sepsis, ciddi sepsis ve septik şok yoğun bakım ünitelerinde önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Günümüzde sepsisle ilgili mortalite oranları, yoğun bakım ünitelerindeki teknik donanım ile antimikrobik ve destek tedavilerdeki gelişmelere rağmen artmakta ve sepsis koroner dışı yoğun bakım ünitelerinde en başta gelen ölüm nedeni sayılmaktadır. Sepsisin erken döneminde tanı konulması, uygun antibiyotik ve destek tedavisinin başlanması mortalite oranlarını önemli derecede etkilemektedir. Mortalite oranlarının sepsiste %16, ciddi sepsiste %20, septik şokta %50'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir (7, 10).

3- Predispozan faktörler: Herhangi bir malignite nedeniyle kemoterapi uygulanan, organ transplantasyonuna bağlı immunsupresif tedavi alan hastalar, AIDS gibi bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler ile prematüre bebekler, yaşlılar, genetik yatkınlığı olanlar ve kronik böbrek yetmezliği, diabetes mellitus, kronik obstruktif akciğer hastalığı gibi kronik hastalığı

bulunan kişiler, yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar ve invaziv girişim uygulanan hastalar (i.v. kateter, yara drenajı gibi) sepsis gelişimi açısından büyük risk taşımaktadırlar (17-19).

Sepsis Etiyolojisi

Yukarıda açıklandığı üzere septik tablo, mikrobiyolojik yönden bilgi vermeden hastaların klinik durumunu yansıtan bir tablodur. Nitekim sepsis tablosu, bakteriler, virüsler, mantar ve parazitler gibi enfeksiyöz nedenlerden kaynaklanabileceği gibi pankreatit veya ağır travma gibi enfeksiyon dışı nedenlere bağlı olarak da gelişebilmektedir. Sepsise neden olan mikroorganizmaların sıklığı sepsisin hastane veya hastane dışında gelişmiş olmasına bağlı olarak değişmektedir (20). 1950'li yıllarda *S. aureus* ve *S. pyogenes* başta olmak üzere ön planda gram-pozitif bakteriler sepsiste en sık saptanan etkenleri oluştururken, 1960, 70 ve 80'li yıllarda bu mikroorganizmalar üzerine etkili pek çok antibiyotiğin kullanıma girmesiyle gram-pozitif bakteri sıklığı azalmaya ve gram-negatif bakteriler gittikçe artan oranlarda sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır (7, 21). 1990'lı yıllarda ise 3. kuşak sefalosporinler ve kinolonlar gibi gram-negatif mikroorganizmalara etkili güçlü antibiyotiklerin kullanılmaya başlanması, intravasküler kateter uygulamalarının artması, kalp kapakçığı ve eklem protez kullanımının artması gibi nedenlerle gram-pozitif mikroorganizmaların oluşturduğu sepsis sıklığının tekrar arttığı bildirilmektedir (13, 22). Benzer nedenlerle son yıllarda başta *Candida* türleri olmak üzere mantarlara bağlı sepsis insidansının da arttığı düşünülmektedir (23-25). Sepsise neden olan etken enfeksiyonun nereden edinildiğine göre de değişiklikler gösterir. Toplumdan edinilmiş sepsiste sıklıkla rastlanan etkenler streptokoklar, *S. aureus* ve *E. coli* iken, hastanelerden edinilmiş sepsiste karşılaşılan etkenler sıklıkla *Pseudomonas*, *Proteus* ve *Klebsiella* türleri ile *E. coli*, *S. aureus* ve enterekoklardır. Hastanede sepsis gelişen hastaların %20'sinde birden fazla mikroorganizma izole edilebilmektedir. Sepsise neden olan gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar Tablo-2'de verilmiştir.

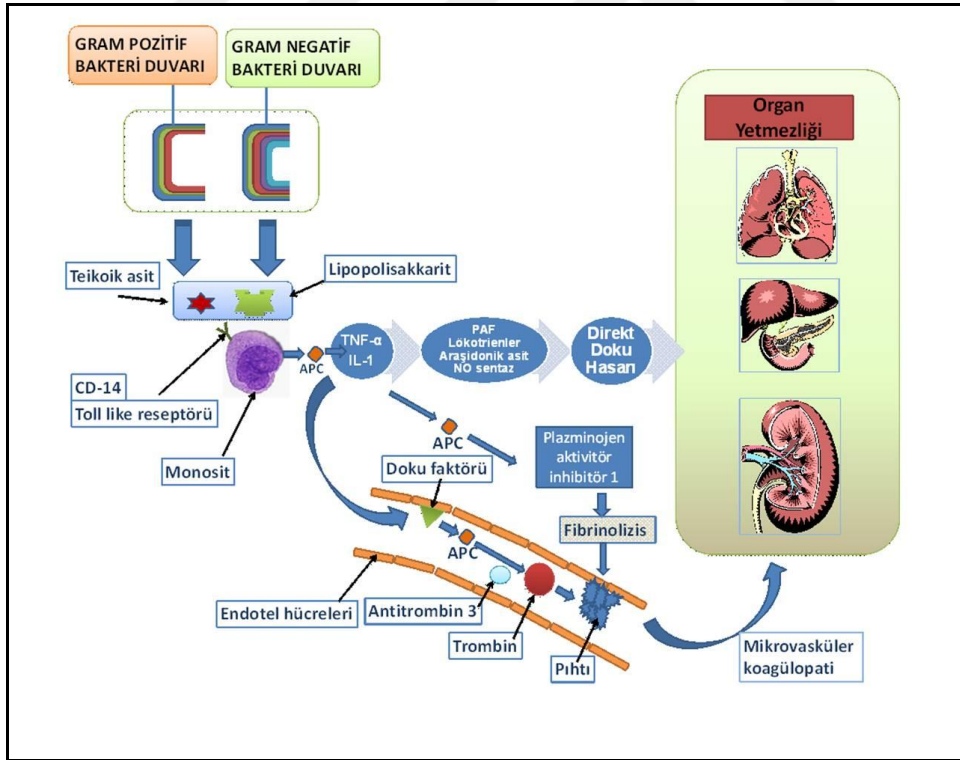
Tablo-2: Sepsise neden olan mikroorganizmalar (26).

Gram (+) mikroorganizmalar	%30-50	Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>	%14-24
		Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>	%5-11
		Diğer stafilokok türleri	%1-3
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	%9-12
		Diğer streptokok türleri	%6-11
		Enterokok türleri	%3-12
		Anareoblar	%1-2
		Diğer gram-pozitif bakteriler	%1-5
Gram (-) mikroorganizmalar	%33	<i>Escherichia coli</i>	%9-27
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%8-15
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	%2-7
		Diğer enterobakter türleri	%6-16
		<i>Haemophilus influenzae</i>	%2-10
		Anaeroblar	%3-7
		Diğer gram-negatif bakteriler	%3-12
Mantarlar	%3-6		
Polimikrobiyal	%13		

Sepsis Patofizyolojisi

Sepsiste ortaya çıkan klinik bulguların sıklıkla mikroorganizmaların konak biyolojik sistemini aktive ettiği bilinen hücresel yapı ve toksinlerine bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (Şekil-1). Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakarit yapıdaki endotoksin, gram pozitif hücre duvarında yer alan teikoik asit/peptidoglikan kompleksi, mantarlardaki zymosan benzeri yapılar organizmada değişik biyolojik sistemleri aktive ederek bağışıklık sisteminin verdiği inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır (26). Mikroorganizmalardan salınan membran komponentleri monosit yüzeyinde yer alan CD14 reseptörlerine bağlanır. Sinyal daha sonra, yakın zamanda tanımlanmış olan, Toll-like reseptörleri aracılığıyla hücreye iletilir ve

Tümör nekrozis faktör α (TNF α) ve İnterlökin-1 (IL-1) gibi sitokinlerin hücreden salınımına neden olur (27). Bu sitokinler, trombosit aktivasyon faktör konsantrasyonunun yükselmesine (PAF), nitrik oksit sentaz aktivitesinde artışa, dokulara nötrofil infiltrasyonunun ve nötrofil aktivitesinin uyarılmasına yol açarak direkt doku hasarı oluşturabildikleri gibi endotelial hücreler üzerine de etkileri bulunmaktadır (28, 29). İnflamatuvar sitokinlerin etkisine de bağlı olarak, koagulasyonun ekstrensek yolunun ilk aşamasını oluşturan doku faktörü endotelial hücre ve monosit yüzeyinde eksprese olmaya başlar. Doku faktörü endotelial pro-inflamatuvar özelliği de olan trombin üretimine bu da damar içi pıhtı oluşumuna neden olur. Sepsis sürecinde, IL-1 ve TNF α , ayrıca güçlü bir fibrinoliz inhibitörü olan, plazminojen aktivatör inhibitör 1 oluşumunu artırarak fibrinolizis bozulmasına da neden olmaktadır. Bu iki farklı yolak damar içi pıhtı oluşumu ve mikrovasküler koagülopatiyeye yol açar.



Şekil-1: Sepsiste organ yetmezliği ve ölüme yol açan inflamasyon ve koagulasyon kaskadında meydana gelen değişiklikler (26). APC, Aktif protein C; PAF, Platelet (trombosit) aktive edici faktör; TNF α , Tümör nekrozis faktör α ; IL-1, İnterlökin-1.

Yukarda tanımlanan nedenlerle sepsiste inflamasyon ve koagulasyonda meydana gelen kısır döngü kimi zaman ölümlü sonuçlanan çoklu organ yetmezliğine neden olabilmektedir.

Sepsisin Organlar Üzerine Etkileri

Sepsisli vakalarda ateş, takipne, taşikardi gibi sistemik inflamasyon bulgularının yanında klinik tablonun ilerlemesiyle beraber kardiyovasküler, renal, respiratuvar, metabolik ve hematolojik işlev bozuklukları oluşmakta, etkilenen organ sayısına bağlı olarak mortalite oranı yükselmekte ve mortalite oranı, üç veya daha fazla organ tutulumu durumunda %80'in üzerine çıkmaktadır (18). Septik şoklu hastaların %30-80'inde solunum yetmezliği ortaya çıktığı bildirilmiştir (30). Sepsiste akciğer tutulumu, direkt akciğer hasarı veya akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) şeklinde ortaya çıkabilir. Klinik olarak artan solunum desteğine rağmen hipokseminin düzelmemesi, ARDS'nin geliştiğini göstermektedir. Pulmoner hipertansiyon, ekstrasvasküler sıvı çıkışı artışı, kompliyans azalması, ARDS'de gözlenen olaylar olup ileri dönem respiratuvar kas yorgunluğunun da duruma eklenmesi hastalığın seyrini ağırlaştırmaktadır. Enfeksiyona bağlı immün komplekslerin böbreklerde birikimi, sepsis tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin nefrotoksik etkileri nedeniyle sepsise bağlı renal tübüler perfüzyon bozukluğu ve oligürik böbrek yetmezliği ortaya çıkabilmektedir (31). Sepsiste karaciğer yetmezliği kolestazis ile ortaya çıkabilir ve inflamatuvar mediyatörlerin neden olduğu safra kanaliküllerinin işlev bozukluğu sonucu hafif hiperbilirübinemi ve transaminazlarda hafif yükselme görülür. Aminotransferaz ve alkalin fosfataz artışı ile beraber serum aminoasit düzeylerindeki azalma veya azalmış hepatik aminoasit klirensi yetmezliğin ilerlediğine işaret etmektedir (18). Sepsisli hastalarda endojen katekolaminlerin insülin salınımını inhibe etmesi ve glukoneogenezin artması nedeniyle diabet olmaksızın kan glukoz düzeyinin kontrolünde yetersizlik ve bu duruma bağlı olarak da sepsisli hastada hiperglisemi veya hipoglisemi görülebilir (18). Sepsiste salınan pek çok mediyatörün kalp üzerinde disfonksiyona yol açtığı gösterilmiştir. $TNF\alpha$, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve nitrik oksit (NO) bunlardan en önemlileridir. $TNF\alpha$ miyokardı

deprese etmekte iken PAF kalp üzerinde negatif inotropik etki göstermekte ve kan basıncında düşüşe yol açmaktadır (32-37).

Sepsisle İlişkili Ensefalopati

Sepsisle ilişkili ensefalopati (SİE), ensefalopatiyi açıklayacak hipotansiyon, hipoksi, karaciğer veya böbrek fonksiyon bozukluğu gibi herhangi bir klinik durum ya da beyin ve zarlarından kaynaklanan bir enfeksiyon (menenjit, makroskobik serebrit, beyin absesi gibi) durumu olmamasına rağmen sepsiste ortaya çıkan ve sistemik yanıtın neden olduğu düşünülen yaygın beyin disfonksiyonudur (35-37). SİE yoğun bakım ünitelerinde en sık görülen ensefalopati tipidir ve sepsisli hastalarda %8-%70 arasında değişen oranlarda görülebildiği bildirilmektedir (38). SİE'nin eşlik ettiği sepsis hastalarında mortalite oranlarının belirgin artış gösterdiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada mortalite oranının ensefalopati gelişen hastalarda, mental durumu sağlam hastalara göre 1,9 kat daha yüksek olduğu öne sürülmüştür (37).

Sepsiste ortaya çıkan bu ensefalopatide hastalarda konfüzyondan komaya kadar değişebilen çeşitli klinik bulgular gözlenebilmektedir. Hafif derecede ensefalopatisi olan hastalarda konfüzyon gelişimi, uygunsuz davranışlar sergileme, yazı yazma yeteneğinde kayıp, dikkatsizlik gibi bulgular görülürken, ileri aşamalarda hastalarda delirium, ajitasyon, bilinç durumunda kötüleşme, koma gelişebilmektedir. Böbrek ve karaciğer yetmezliğine bağlı ensefalopati durumunda görülebilen asteriksis, tremor, multifokal myoklonus gibi bulgulara SİE'de oldukça nadir rastlanmaktadır (39). Bu hastalarda en sık görülen motor sistem bulgusu paratonik rijiditedir (10). Periferik sinir tutulumu genelde polinöropati şeklinde olup ekstremitelerde hareketlerinde zayıflama ve derin tendon reflekslerinde kayıp ile kendini belli eder (40) ve görülme sıklığı yaklaşık olarak %70'tir (41). Kranial sinir tutulumu periferik sinir tutulumuna göre daha az görülür. Hemiparezi gibi lateralizasyon bulgularının SİE'li hastalarda oldukça nadir görülmesinden dolayı, lateralizasyon bulgularını gösteren hastalarda öncelikle diğer patolojiler düşünülmelidir. SİE'li bazı hastalarda çekilen MR görüntülerinde değişik derecelerde vazojenik ödemin bulunduğu bildirilmiştir (20). SİE'li

hastaların yapılan BOS analizleri genellikle normal olup, bazı çalışmalarda aromatik aminoasit oranının arttığı, dallı-zincirli aminoasitlerin ise azaldığı gösterilmiştir (42, 43).

SİE tanısında kullanılan oldukça duyarlı bir yöntem de elektroensefalografidir (EEG). EEG dalgaları frekansına göre 4 dalga tipine ayrılmaktadır. Alfa dalgaları; 8-13 Hz frekansında normal bir EEG'nin en karakteristik ritmik dalgalarıdır. Beta dalgaları; 13 Hz'in üstünde frekansı olan ve alfa dalgalarına göre daha küçük dalga boylu dalgalarıdır. Sağlıklı, uyanık bir yetişkinde normal zemin ritmini oluştururlar. Teta dalgaları 4-7 Hz, delta dalgaları ise 4 Hz ve bunun altında frekansı olan dalgalarıdır. Teta ve delta dalgaları çocukluk çağında ve sağlıklı yetişkinin uyku trasesinde normal olarak saptanabilir. Uyanık bir yetişkinde çoğunlukla patolojiye işaret ederler. Ensefalopati ve ensefalitte EEG'de normal zemin aktivitesi yaygın yavaş dalga (teta, delta dalgaları) aktivitesine dönüşür. EEG değişiklikleri ile mortalite oranları arasında bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Mortalite oranları teta dalgasında orta derecede yavaşlama olanlarda %19, diffüz delta dalgası olanlarda %36, trifazik dalga eşlik ettiğinde %50, supresyon paterni varlığında %65 olarak tespit edilmiştir (44).

SİE'de en sık rastlanan patolojik değişiklik beynin çeşitli bölgelerinde iskemik lezyonların görülmesidir. Septik şoka bağlı ölen hasta beyinlerinde multifokal lökoensefalopatik lezyonların bulunduğu bildirilmiştir (45). Sepsiste görülen patolojik değişiklikleri incelemeye yönelik olarak, çeşitli modeller üzerinde yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Domuzlarda fekal peritonit oluşturularak yapılan bir çalışmada perimikrovasküler ödem, nöronal hasarlanma ve astrosit ayakçıklarında kayıp olduğu gösterilmiştir (46). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise frontal korteks ve hippocampus CA1 bölgesinde perimikrovasküler ödem geliştiği gösterilmiştir (47-49). Özellikle erişkin dönemde hippocampus'un gyrus dentatus'u nörogenez açısından önemli bir merkez durumunda olup bu nedenle hippocampus'u ilgilendiren patolojilerde etkilenmesi muhtemel görülmektedir. Öncü hücreler doğrudan etkilenebileceği gibi perimikrovasküler ödem gibi mikroçevre değişikliklerinden de dolaylı olarak etkilenebilirler. Canlı bakteri verilerek

oluşturulan bir sepsis modelinde nöronal hasarlanmaya ek olarak değişik derecelerde perimikrovasküler ödem geliştiği gösterilmiştir. Endotoksin verilerek oluşturulan sepsis modellerinde hemorajik intraserebral lezyonlar gösterilmiştir (50)

Sepsisle İlişkili Ensefalopati'nin Patofizyolojisi: SİE'nin patofizyolojisine yönelik bilgiler sınırlı ve tartışmalıdır. Pek çok araştırmacı tarafından SİE'nin multifaktöryel bir sürece bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (35, 50-53)

a- Artmış sitokin seviyeleri

Sepsisli hastalarda ve hayvan modellerinde kandaki TNF α , IL-1, interferon γ (IFN γ) gibi sitokin seviyeleri artmakta ve bozulmuş kan beyin bariyeri (KBB) aracılığıyla veya KBB'nin olmadığı sirkumventriküler organlar gibi alanlardan parankim içine sızarak beyinde birikme eğilimi göstermektedir. Beyinde artmış seviyelere ulaşan sitokinler mikroglial hücrelerde aktivasyona neden olarak bu hücrelerden NO gibi inflamatuvar mediatörler ve TNF α , IL-1 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırmakta, beyin sitokin seviyesini yükselmektedir (35, 50). TNF α 'nın, beyin dokusunda triptofandan ensefalopatik tablonun ortaya çıkışına katkısı olduğu düşünülen, nörotoksik etkili kinolik asitin prekürsörü olan kinurinin oluşumunu artırdığı düşünülmektedir (56). IFN γ 'nın astrositlerdeki indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) aktive ederek beyindeki NO seviyelerini artırdığı, NO oluşumu sırasında yan ürün olarak oluşan superoksit anyonunun beyinde oksidatif stresi artırdığı ve bu durumun da ensefalopatinin gelişiminde etkisi olduğu düşünülmektedir (51-53). IFN γ ve lipopolisakkaritin (LPS) glial hücrelere birlikte verilmesinin enerji üretim mekanizmalarının bozulmasına ve ATP üretiminin normale göre çok azaldığını gösteren çalışmalar, IFN γ 'nın nöronlarda oksijen ve glukoz yetmezliğine sebebiyet veren mekanizmaları da tetikleyerek ensefalopatik tablonun oluşumuna katkısı bulunduğunu düşündürmektedir (54, 55).

b- Kan beyin bariyerinin hasarlanması

Kan Beyin Bariyeri (KBB), suda çözünen maddelerin ve ayrıca mikroorganizmaların santral sinir sistemine (SSS) geçişinin kontrolünü

sağlayan, beynin ekstrasellüler ortamını düzenleyen, özelleşmiş serebral kapiller hücrelerin de içinde yer aldığı bir sistemdir. Beyin kapiller endotel hücreleri, aralarında sıkı bağlantılar (tight junction) bulundurmaları, fenestrasyon içermemeleri ve basal membranların astroglial ayaksı çıkıntılar tarafından desteklenmiş olmaları ile diğer organların endotel hücrelerinden ayrılırlar (56-58). Kemirgen sepsis modellerinde, KBB disfonksiyonunun beynin toksinlere maruziyetinin artması ve inflamatuvar hücre infiltrasyonundaki artış nedeniyle ortaya çıktığı gösterilmiştir. (59). KBB hasarlanmasında sıkı bağlantıların yapılarının bozulması ve pineositoz artışının sonucu endotel hücreleri, perisitler ve astrositler arasında normalde varolan etkileşimin bozulabildiği düşünülmektedir. Ayrıca LPS'e bağlı olarak ortaya çıkan nöroinflamasyonun da KBB'den sitokinlerin geçişini kolaylaştırdığı bildirilmiştir (60-62). TNF α , IL-1 β ve anjiopietin-2 gibi sitokin ve vazoregulasyon moleküllerinin artışının, perivasküler makrofajların sayı ve çoğalma kabiliyetinde artışa, monositlerin endotele yapışmasına ve endotel hücrelerinin hasarına neden olduğu düşünülmektedir (63). KBB'nin hasarlanmasının perimikrovasküler ödeme sonuçlandığı bilinmektedir (63). Perimikrovasküler ödemin endotel hücre sıkı bağlantılarındaki morfolojik yapının bozulmasına bağlı olabileceğini bildiren çalışmalar olduğu gibi beyinde intrinsik olarak üretilebilen ve sepsiste kandan beyin parankimine geçişi artan önemli anahtar bir inflamatuvar mediatör olan TNF α 'nın, aquaporin 4 (AQP4) kontrolünü etkileyerek ve bu şekilde beyin su transportu değişikliklerine neden olarak perivasküler ödeme sebebiyet verdiğini öne süren çalışmalar da bulunmaktadır (64).

c- Aminoasit düzey değişiklikleri

SİE'de KBB'nin bozulmasına bağlı olarak intravasküler sıvının beyin dokusuna geçişinin artmasına eşlik edecek şekilde aromatik aminoasitler, dallı zincirli aminoasitler gibi bir takım substratların da beyin parankimine geçerek burada biriktiği düşünülmektedir (44, 46, 48, 65). Sepsisli hastalarda aromatik aminoasit seviyelerinin kanda daha yüksek olması nedeniyle beyindeki konsantrasyonlarının da dallı-zincirli aminoasitlere göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Aminoasit düzey ve oranlarında görülen bu

değişikliklerden dolayı dopamin, noradrenalin, serotonin gibi nörotransmitterlerin beyin konsantrasyonlarının azaldığı, nörotransmitterlerdeki bu değişikliğe bağlı olarak da ensefalopatik tablonun derinleştiği düşünülmektedir (66).

d- Glutamat toksisitesi

Sepsis'de beyin glutamat konsantrasyonlarının beş kat arttığı ve artış gösteren glutamatın N-metil-D-aspartik asid (NMDA) reseptörlerine bağlanarak nöronlar üzerinde toksik etki oluşturduğu bildirilmiştir (20). NMDA reseptör antagonisti verilen sıçanlarda LPS'in neden olduğu nöronal hasarlanmanın azaldığını gösteren çalışmalar bu görüşü desteklemektedir (20, 35). Glutamat normalde astrositler tarafından sodyum-bağımlı bir transport mekanizması ile ortamdan uzaklaştırılmakta iken, LPS ve IFN γ verilen sıçanlarda astrosit tarafından gerçekleştirilen glutamat geri alımının azaldığı ve beyin parankiminde artan glutamatın nöronal hasarlanmaya neden olarak ensefalopatiye katkı sağladığı gösterilmiştir (20).

e- Oksidatif strese artma ve antioksidanların azalması

Peroksinitritler hücre membranındaki lipitleri, hücresel proteinleri, DNA'yı oksitleyebilmekte ve böylece hücrede toksik etki göstermektedir (68). Sepsisli hastalarda beyinde artmış NO seviyelerine bağlı olarak NO'den peroksinitrit oluşumunun arttığı ve artan peroksinitritin beyin dokusunda oksidatif strese artışa neden olduğu düşünülmektedir (69). C vitamini, E vitamini ve selenyum gibi endojen antioksidanların ise oksitleyici ajanları inhibe ettiği bilinmektedir (20). Askorbik asitin (C vitamini) beyin parankiminde hücresel metabolizma sonucu oluşan süperoksit radikallerini indirgediği ve beyin askorbik asit konsantrasyonlarının periferik kan konsantrasyonlarından etkilendiği düşünülmektedir. Sepsisli hastalarda kan ve beyindeki C vitamini seviyelerinin düşük konsantrasyonda olduğu saptanmış, bu durumun askorbik asitin beyin parankiminde artmış olan süperoksit radikalleriyle savaşını olumsuz etkilediği ve ensefalopati gelişimine katkı sağladığı öne sürülmüştür (70, 71).

f- Nöron ve glia hücrelerindeki artmış apoptoz

Sharshar ve ark. (2004) sepsis nedeniyle ölen hastaların beyinlerinde yaptıkları çalışmalarda beynin çeşitli bölgelerinde ve otonom çekirdeklerde apoptotik hücre ölümünün arttığını göstermişlerdir (72). Ceacum ligasyon ve perforasyon (CLP) modeliyle deneysel sepsis oluşturulan sıçanlarda, serebellum purkinje hücrelerinde, hippocampus'un CA1 bölgesindeki nöronlarda, koroid pleksus hücrelerinde apoptozun artmış olduğu gösterilmiştir (73). LPS verilerek oluşturulan endotoksemi sonrasında beynin farklı alanlarında (hippocampus, ortabeyin, cerebellum) apoptoza neden olan bax gen ekspresyonunun arttığı, anti-apoptotik bcl-2 gen ekspresyonunun azaldığı, zamana bağlı olarak iNOS immünoreaktivitesinin giderek arttığı ve iNOS inhibitörleri verilerek bu sürecin tersine çevrilebildiği gösterilmiştir (50). Endotoksemiye bağlı olarak ortaya çıkan iNOS artışı sonrasında NO yapımında artış olmakta ve bu artış neticesinde mitokondriden sitokrom-c salınımı meydana gelmekte, sitokrom-c'ninde kaspaz 9 aktivasyonuna yol açarak apoptotik hücre ölümünü gerçekleştirdiği bildirilmektedir (16). Gerek insanlarda gerekse çeşitli hayvan sepsis modellerinde beynin değişik bölümlerinde apoptotik hücre ölümünün arttığını gösteren bu çalışmalar apoptoz'un SİE patogenezinde önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir.

g- İyatrojenik nedenler

Sepsisli hastaların büyük bir kısmı yoğun bakım ünitelerinde yatmakta, genellikle solunum desteği sağlanması amacıyla mekanik ventilasyona ihtiyaç duymakta ve bu nedenle sedatize edilmektedir. Sedasyon amacıyla kullanılan ilaçların metabolizması, sepsisli hastalarda LPS'nin yapmış olduğu sitokrom p450 enzim sistemi inhibisyonu ve sepsise bağlı organ yetmezlikleri nedeniyle atılımın azalmasından dolayı yavaşlamaktadır. Kandaki seviyeleri yükselen bu sedatize edici ilaçların beyin konsantrasyonlarının artarak sepsisle ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisine katkı sağladığı öne sürülmüştür (74). Sepsisli hastalara uygulanan yüksek konsantrasyondaki intravenöz (i.v.) antibiyotik tedavileri sonucu bu ilaçların da beyindeki konsantrasyonlarının yükseldiği, konvulzif ve non-konvulzif

nöbetlere yol açtığı düşünülmektedir (75). Ayrıca septik şok tedavisine yönelik yüksek miktarlardaki sıvı tedavilerinin, elektrolit dengesizliğine neden olarak ensefalopati durumunu ağırlaştırabildiği ifade edilmektedir (20, 75).

Özet olarak bugün için SİE'nin patofizyolojisi tam olarak anlaşılmış değildir ve açıklamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Günümüze kadar ortaya konan çalışmalar SİE'nin tek bir mekanizmaya bağlı olmayıp multifaktöryel olduğu yönünde önemli deliller ortaya koymaktadır.

Deneysel Sepsis Modelleri

Yoğun bakım ünitelerindeki hasta çeşitliliği ve geniş çaplı klinik çalışmaların maliyetinin yüksek olması gibi olumsuz faktörler nedeniyle, sepsiste hayvan çalışmaları, sepsise ilişkin karanlıkta kalmış konuların aydınlatılabilmesi ve sepsis tedavisinde kullanılabilecek yeni immünomodülatör ajanların denenmesi açısından günümüzde hala değerini korumaktadır. 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 (75). Vasküler geçirgenlik çalışmalarında, akciğer damarlarının geçirgenlik özellikleri dolayısıyla koyunlar, sitokin çalışmalarında ise immünolojik yapılarının insana benzemesi nedeniyle primatlar tercih edilen hayvan türleridir (76). Sepsis modelleri oluşturulurken küçük memeli deney hayvanlarının tercih edilmesinin en önemli faydaları; göreceli ucuz olmalarının yanısıra insana olan genetik benzerliklerdir. Bu hayvanların deney süresince yaşamda kalmalarının sağlanması ise aşılması gereken önemli bir nokta olarak görülmektedir (84). İdeal bir septik hayvan modelinin basit, deneylerin kolaylıkla tekrar edilmesine olanak tanıyan ve doza/işleme bağımlı yanıt oluşturan, yeterli klinik bulguları sergileyen ve yeterli sitokin yanıtı ile bakteriyolojik bulguları ortaya çıkarabilen bir model olması gerekmektedir. Ayrıca, sepsis tablosunun lokal başlayıp dereceli olarak yayılan bir gelişim izlemesi arzu edilmektedir. Bilimsel açıdan anestezi kullanılmayan şartlar

altında ilerleyen bir deney süreci tercih edilse de bu etik olarak kabul edilir değildir (84). Tüm bu gerekçelerle mevcut tez çalışmasında Wistar Albino türü sıçanlar kullanılmıştır.

Çeşitli bilimsel çalışmalarda kullanılan sepsis modelleri; (1) endotoksin ve endotoksikoz modelleri, (2) bakteri infüzyon modelleri, (3) peritonit modelleri olmak üzere üç ana başlık olarak karşımıza çıkmaktadır (78).

1. Endotoksin ve Endotoksikoz Modeli

Endotoksin, gram negatif bakteri duvarında bulunan fosfolipit, polisakkarit ve proteinden oluşan, ısıya dirençli yüksek molekül ağırlıklı kompleks bir maddedir. Endotoksin içerisindeki LPS bileşeni endotoksikoz oluşturmakta kullanılan, dayanıklı yapısı ile liyofilize halde depolanabilen ve gerektiğinde bolus ya da sürekli infüzyon şeklinde uygulanabilen ve tüm bu özellikleriyle sepsis çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir moleküldür (78). LPS'nin intraperitoneal (i.p.) veya i.v. olarak deney hayvanlarına verilmesi sepsis benzeri bir tablonun oluşumuna yol açmaktadır (85). Bu nedenle LPS, gram negatif sepsis oluşturulmasında, endojen sitokinlerin ve tamamlayıcı proteinlerin salınımının deneysel olarak uyarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, endotoksin cevabı türler arasında büyük farklılıklar göstermekte, aynı tür içinde yaş, cinsiyet, östrojen düzeyi, kilo, diyet gibi faktörlerden de etkilenebilmektedir. İnsan, tavşan, koyun ve domuzlar LPS'ye karşı oldukça duyarlı iken deney hayvanı olarak kullanılan sıçanlar ve babunlar gibi bazı türlerin ise LPS'nin etkilerine karşı göreceli olarak dirençli olduğu bilinmektedir (80). Bu nedenle deney hayvanlarında, özellikle sıçan gibi dirençli kemirgenlerde LPS ile birlikte öldürücü organizmaların ya da D-galaktozamin, kurşun asetat, berilyum fosfat ve karbontetraklorid gibi LPS'ye karşı duyarlılığın artırılmasını sağlayan moleküllerin LPS uygulanımı ile kombine edildiği yöntemler geliştirilmiştir (80).

Deneysel olarak oluşturulan endotoksemi ile klinik sepsis arasında önemli farkların bulunduğu gösterilmiştir (82, 83). Sepsisli hastalarda hiperdinamik ve hipodinamik faz olmak üzere iki ayrı hemodinamik evre gözlenmektedir. 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 (84). Endotoksinin bolus ve tek doz enjeksiyonu sonrasında birçok hayvan türünde direkt olarak hipodinamik faz gelişmekte ve inflamatuvar sitokinlerin kan seviyelerinde hızlı fakat geçici bir yükseliş gözlenmektedir (85). Sepsisli hastalarda ise inflamatuvar sitokinlerdeki artışın daha geç ve göreceli bir yükseliş ile meydana geldiği ve kandaki seviyelerinin uzun bir süre yüksek kaldığı bildirilmektedir (78). İntravenöz düşük doz endotoksin infüzyonu ise başlangıçta kardiyak debide artışa neden olmaktadır. Bu modelde düşük doz ve uzun süreli endotoksinin i.v. yol kullanılarak uygulanması subklinik koagülopatiye ve geç dönemde çoklu organ yetmezliği bulgularına sebep olabilmektedir (86).

LPS, vücuttaki etkilerini hücre membranında yer alan TLR-4 üzerinden göstermekte (87) ve infüzyonu sonrasında kandaki pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinde artış meydana gelmektedir (88). LPS infüzyonu yapılan hayvanlarda, TNF α antikolların verilmesiyle TNF α 'nın blokajı sağlandığı ve bu sayede bu hayvanların yaşama sürelerinde belirgin bir artış gözlemlendiği bildirilmiştir (89, 90). Sepsisli hastalarda yapılan çalışmalarda ise TNF α blokajının yaşam süresi üzerine belirgin bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (91). TNF α ve IL-1 seviyelerinin sepsisli hastalarda endotoksikoz oluşturulan hayvanlar kadar yüksek seviyelere çıkmaması nedeniyle pro-inflamatuvar sitokinlerin azaltılmasına yönelik tedavi yöntemlerinin başarılı sonuçlar vermediği düşünülmektedir (78).

Günümüzde, endotoksemi modeli çalışmalarının büyük bir kısmı yüksek miktarlardaki LPS'nin tek doz şeklinde i.p. veya i.v. verilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Yüksek miktarlardaki LPS'nin tek doz şeklinde bolus olarak verilmesi yöntemin kullanımının kolaylığı sebebiyle araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih ediliyor olsa da, LPS modelinin bu şekilde uygulanmasının sepsisli hastalardaki hemodinamik değişiklikleri ve dolaşımda saptanan sitokin seviyelerini tam olarak yansıtmadığı görülmektedir. LPS modelinde kullanılan sepsis tedavi yöntemlerinin sepsisli

hastalarda etkisinin olmadığı, tersine mortalite oranlarını artırdığını gösteren çalışmalar bu yöntemin kliniğe uyarlanmasında dikkate değer dezavantajları bulundurduğunu düşündürmektedir (90, 91).



2. Bakteriyel İnfüzyon Modelleri

Sepsiste, pozitif kan kültürü saptanması hastalığın şiddeti ile orantılıdır. Bu oran sepsiste %17, ciddi sepsiste % 25 ve septik şokta %69 olarak bildirilmiş ve bakteriyeminin varlığı ile sepsisin sonucu arasında bir bağlantı olabileceği öne sürülmüştür (84). Bu nedenle deneysel sepsis modeli olarak, laboratuvar şartlarında elde edilmiş bir bakteriye ait suşun LPS yerine direkt olarak deney hayvanlarına verilmesi de kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (84). Bu yöntemde bakteri izolatları, damar içine veya periton içine enjekte edilerek sepsis oluşturulmaktadır (84). En çok tercih edilen bakteri E. coli olmakla beraber gram negatif olarak pseudomonas türlerinin, gram pozitif bakteri olarak S. aureus'un (babun, domuz, köpek) ve B grubu streptokok (fare ve domuz) türlerinin de kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (84). Ayrıca maya formlarından C. albicans da sıçanlarda bu amaçla tercih edilebilmektedir (82, 84). İzotonik sıvı ile sulandırılan saf bakterinin i.p. uygulamanın da etkili olabilmesi için çok yüksek miktarlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle bakteriler, i.p. olarak verilirken tek başlarına uygulanabileceği gibi "yardımcı" adı verilen maddelerle (steril feçes, baryum sülfat, hemoglobün, fibrin, agar, müsin) karıştırılarak da verilebilmektedir (84,86). Bakterilerin i.v. uygulanmasının ardından vücutta meydana getirdiği patofizyolojik değişiklikler daha önce yapılmış olan birçok hayvan çalışmasıyla ortaya konmaya çalışılmıştır (92-94). Bakteriyel infüzyon modelinde, kullanılan bakterilerin miktarı ve infüzyon süresi çalışmalar arasında farklılık göstermektedir. Küçük memeli hayvanlarda E. coli'nin i.v. olarak düşük dozlarda verilmesi, saatler içerisinde minimal düzeyde fizyolojik değişikliklere yol açmakta iken daha yüksek dozlarda verilmesi sıklıkla kardiyak output'ta erken dönemde artış, geç dönemde ise azalış olmak üzere bifazik değişikliklere yol açmaktadır (95). Büyük memeli hayvanlarda ise (*domuz ve babun gibi*) bakterilerin genellikle yüksek dozlarda kullanıldığı ve bu durumun eğer sıvı replasmanı uygulanmıyor ise sıklıkla hayvanların ölümü ile sonuçlandığı ve bu sebeple sepsis modelinden çok intoksikasyon modeline benzediği düşünülmektedir (92). Domuzlarda i.v. olarak gram pozitif veya gram negatif bakteriler

verilerek oluşturulan sepsis modelinde, farklı bakteri türlerinin meydana getirdiği etkilerin değişiklikler gösterdiği saptanmıştır (96). Bu çalışmada gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus*'un i.v. uygulanması sonrasında hayvanlarda minimal düzeyde kardiyopulmoner değişiklikler 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. Bakteriyel infüzyon modelindeki mortalite oranları, verilen bakteri miktarına göre değişiklik göstermekte ve bu özelliği nedeniyle periton içine direkt olarak fekal içeriğin uygulanması yöntemine kıyasla daha kontrollü bir sepsis modeli olduğu da ileri sürülmektedir (97).

Bakteriyel infüzyon modelleri, çalışma pratiği açısından CLP ve colon ascendens'e stent yerleştirilmesi (CASP=colon ascendens stent peritonitis) gibi invaziv cerrahi yöntemlere göre kullanım kolaylığı sağlaması ve mortalite oranlarının manipülasyonuna olanak sağlaması nedeniyle araştırmacılar tarafından tercih edilmekle beraber bu yöntem kullanılarak oluşturulan sepsis modelinde, uygulanan canlı bakterilerin vücutta kolonize olamaması ihtimali veya yüksek miktarlarda verilmesi durumunda ise sepsis modelinden çok bir intoksikasyon modeli olarak değerlendirilebilmesi nedeniyle yöntemin kliniğe uyarlanmasında kısıtlamalar bulunmaktadır. Ayrıca sepsisli bir hastada enfeksiyon odağından aralıklı olarak değişik miktarlarda bakterinin kan akımına karıştığı düşünüldüğünde, bu modelin klinik sepsisi tam olarak yansıtmadığı da düşünülebilir (84).

3. Peritonit Modelleri

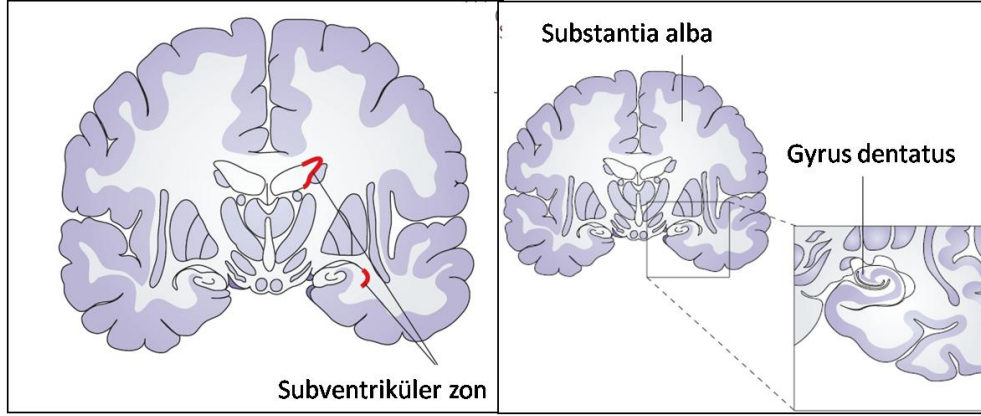
Konak savunma sistemlerinin ve hastalık kaynağının kontrolünün iyi sağlanması durumunda, peritonun bakteri ile karşılaşması hastalığa neden olmayabilir. Mikrobiyal bulaşma eğer periton ve genel konak savunma sistemlerinin baş edebileceği düzeyden daha fazla ise ilk aşamada sistemik bir yanıt oluştuktan sonra sepsis ve septik şok gelişebildiği bildirilmektedir (17). Antibiyotik tedavisi, i.p. yıkama ve kaynak kontrolü sağlanması durumunda ise hastalığın kontrolü ve iyileşmesi mümkündür. Bakteriyel kültür peritonit modelleri ve hayvanların kendi fekal içeriklerinin kullanılarak oluşturulan havuzlanmış fekal inokulum modellerinin yanı sıra endojen

floranın gastro-intestinal sistemden cerrahi olarak serbest bırakılarak bir enfeksiyon odağı oluşturulması temeline dayanan deneysel sepsis çalışmaları da sıkça kullanılan diğer yaklaşımlar olarak görülmektedir. İzole devaskülarize bağırsak segmenti, CLP yöntemi ve CASP bu amaçla kullanılan yöntemlerdir (98). İzole devaskülarize ince bağırsak segmenti modeli, bağırsak duvar bütünlüğü bozulmadan bir iskemik ince bağırsak segmenti oluşturulması ve bu devaskülarize bağırsak segmentinin karın içerisinde nekrozunu takiben peritonit gelişmesine dayanır (98). CASP modeli ise colon ascendens'e değişik çaplarda stent yerleştirilmesi ile oluşturulan ve daha çok farelerde tercih edilen bir peritonit-sepsis modelidir (98). Yerleştirilen stent çapı ile mortalite arasında sıkı bağlantı bulunmaktadır. Yöntem uygulandıktan sonraki 18-48 saat içinde kullanılan stent çapı 14 G ise mortalite %100, çap 18 G ise %68, 22 G ise %39 olarak bildirilmiştir (96). Bu yöntemde stent kalış süresi de mortalite oranlarını etkileyebilmekte, stent 3 saat bırakıldığında mortalite görülmemekte, 9 saat kaldığında ise mortalite %100 olmaktadır (81). CLP modeli, insanlardaki rüptüre apandisit veya perforate divertiküliti taklit eden bir yöntem olması nedeniyle sepsisle ilişkili çalışmalarda oldukça sık kullanılan bir model olarak göze çarpmaktadır. Başlangıçta sıçanlar üzerinde geliştirilmiş bir yöntem olsa da diğer türlerde de (fare, koyun ve domuz gibi) başarı ile uygulanabilmektedir (97, 98). CLP modelinde orta hattan yapılan 2 cm'lik bir insizyon ile caecum ortaya çıkarılmakta, valva ileocaecalis distalinden caecum bağlanmakta ve yine bir iğneyle (18, 20 ve 22 gauge) caecum'da iki delik oluşturularak fekal içeriğin periton içine geçmesi sağlanmaktadır (81). Kullanılan iğne kalınlığı ve caecum'un bağlanma yüzdesi mortalite oranlarını etkilemekte ayrıca yaşa bağlı da değişik yanıtlar ortaya çıkabilmektedir (78). Bu modelde mortalitenin genç farelerde %20, olgun farelerde %70, yaşlı farelerde ise %75 olduğu ve genç farelerin antibiyotik tedavisine daha iyi yanıt verdiği bildirilmiştir (80, 99). CLP modelindeki sitokin seviyeleri sepsisli hastalardakine benzer bir seyir göstermektedir (99). Ayrıca sepsiste görülen erken hiperdinamik ve geç hipodinamik fazın ikisi de bu yöntemde izlenebilmektedir (100). CLP modelinin, bu özellikleri nedeniyle insanlarda gelişen sepsis tablosunu iyi bir

şekilde taklit edebildiği düşünölmekte, diğör invaziv olmayan yöntemlerden daha agresif ve daha uzun süreli bir yöntem olmasına rağmen, tercih edilen girişim olma özelliğini korumakta ve CLP modeli, sepsis araştırmaları için “altın standart” yöntem olarak kabul edilmektedir (80, 97). İleriye yönelik yapılması planlanan sepsis çalışmalarında insanlardaki septik tabloyu daha iyi taklit ettiği düşünölen diğör sepsis modellerinin (CLP ve CASP gibi) kullanılması, sepsisli hastalara yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ve insanlardaki sepsis patofizyolojisinin açıklanmasında daha geçerli bilgiler sağlayabilecektir. Bu gerekçelerle mevcut tez çalışmasında deneysel sepsis modeli olarak CLP tercih edilmiştir.

Erişkin Nörogenez

Erişkin nörogenez; fetal ve erken postnatal gelişim sona erdikten sonraki dönemde yeni nöronların oluşması ve mevcut sinir ağlarına entegre olma sürecidir. Erişkin memeli beyinde nörogenezin (yeni nöron oluşumunun) pek çok bilimsel çalışma ile yadsınamaz biçimde gösterilmesi ile, sinir sisteminin tüm yaşam boyunca yapısal olarak durağan olduğu ve yeni nöron oluşumunun mümkün olmadığı yönündeki yerleşik kanı değişmiş, özellikle son on yılda sinir bilimlerinde en heyecan verici ve hızla gelişen araştırma alanlarından biri haline gelmiştir. Çoğu memeli türünde, erişkin nörogenez iki temel beyin bölgesinde meydana gelir: hippocampus’un gyrus dentatus’u (GD) ve subventriküler zon (SVZ) (Şekil-2). Bununla birlikte, primatlarda prefrontal, inferior temporal, posterior parietal neokorteks bölümlerinde (102, 103), sıçanlarda anterior neokortekste yeni nöron oluşumunun gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (104).



Sekil-2: İnsanda hippocampus'un gyrus dentatus'u ve ventriculus lateralis bölümleri (102).

Nörogenez birbirinden bağımsız iki farklı süreçten oluşur. Birinci süreç hücre çoğalmasını kapsarken ikinci süreç ise nöronal özelliklerin kazanılmasını sağlayan farklılaşma aşaması ile genç nöronların bir bölümünün elimine olduğu, diğerlerinin ise olgunlaşmasını tamamlayarak işlevsel hale geldiği aşamaları içerir. Birbirini takip eden bu süreçlerin başlatılması ve düzenlenmesini sağlayan mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Erişkin SSS'de yeni oluşan nöronlar, glial hücre popülasyonu içindeki "kök hücre" ve "progenitor hücre" olarak isimlendirilen iki tip hücreden meydana gelirler. Kök hücreler farklılaşmamış, çoğalabilen, kendi kendini yenileme yeteneğine sahip, çok sayıda değişik hücre tipine farklılaşma özelliği olan hücrelerdir ve bu hücreler SSS'de iki bölge haricinde sessiz, sakin bir durumda bulunurlar. SVZ ve hippocampus'un GD'de ise çok yavaş olarak birkaç haftada bir bölünürler. Progenitor hücreler ise çoğalma yeteneğine sahip, mitotik hücrelerdir ve hızlı bölünürler ancak kendi kendilerini yenileme özellikleri yoktur. Sinir sisteminin üç ana hücre tipine (nöronlar, astrositler ve oligodendrositler) farklılanabildiklerinden multipotansiyel olarak sınıflandırılmışlardır. Her iki hücre tipi de, (kök hücreler ve progenitor hücreler) nöronal prekürsör hücreler olarak kabul edilirler (105, 106). Nöronal prekürsör hücrelerinden yeni nöron oluşumu fizyolojik nörogenezin gerçekleştiği SVZ ve GD ile sınırlı olmadığı, özellikle hasarlanma ve beyin fonksiyon bozuklukları gibi durumlarda daha belirgin

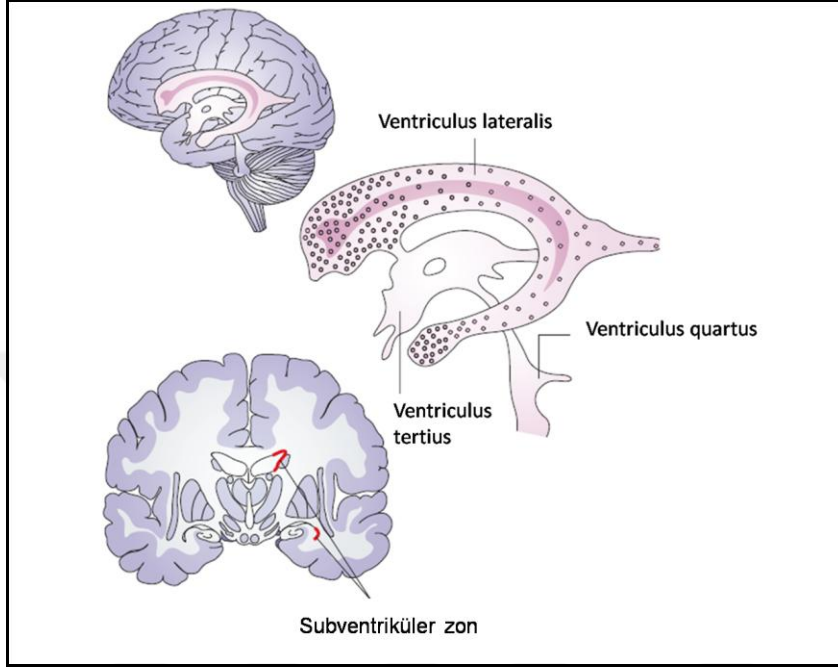
olmak üzere pek çok farklı sinir sistemi bölgesinde de çoğabildiği ve nöronal ağa katılarak beyin hafıza ve öğrenme gibi fonksiyonlarına katkı sağlayabildiği de gösterilmiştir (107-109). SSS'ne yönelik algılamamızda köklü değişimlere neden olmuş, çeşitli SSS hastalıkları ve hasarlanmalarında yeni tedavi yaklaşımlarının da önünü açmış, heyecan verici bilimsel çalışmalar gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Nörogenez çalışmaları henüz çok yeni olmasına rağmen, öğrenme ve hafıza, epilepsi, depresyon ve sinir sisteminin diğer pek çok rahatsızlığını daha iyi kavramamızı sağlamış, beyin ve omurilik yaralanmaları ve hastalıklarının tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi umudunu yaratmıştır. Son on yılda yaşanan tüm hızlı gelişmelere rağmen pek çok sorunun henüz yanıtlanmamış olması, nörogenez çalışmalarının yakın gelecekte de heyecan verici ve yoğun ilgi gören bir araştırma alanı olacağını düşündürmektedir. Bu temel gerekçelerle mevcut çalışmada sepsis ve sepsisle ilişkili ensefalopatide nörogenezin nasıl etkilendiğinin araştırılması hedeflenmiştir.

Subventriküler Zon ve Nörogenez

Subventriküler zon (SVZ), ventriculus lateralis'in dış duvarı boyunca uzanan ve yetişkin memeli beyinlerinde yeni nöron üretiminin gerçekleştirildiği germinal bir merkez olarak kabul edilmektedir (110). ventriculus lateralis'in septuma bakan iç duvarında ve corpus callosum'a komşu olan tavan kısmında SVZ'nin yer almadığı görülmektedir (111, 112) (Şekil-3).

Tüm yetişkin memelilerde SVZ'de üretilen yeni nöronlar rostral yönde bulbus olfactorius'a doğru göç etmekte ve bulbus olfactorius'taki internöronların oluşumuna katkıda bulunmaktadır (113-115). Lois ve Alvarez-Buylla; (113) fare beyinlerinde yaptıkları çalışmalarda SVZ'de bilateral olarak hergün 30.000 yeni hücrenin üretildiğini bildirmiştir. SVZ'de hücre çoğalması en fazla ventriculus lateralis'in rostralinde yer alan dorsolateral köşede gerçekleşmekte, dış duvarda kaudale doğru inildiğinde görece olarak çoğalma azalmaktadır (113). Özetle, SVZ yetişkin beyinde progenitör hücreler açısından önemli bir depo görevi görmekte, SVZ'den izole edilen kök hücrelerin, epidermal growth factor (EGF) veya fibroblast growth factor

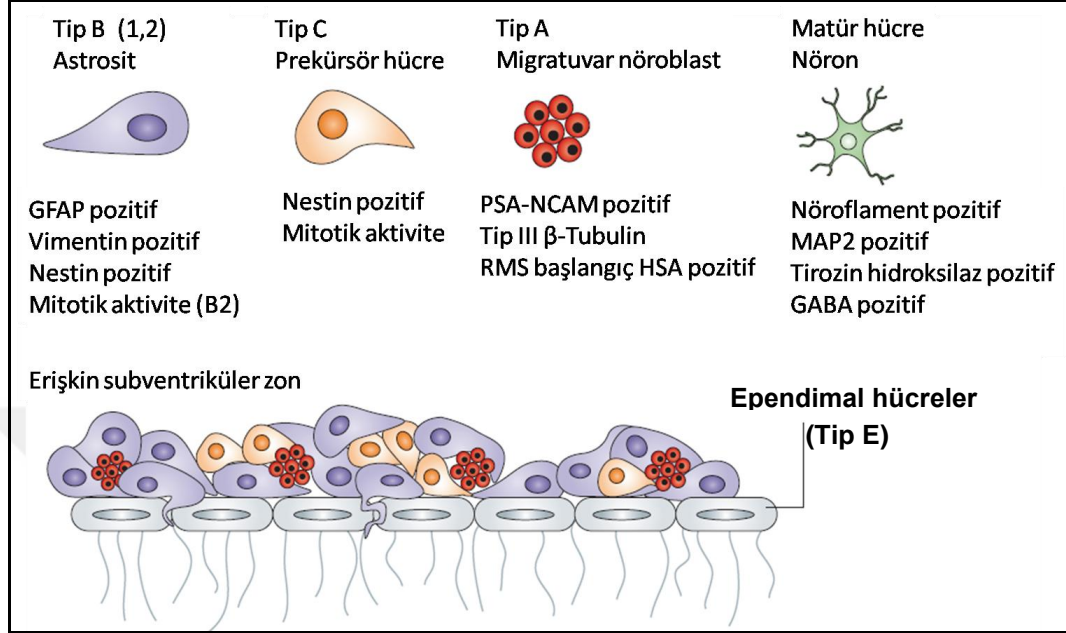
(FGF) eklenen kültür ortamlarında çoğalabildiğini gösteren çalışmalar, bu hücrelerin çeşitli SSS hastalıklarının tedavisinde yeni açılımlar sağlayabileceğini düşündürmektedir (118-120).



Şekil-3: Ventriculus lateralis'in subventriküler zonu (SVZ): Ventriculus lateralis'e yerleştirilmiş siyah noktaların sayısı ventriculus lateralis'in o bölümünün nörogeneze katkısını, kırmızı çizgiler ventriculus lateralis'in dış duvarında nörogenezin gerçekleştiği bölümleri göstermektedir (111).

Günümüzde SVZ-bulbus olfactorius sistemi nöronal kök hücre, nörogenezis, genç nöronların göçü ve farklılaşması gibi konuların aydınlatılabilmesi açısından yoğun olarak çalışılan deneysel bir model haline gelmektedir. Subventriküler zonda moleküler, morfolojik ve ince yapısal özellikleri ile farklılıklar gösteren dört hücre tipi bulunduğu gösterilmiştir (112, 119). SVZ boyunca göç edebilen ve zincirler oluşturan nöroblastlar (tip A hücreleri), nöroblastların oluşturduğu zinciri dıştan adeta kılıf gibi saran astrositler (tip B hücreleri), nöroblastların oluşturduğu zincirin hemen bitişiğinde yer alan ve yüksek derecede çoğalabilme özelliği gösteren prekürsör hücreler (tip C hücreleri) ve matürasyonunu tamamlayan nöronlar önde gelen hücre tipleri arasında yer almaktadır (Şekil-4). Bunlara ek olarak

SVZ'nin ventriküler boşluktan ayrılmasını sağlayan ependimal hücre (tip E hücresi) tabakası da bulunmaktadır (Şekil-4).



Şekil-4: Subventriküler zonda prekürsör hücrelerin yerleşimi. GFAP, glial fibriler asidik protein; HSA, ısı stabil antijen; GABA, γ -aminobütirik asit; RMS, rostral göç akımı; PSA, polisialik asit; MAP-2, mikrotübül bağlantılı protein; NCAM1, nöronal hücre adezyon molekülü (111).

$[^3\text{H}]$ -timidin injeksiyonu ile hücrelerin işaretlenmesi sonrasında hızlı çoğalma gösteren tip C hücrelerinin yanında tip B ve tip A hücrelerinin de bölünebildiği gösterilmiştir (120). Tip E hücrelerinin de in vivo olarak bölünebildiği ve dolayısıyla SVZ'de kök hücreler olarak görev alabileceği ileri sürülmüş olsa da bu görüş elektron mikroskopik çalışmalar ile desteklenememiştir (124, 126). Bölünebilme özelliğine sahip tip B ve tip C hücrelerinin yeni nöronların yani tip A hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunabilecekleri (113, 127, 128), tip A hücrelerinin kendileri de bölünebilme özelliğine sahip olduğundan yeni tip A hücreleri oluşturabildikleri ve bu çoğalma süreci ile SVZ'de oluşan ve bulbus olfactorius'a doğru göç eden hücrelerin yerine yenilerinin konulabildiği öne sürülmüştür (124). Fakat tip A hücrelerinden oluşan kültürlerin kendilerini yenileyemedikleri yalnızca tip B ve/veya tip C hücreleri ile zenginleştirildiklerinde çoğalabildikleri gösterilmiştir

(124). Daha önceki çalışmalarda SVZ'deki astrositlerin (tip B hücrelerinin) bölünebildiği fakat bu hücrelerin basitçe çoğalarak daha fazla sayıda glia hücrelerinin oluşmasını sağladığı düşünülmekte iken daha yakın zamanda yapılan çalışmalar tip B hücrelerinin SVZ'de üretilen yeni nöronların primer prekürsörü olabileceğine de işaret etmektedir (119, 120). Nitekim tip A ve tip C hücrelerinin antimitotik ilaçlarla devre dışı bırakıldığı çalışmalarda, SVZ astrositlerinin (tip B hücreleri) bölünerek yeni tip C hücreleri oluşturabildiği ve sonrasında ise tip C hücrelerinden tip A hücrelerine dönüşüm gerçekleştiği bildirilmiştir. Rous sarkoma virüsü (avian retrovirüs) ile işaretlenen astrositlerin (tip B hücrelerinin), bu virüs ile işaretli yeni nöronlara dönüştüğünü ve bu nöronların da bulbus olfactorius'a doğru göç ederek buraya entegre olduklarını ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (124, 125). Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda tip B hücrelerinin yeni oluşacak nöronlar için primer prekürsör görevi gördüğü, *in vitro* olarak nöronal kök hücrelere benzer şekilde çoğalıp büyüdüğü ve yeni hücreler meydana getirebildiği düşünülmektedir (119, 120). Astrositik özellikler taşıyan tip B hücrelerinin nörojenik bir potansiyel taşıması daha önce yaygın olarak kabul edilen nöroglial hücrelerin nöronlardan farklı bir soydan geliştiği düşüncesiyle çelişmektedir. Astrositlerin embriyonel gelişim sırasında radial glia hücrelerinden köken aldığı bilinmektedir (120). Bazı hayvan türlerinde (kanarya gibi) radial glia hücrelerinin yetişkin dönemde de varlığını koruduğu ve yeni nöronlar için primer prekürsör görevini üstlendiği gösterilmiştir (125). Yakın dönemde yapılan çalışmalar memelilerdeki neokorteks gelişimi esnasında radial glia hücrelerinin nöronal kök hücre olarak görev yaptığını işaret etmektedir (120). Tüm bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda SVZ'de yer alan nöronal kök hücrelerinin muhtemelen nöroepitelyal-radial glial-astrozit şeklinde gelişim gösteren tip B hücrelerine karşılık geldiği ve SVZ'deki tip B hücreleri tarafından başlatılan çoğalma aktivitesinin tip B → tip C → tip A şeklinde bir süreç izlemesi kuvvetle muhtemeldir (126-128).

SVZ'de oluşan yeni hücreler hedef alanları olan bulbus olfactorius'a doğru uzun bir mesafe kaydedecek şekilde göç ederler. SVZ'de gerçekleşen nörogenez sonrası üç temel aşama gerçekleşir.

1. Göç (2-6 gün): Yeni oluşan A hücreleri; özelleşmiş astrositler tarafından oluşturulan bir yapı olan rostral göç akımı (RMS) boyunca bulbus olfactorius'a doğru göç eder ve bulbus olfactorius'un ortalarına ulaştıklarında oluşturdukları zincirden ayrılarak, göçlerini radial düzlemde sonlandırırlar. Bu göçün gerçekleşmesinde bulbus olfactorius'un glomerüler tabakasından kaynaklanan ekstrasellüler bir matriks glukoproteini olan Tenascin R gibi moleküllerin rolü olduğu düşünülmektedir (129).

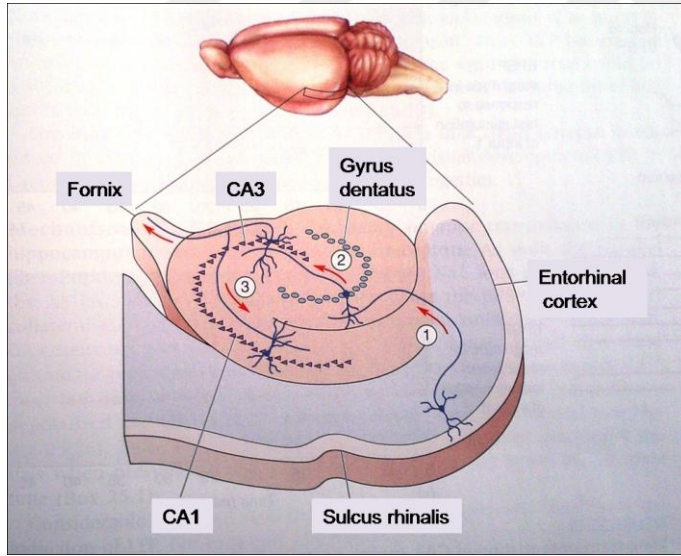
2. Nöronal farklılaşma (15-30 gün): Bulbus olfactorius'a ulaşan lokal nöroblastlar intrabulbar internöronların iki tipine farklılanırlar. %75-99'u GABA aktivitesine sahip periglomerüler hücrelere, %1-25'i ise GABA ve/veya tirozin hidroksilaz aktivitesine sahip granüler hücrelere dönüşürler (129).

3. Lokal sinir ağına katılım (15-30 gün): Yeni oluşan granül hücreleri ve periglomerüler nöronlar bulbus olfactorius'un lokal sinir ağına katılır ve koku uyarısına cevap vermeye başlarlar (129-132).

Hippocampus ve Nörogenез

Hippocampus (cornu ammonis), serebral hemisferlerin medial bölümünde ventriculus lateralis'in cornu inferior'unun tabanı boyunca uzanan 5-8 cm uzunluğunda limbik sisteme ait bir oluşumdur. Hippocampus, Grekçe "denizati" (hippos=at, kampos =deniz canavarı) anlamına gelmektedir. Hippocampus koronal kesitlerde birbiri içerisine giren iki "C" harfi şeklinde bilaminer yapı gösterir. Ammon boynuzu (cornu ammonis) ve gyrus dentatus'un birlikte oluşturduğu görünüm, at balığı (*Hippocampus spp.*) türünü anımsatmaktadır (133-135). Hippocampus; formatio hippocampi adı verilen anatomik yapılar topluluğu içinde yer almaktadır. Formatio hippocampi terimi hücre yapısı özellikleri açısından birbirinden farklılıklar gösteren, birbirinden farklı anatomik bölgeleri kapsamaktadır. Bu bölgeler; gyrus dentatus, cornu ammonis 1, 2, 3 ve 4. alanlarından (CA1, CA2 ,CA3 ve CA4) oluşan "asıl hippocampus" (hippocampus proper), subiculum, (presubiculum, subiculum proper, parasubiculum) ve entorhinal kortekstir. Bu gruptamanın asıl gerekçesi, adı geçen bölümlerin büyük oranda tek yönlü projeksiyonlarla birbirlerine bağlandıkları sinaptik ağıdır. Bu sinaptik ağın başlangıcı özellikle assosiasyon alanları başta olmak üzere cortex cerebri'

nin geniş bir bölümünden, thalamus ve amygdala gibi subkortikal bölgeden kaynaklanan uyarıların sonlandığı entorhinal kortekstir. Entorhinal korteks nöronları subiculum'u perfore ederek yollarına devam ettiklerinden "Delici Yol" adı verilen aksonları, gyrus dentatus'un granüler nöronlarında sinaps yaparlar. Gyrus dentatus'un granüler nöron uzantılarının oluşturduğu "Yosunsu Lifler" ise CA4 ve özellikle de CA3 bölgesine projekte olurlar. CA3 ve CA4 bölgesinin nöronlarına ait aksonlar alveus ve fimbria'ya doğru ilerlemeden önce verdikleri "Schaffer" kollateralleri ile CA1 nöronlarıyla bağlantı kurarlar. CA1 nöronlarına ait aksonlar da tıpkı CA3 bölgesi nöronları gibi alveus ve fimbria'ya doğru ilerlemeden önce subiculum'da sonlanan kollateral uzantılar verirler. Son olarak subiculum'dan başlayan glutaminerjik lifler de önce alveus ve sonra da fimbria'nın büyük bölümünü oluştururlar. Bu trisinaptik yapı içerisindeki temel yolları oluşturan entorhinal korteks, GD, CA ve subiculum bu nedenle tek bir ünite gibi değerlendirilir ve formatio hippocampi olarak adlandırılırlar (Şekil-5).

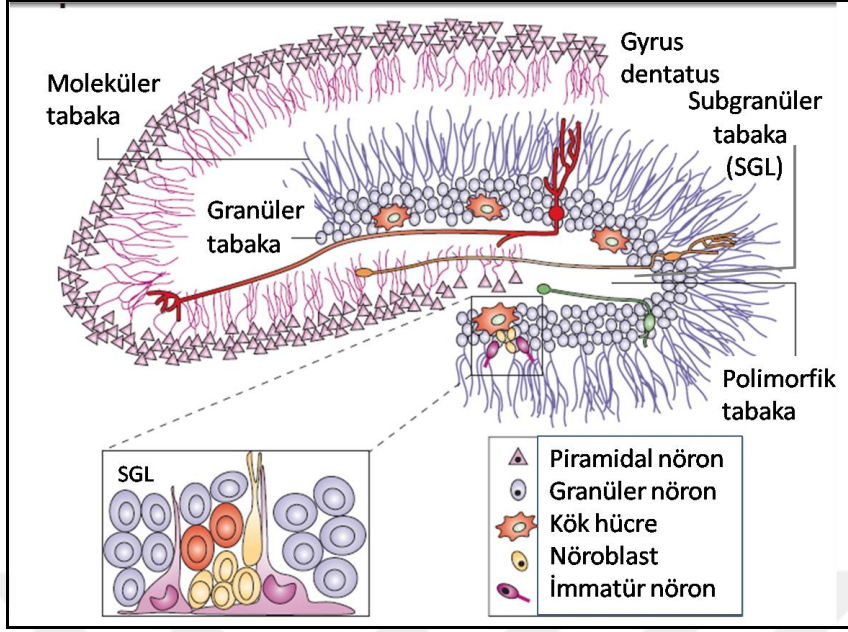


Şekil-5: Hippocampus'un bağlantıları 1- Entorhinal cortex'i gyrus dentatus'a bağlayan delici yollar. 2- Gyrus dentatus'un granüler hücrelerini CA3 bölgesi üzerindeki piramidal nöronlara bağlayan yosunsu lifler. 3- CA3 bölgesindeki nöronlardan başlayan ve CA1 bölgesindeki piramidal nöronlarla sinaps yapan Schaffer kollateralleri (136).

Yapılan pek çok çalışmaya rağmen hippocampus ve formatio hippocampi'nin temel fonksiyonları halen tartışmalıdır. Papez'in 1937 yılına uzanan çalışmaları sonrasında hippocampus'un ana fonksiyonunun

duygulanımın düzenlenmesi olduğu (137, 138) ancak, daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar hippocampus'un, duygulanımdan daha çok hafıza ile yakın ilişkide olduğu düşünülmektedir (139). Fonksiyonel görüntüleme yöntemlerindeki gelişmeler ve davranış modellerini temel alan çalışmalardaki artışla birlikte, hippocampus'un hafıza oluşumu ve öğrenme üzerindeki rolleri henüz anlaşılmaya başlanmıştır (140).

Hippocampus'a ait bölgeler arasında yer alan gyrus dentatus'un üç tabakadan meydana geldiği gösterilmiştir (Şekil-6). Hippocampal fissura yakın ve göreceli olarak hücreden fakir olan kısım moleküler tabaka olarak tanımlanırken, moleküler tabakanın altında granül hücrelerinin sık yerleşimli kolumnar paketlerini içeren asıl hücre tabakası ya da granül hücre tabakası bulunmaktadır. Granül hücre ve moleküler tabakalar, "v" ya da "u" şeklini alarak polimorfik hücre tabakasını (polimorfik tabaka, gyrus dentatus'un üçüncü tabakası) sarmaktadırlar. Granüler hücre tabakası ile polimorfik hücre tabakası arasında subgranüler tabaka (SGL) olarak adlandırılan; kemirgen, maymun ve insanlarda çoğalabilme özelliği taşıyan hücrelerin bulunduğu tabaka yer almaktadır (141-144). Bu bölgede yer alan kök-benzeri hücrelerin Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) pozitif hücre popülasyonundan geldiği ve SVZ'de tanımlanan tip B hücrelerinin eşdeğeri olduğu düşünülmektedir (145). SVZ'deki bu hücreler D hücreleri olarak da isimlendirilirler. Antimitotik sitarabine (Ara-C) maruz bırakıldıklarında, hızlı bölünme yeteneğine sahip D hücrelerinin ortamdaki elimine olduğu, tedavinin kesilmesinden sonra bazı B hücrelerinin bölünmeye başladığı ve takip eden birkaç gün sonra ise D hücrelerinin oluşmaya başladığı gösterilmiş, B hücrelerinin kök hücre ve D hücrelerinin ise progenitör hücre özelliğinde olduğu öne sürülmüştür (146). B hücrelerinin avian retrovirus ile işaretlendiği diğer bir çalışmada, bu hücrelerden granüler hücrelerin oluştuğu ve bu yeni oluşan granüler hücrelerden köken alan yosunsu liflerinin CA3 bölgesine uzandığı gösterilmiştir (147).



Şekil-6: Gyrus dentatus ve bölümleri (148).

Subgranüler hücre tabakasında oluşan ve granüler hücre tabakasına sınırlı bir göçe uğradığı gösterilen progenitor hücrelerin yaklaşık iki ay süren bir süreç içerisinde nöronal farklılaşmaya uğradığı ve olgunlaşarak lokal sinaptik ağı katıldığı düşünülmektedir (149). Gyrus dentatus'da oluşan yeni nöronların matürasyon süreci aşağıdaki gibidir.

- 1 hafta: İmmatür nöronlar çoğu kez moleküler tabakaya doğru polarize olmayan uzantılar oluşturmaya başlarlar. Çok az sayıda ama eksitator özellikteki lokal GABA'ya duyarlı sinapslar oluşur.
- 1-2 hafta: Dendritler moleküler tabakaya doğru, aksonlar ise polimorfik tabakaya doğru uzanmaya başlarlar. Eksitator sinaptik GABA uyarıları alınmaya başlar, inhibitör uyarılar henüz oluşmamıştır. Hücre direkt uyarıldığında immatür aksiyon potansiyellerinin oluştuğu görülebilir.
- 2-3 hafta: Moleküler tabakaya uzanan dendritlerde spine (dikensi çıkıntı) oluşumu başlar. Glutaminerjik inhibitör uyarılar alınmaya başlar. CA3 bölgesindeki piramidal hücreler ile fonksiyonel bağlantılar kuran aksonların (yosunsu lifler) oluştuğu görülür.

- 3 hafta-2 ay: Oluşan nöronlar dendritik dallanmalarını, spine oluşumunu ve sinaptik bağlantılarını artırır. Yosunsu lifler matürasyona devam eder.

- 2 ay sonrası: Diğer nöronlardan fizyolojik olarak ayrımı mümkün olmayan nöronlar haline gelirler (150).

Yapılan güncel çalışmalarda; matürasyon sürecinde, zenginleştirilmiş çevre ortamının (151-153) gyrus dentatus'da nörogenez sürecini hızlandırdığı, oluşan hücrelerin iskemi gibi durumlarda (154) CA bölgesine göç ederek CA bölgesi nöronlarına farklılaşabildiği bildirilmektedir.

Nörogenezin Kontrolü

Literatürde nöronal prekürsör hücrelerin çoğalmasına, farklılaşmasına ve göçüne etki eden çeşitli faktörler bildirilmiş olmakla birlikte, erişkin sinir sisteminde nörogenezi kontrol eden mekanizmalar kesin olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Nörogenezin kontrolünde rol oynadığı düşünülen faktörler genellikle iki temel başlık altında toplanmaktadır. (i) intrinsik (sellüler) faktörler, (ii) ekstrinsik (ekstrasellüler, çevresel) faktörler

i. İntrinsik faktörler

Nörogenezde meydana gelen hücre çoğalmasının kontrolünde retinoblastoma proteini (Rb) ve onunla ilişkili proteinler (p107 ve p130), nektin, E₂F protein ailesinin anahtar rol oynayan moleküller olduğu düşünülmektedir (155). Defosforile halde iken E₂F ile bağlanarak transkripsiyonu baskılayan ve hücrenin G1 fazından S fazına geçişini engelleyen Rb'nin cyclin bağımlı kinazların (CDK) aktivasyonu ile fosforile olduğunda G1 fazının geç dönemlerinde E₂F'nin serbest bırakılmasına ve hücrenin S fazına girerek hücre siklusunun başlamasına sebep olduğu bildirilmektedir (156). Rb proteinin defosforilasyonu ve böylece hücre çoğalmasının baskılanması ise CDK inhibitörlerinin iki üyesi tarafından gerçekleştirilir: (1) P15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d}'yi içinde barındıran CDK₄ inhibitör ailesi, (2) p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1} gibi kinaz inhibitör protein ailesidir (157). Sonuç olarak Rb proteininin seviyesindeki artışın nöronal

progenitör hücrelerin mitoza girişi için önemli bir adım olduğu ve çoğalma üzerine etkisini E₂F proteinlerini serbestleyerek hücre siklusunun G₁ fazından S fazına girmesini sağlayarak gösterdiği söylenebilir (158, 159).

ii. Ekstrinsik faktörler

1. Hormonlar ve Nörosteroidler

Adrenal Kortikosteroidler: Erişkin nörogeneze etkisi bilimsel olarak ilk çalışılan faktörlerden biri kortikosteroidlerdir. Bilateral adrenalectomi uygulanarak kortikosteron salınımı baskılanan sıçanlarda GD'da glial ve nöronal hücrelerde çoğalma saptanırken, SVZ'de mitotik aktivitede herhangi bir değişiklik görülmemesi bu hormonun bölgeye spesifik inhibitör etkisi olabileceğini düşündürmüştür (160). Kortikosteronun nörogenez üzerine inhibitör etkisi; (i) akut ve kronik kortikosteron uygulanan, (ii) stres oluşturulan, (iii) hipotalamo-hipofizer adrenal eksen aktivitesinde farklılıklar oluşturulan diğer modeller üzerinde yapılan çalışmalar ile de gösterilmiştir (160). Kortikosteronun hücre çoğalması üzerine olan baskılayıcı etkisini nasıl gösterdiği tam olarak aydınlatılamamışsa da yapılan *in vitro* çalışmalarda hücre siklusunun G1 fazını bloke ettiği, bu etkiyi de CDK'yı aktive ederek Rb'nin fosforile olmasını sağlayan mediatörleri (cyclinD₁, cyclinD₂, CDK₄/CDK₆) baskılayarak ve kinaz inhibitörlerini (p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1}) uyararak gerçekleştirdiği öne sürülmüştür (160).

Gonadal Hormonlar: GD'un granüler hücre tabakasında hücre çoğalmasının dişi sıçanlarda erkeklere kıyasla daha yüksek, çoğalma aktivitesinin menstruel siklusta östrojenin yüksek olduğu dönemlerde daha fazla olduğunun ve ovariectomi sonrası azalan hücre çoğalmasının 17β estradiol verilerek düzeltilebildiğinin gösterilmesi, dişi gonadal hormonlarının hücre çoğalmasına uyarıcı etkisi olduğunu düşündürmektedir. Ancak yüksek estradiol seviyelerine rağmen, granüler hücre tabakasında estradiolün çoğalmasına etki etmediğini ya da azaldığını öne süren aksi yönde çalışmalar da bulunmaktadır (160).

Nörosteroidler: Nörosteroidler periferik kaynaklardan bağımsız olarak beynin pek çok bölgesinde de sentez edilen steroid alt grubu maddelerdir (36). Başlıca formatio hippocampi'de glial hücreler tarafından

sentez edilen bu steroidler hippocampus ile ilişkili fonksiyonlara etki ederler (349). Farmakolojik özelliklerine göre iki temel gruba ayrılırlar; (i) GABA_A reseptör antagonisti dihidroepiandroesteron (DHEA) ve pregnanolon sülfat (Preg-S) ile (ii) bu reseptörde agonist etki oluşturan allopregnanolon (AlloP) (333). Genç erişkin sıçanlara on iki gün süreyle uygulanan DHEA'nın hippocampus'ta hücre çoğalmasını stimule ettiği kortikosteronun nörogenezi baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırdığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (160). Bu etkinin tersine AlloP uygulanan erişkin sıçanlarda ise hücre çoğalmasının azaldığı gösterilmiştir (160). Sonuç olarak, en azından *in vitro* ortamda GABA_A reseptör aktivasyonunun hücre çoğalmasını azalttığı, GABA_A reseptör antagonistlerinin ise hücre çoğalmasını uyardığı düşünülmektedir.

2. Nörotransmitter ve Nöromodulatörler

Glutamat: Yapılan çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar, glutamatın hippocampus'ta hücre çoğalmasına etkisinin kompleks bir olay olduğunu ve glutamatın NMDA reseptörleri üzerinden hücre çoğalmasını baskılayan α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) reseptörlerini etkileyerek çoğalma aktivitesini artırabildiğini düşündürmektedir (160).

Serotonin: Serotonin GD'da ve SVZ'de hücre çoğalmasını artırdığı, serotonin sentezinin inhibisyonu veya beyinde nucleus raphe gibi serotoninergik nöronların hasarlanması sonrasında hem GD'da hem de SVZ'de BrdU işaretli hücre sayılarının azaldığı bildirilmiştir (160).

Nitrik oksit: Nitrik oksit (NO) L-argininden NO sentez tarafından sentez edilen ve beyinde nörotransmitter olarak görev yapan serbest radikal moleküldür. Genç erişkin sıçanlarda nitrik oksit SVZ ve GD'un her ikisinde hem hücre çoğalmasını hem de hücre göçünü anlamlı derecede artırdığı gösterilmiştir (160).

3. Trofik Faktörler

Erişkin beyninde mitojenik aktivasyon gösterebilen pek çok trofik faktör tanımlanmıştır. Nörogenezin kontrolünde etkisi en fazla çalışılan trofik

faktörler ile bu faktörlerin etkilerini gösterdikleri nörogenez bölgesi etki şekli ve etkilediği süreç Tablo-3'de özetlenmiştir.

4. Nörogenezin Düzenlenmesinde Etkisi Olduğu Düşünülen Diğer Faktörler

a- Morfojenler: Santral sinir sisteminin gelişiminde önemli etkileri olduğu bilinen Sonic hedgehog (shh) ve kemik morfojenik proteinleri (BMP=Bone morphogenic protein) erişkin nörogenezin kontrolünde rolü olduğu düşünülen diğer faktörlerdendir (170). Shh'nin kültür ortamında erişkin sıçan hippocampus'unda progenitor hücrelerin çoğalmasını doza bağımlı olarak artırabildiği (170), *in vivo* olarak ise ekzojen shh kullanımının hücre çoğalmasını artırdığı bildirilmiştir (170). BMP'nin ise erişkin SVZ'unda nörogenezi inhibe ettiği BMP antagonisti Noggin verildiğinde nörogenezin uyarıldığı gösterilmiştir (171).

b- Astrositler: Ekstrasellüler mikroortamın homeostazında önemli rolü olduğu bilinen astrositlerin de nörosteroidler, sitokinler, büyüme faktörleri, glutamat metabolitleri ve/veya çeşitli iyonların lokal salınımı ile nörogenezi düzenlediği ileri sürülmektedir (160).

Tablo-3: Nörogenez sürecine etki gösteren trofik faktörler ve etkileri.

Trofik Faktör	Etki Gösterdiği Bölge	Etki Şekli	Etkilediği Süreç	Kaynak
FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)	SVZ	Artma	Çoğalma/ Göç/ Farklılaşma	161
	GD	Etkisiz	Etkisi yok	162
EGF (Epidermal Growth Factor)	SVZ	Artma	Çoğalma	163
	GD	Etkisiz	Etkisiz	164
HB-EGF (Heparin Binding Growth Factor)	SVZ	Artma	Çoğalma	165
	GD	Artma	Çoğalma	164
TGF- α (Transforming Growth Factor- α)	SVZ	Artma/Azalma	Çoğalma	166
	GD	Bilinmiyor	Bilinmiyor	
IGF-1 (Insulin Growth Factor)	SVZ	Bilinmiyor	Bilinmiyor	
	GD	Artma	Çoğalma/ Farklılaşma	167
BDNF (Brain Derived Growth Factor)	SVZ	Artma	Çoğalma/ Farklılaşma/ Sağkalım	168
	GD	Bilinmiyor	Bilinmiyor	
VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor)	SVZ	Artma	Çoğalma	169
	GD	Artma	Çoğalma	

(SVZ, subventriküler zon; GD, gyrus dentatus)

c- Hücre ölümü: Nörolojik yapıların boyutlarının değişmemesi gözlemine dayanarak, nörogenez ile hücre ölümü arasındaki homeostatik bir dengenin nörogenezi regüle eden bir faktör olduğu da öne sürülmüştür (160).

Sonuç olarak; erişkin memeli beyinde görülen nörogenezin kontrolünün; yapılan çalışmalarla sayıları her geçen gün artan ekstrinsik faktörün bir denge içerisinde kontrolü altında olan, çeşitli patolojik süreçlerden farklı yönde etkilenen ve hücre içerisinde moleküler düzeyde kontrol edilen bir süreç dahilinde gerçekleştiğini düşünmek mümkündür.

Nörogenez Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Nörogenezin saptanmasında kullanılan yöntemler; (i) yeni nöronların köken aldığı çoğalmakta olan hücrelerin gösterilmesi ve (ii) çoğalan hücrelerin fenotipinin belirlenmesine yönelik yöntemler olarak iki bölüme ayrılır.

(i) Çoğalmakta Olan Hücrelerin Gösterilmesi

Erişkin memeli beyinde nörogenezin ilk *in vivo* kanıtları ventriculus lateralis'in SVZ'u ve GD'un SGZ'da DNA sentezi sırasında (hücre siklusunun sentez fazında) hücreye katılan kullanımına dayanmaktadır. Bu yöntemde mitotik aktivasyon gösteren hücreler [³H] thymidine kullanımını takiben otoradyografi ile gösterilebilmektedir (172, 173). Son yıllarda ise [³H] thymidine yerine thymidine'in halojenize edilmesi ile elde edilen modifiye bir pyrimidine analogu olan Bromodeoksiuridin (BrdU), çoğalmakta olan hücre DNA'sının işaretlenmesinde tercih edilir hale gelmiştir. Beyinde stereolojik çalışmaların yürütülebilmesine olanak tanınması, kesit işlem süresinin daha kısa olması ve çalışmaların daha hızlı yapılabilmesi, düşük maliyeti ve daha az radyasyonla işaretlenmiş materyal ile temas gerektirmesi [³H] thymidine yerine BrdU'nun tercih edilmesinin temel nedenleridir. Bunun dışında BrdU, diğer hücre işaretleyicileri ile birlikte kolaylıkla kullanılabilen bu da yeni oluşan hücrelerin çift veya üçlü immünohistokimya yöntemleri ile fenotiplenebilmesine olanak tanımaktadır. Bu nedenle mevcut çalışmada, çoğalan hücrelerin işaretlenmesinde yaygın olarak kullanılan ve nörogenez çalışmalarında altın standart olarak değerlendirilen BrdU immünohistokimyası ile nörogenezin saptanması tercih edilmiştir (172). Aşağıda nörogenezin saptanmasında kullanılan yöntemler özetlenmektedir.

1- BrdU İşaretleme

BrdU işaretleme yöntemi, hücre siklusunun sentez fazı sırasında bölünmekte olan hücre çekirdeğine giren BrdU'nun canlı memelilere çeşitli yollarla dışarıdan verilmesi ve elde edilen dokularda bir anti-BrdU antikoru kullanılarak immünohistokimyasal olarak gösterilmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. BrdU işaretleme yöntemi ilk defa çoğalmakta olan tümörleri göstermek için 1989 yılında kullanılmış ve takip eden yıllarda sinir sisteminin

gelişiminde hücre çoğalmasını inceleyen çalışmalarda yaygın olarak tercih edilmiştir (174). İnsan da dahil olmak üzere erişkin memeli beyinde nörogenezin varlığının gösterilmesi ile BrdU işaretlemesinin kullanıldığı erişkin nörogenezi inceleyen çalışmalar hızla artmıştır. Nörogenez çalışmalarında, BrdU intracerebroventricular (i.c.v.) (175), i.p. (176), i.v. (177) enjeksiyon şeklinde veya oral olarak uygulanmış (178) olsa da primat ve kemirgenlerde gerçekleştirilen erişkin nörogenez çalışmalarında i.p. ve i.v. enjeksiyonlar sıklıkla tercih edilmektedir (177, 178). BrdU uygulaması, hayvanlarda ağrı ve stresi azaltma amacıyla çeşitli deney biçimlerinde içme suyuna katılarak (1-1,5 mg/ml-2 hafta) kullanılmış olsa da bu uygulamada günlük alım dozunun belirlenmesi mümkün değildir.

BrdU bölünmekte olan hücrelerin yalnızca sentez (S) fazında olan çekirdeklerini işaretler. Bir hücre siklusu yaklaşık 10-12 saat kadar olduğu ve bu sürenin üçte biri S fazına ait olduğu düşünüldüğünde tüm çoğalmakta olan hücre popülasyonunun tamamına yakınına yakını gösterebilmek amacıyla değişik doz ve uygulama şekilleri denenmiştir (179-182). Gage ve arkadaşları (183) tarafından kullanılan ilk BrdU işaretleme protokolünde günlük 50mg/kg BrdU'nun i.p. olarak ve 10-12 gün süre ile kullanımı tercih edilmiş olsa da yıllar içerisinde yapılan farklı çalışmalar ile alternatif dozların kullanımı (tek yüksek doz 200-600 mg/kg gibi) önerilmiştir. BrdU enjeksiyon dozu ve uygulama sayısının ilgililenen alana (SVZ için GD'ye oranla daha az sayıda enjeksiyonun yeterli olması gibi), deneylerin yürütüldüğü memeli türü ve yaşına (domuz, sıçan, ya da genç ve yaşlı hayvanlar gibi) ve incelenecek fenomene göre (nörogenezi azaltan ya da artıran klinik tablolar gibi) değişiklik gösterebileceği bildirilmiştir (181, 184). BrdU'nun deneklerin dekapitasyonundan iki saat önce 200 mg/kg i.p. tek doz verilmesinin yeterli beyin konsantrasyonuna ulaşmayı ve nöronal işaretleme sağladığı ve kemirgenlerde 300mg/kg'ın üzerindeki tek dozların bir avantajı olmadığı bildirilmiştir (184). Bu nedenle mevcut çalışmada; sıçanlar dekapite edilmeden iki saat önce 200 mg/kg BrdU'nun i.p. olarak uygulanması tercih edilmiştir.

BrdU işaretleme yöntemi S fazındaki çoğalmakta olan hücrelerin belirlenmesinde etkin bir yöntem olsa da bazı dezavantajlarının olduğu unutulmamalıdır. Bunlardan başlıcaları; BrdU'nun

a- Canlı hayvanlara enjeksiyonu dolayısı ile ek invaziv süreçleri gerektirmesi

b- Hücre DNA'sına DNA tamiri sırasında da katılabilmesi ve dolayısı ile mitoz dışında DNA onarımı gerçekleşen hücreleri de işaretleyebilmesi

c- Bir mutajen olması nedeniyle genetik toksikoloji gibi çalışmalarda kullanımının uygun olmamasıdır.

2- Tritiated [³H] Thymidine

[³H] thymidine hippocampus'ta, bulbus olfactorius'ta ve cortex cerebri'de erişkin nörogenezin gösterilmesini hedefleyen erken dönem çalışmalarda kullanılmıştır (160, 161). [³H] thymidine doğal thymidine yerine DNA'nın yapısına stabil olarak katılır ve hücresel seviyeleri emülsiyon otoradyografisi kullanılarak tespit edilir. [³H] thymidine otoradyografisi oldukça güvenilir ve yüksek duyarlılık oranına sahip olsa da emülsiyon otoradyografisinin 3-4 haftalık bir inkübasyon gerektirmesinin getirdiği zaman kaybı, emülsiyon ve radyoaktif maddelerin temini ve eliminasyonun oluşturduğu yüksek maliyet, çoklu işaretleme ve stereolojik yöntemler için uygun olmaması gibi nedenlerle günümüzde nadir tercih edilir bir yöntem haline gelmiştir.

3- Endojen Hücre Bölünme Belirteçleri

Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA) ve Ki67 gibi endojen proteinlerin ekspresyonu hücre çoğalmasının gösterilmesinde kullanılan alternatif yöntemlerdir. BrdU ve [³H] thymidine mitozun yalnız S-fazındaki hücrelerde etki gösterirken PCNA ve Ki67, hücre siklusunun Go fazı hariç, G1, S, G2 gibi tüm aktif fazları boyunca eksprese edilirler. Bu nedenle bu iki belirteç ile daha fazla çoğalmakta olan hücrenin işaretlenmesi mümkündür. İlk kez Miyachi ve ark. (1978) tarafından tanımlanan PCNA, DNA sentezi için gerekli enzimler olan DNA polimeraz δ ve ϵ 'in yardımcı proteindir (186). PCNA immünohistokimyası gerek temel tıp araştırmalarında gerekse cerrahi

patolojide diagnostik amaçlı olarak yaygın olarak kullanılmıştır (187). Ancak PCNA'nın çoğalmakta olan hücrelerin belirlenmesindeki değeri, tespit edilebilen PCNA düzeylerinin;

a- Farklı hücre tipleri arasında değişkenlik göstermesi (malign ve normal hücreler gibi) (187)

b- Kullanılan fiksatif ve antijen geri kazanım yöntemine göre değişkenlik göstermesi (187)

c- DNA onarımında da eksprese olması gibi nedenlerle tartışmalı durumdadır.

Hücre çoğalmasının belirlenmesinde kullanılan bir diğer immünohistokimyasal yöntem olarak kullanılan Ki67 bölünen hücrelerde mitotik aktivitenin tüm zamanlarında tespit edilebilen nükleer proteindir ve DNA tamiri gerçekleşen hücrelerde saptanması ile BrdU'ya üstünlük sağlar. Ki67'nin çeşitli tipteki malignitelerin belirlenmesinde, diagnostik bir araç olarak kullanılmasının faydalı olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (185). Ancak Ki67'nin hücre siklusu sırasındaki yeri ve lokalizasyonuna, tanısal değerine, farklı hücre tiplerindeki salınma özelliklerine, yarılanma ömrüne, fiksasyon ve boyanma özelliklerine yönelik olumlu ve olumsuz yönde değişebilen farklı düşüncelerin bulunduğu da belirtilmelidir (185).

4- Viral vektörler

Thyimidine analogları dışında replike olan hücrelerin işaretlenmesinde viral vektörler de kullanılabilirler (188, 189). Bu amaçla kullanılan retrovirüsler modifiye onkovirüslerdir ve herhangi bir enfeksiyona neden olmadan hücre içinde kalabilmektedirler. Retrovirüslerin ilgilenilen beyin bölgelerine lokal infüzyon ile verilebilmesi ve yalnızca bölünen hücreleri etkilemesi nedeniyle yüksek spesifitesi olan bir yöntemdir. Ancak bu durum invazif bir yöntemi gerektirdiğinden, çok sayıda hayvan kullanılan deneyler için zaman kaybına, ilgilenilen beyin bölgesinde hasarlanmaya ve lokal hücre çoğalma değişikliklerine neden olabilmektedir (188, 189). Ayrıca bu yöntemin kantitatif analizler için uygun olmadığı, uzun süreli sağkalım sonrası gerçekleştirilen çalışmalarda, işaretli hücre sayısının

beklenenden düşük saptanmasına yol açtığı ve virüsün kendisinden veya belirteç proteinin yüksek ekspresyonundan dolayı enfekte hücre ölümüne yol açtığı gibi dezavantajları da çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (188, 189).

ii. **Çoğalan Hücrelerin Fenotipinin Belirlenmesine Yönelik Yöntemler**

BrdU ve yukarıda özetlenen diğer çoğalma belirteçleri, meydana gelen mitotik aktivite miktarını gösterirler ancak bu belirteçlerle işaretlenmiş hücre fenotipleri hakkında bilgi vermezler. Hücrelerin nörona farklılanması immatür ve matür nöronal belirteçler kullanılarak anlaşılabilir. Diğer hücre tiplerine spesifik, oligodendrosit işaretleyicisi olarak 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) ve kalsiyum bağlayan protein (S100, S100 β), astrosit işaretleyicisi olarak kullanılan glial fibriller asidik protein (GFAP) belirteçlerinin ekspresyon edilmemesi de nörona farklılaşmanın gösterilmesinde alternatif yol olarak kullanılabilir.

1. İmmatür nöron belirteçleri

“Memeli RNA bağlayıcı proteini Hu”, postmitotik nöronlar tarafından aşırı miktarda üretilen ve immatür nöronal belirteç olarak sıklıkla kullanılan bir proteindir (190). İmmatür nöronların işaretlenmesinde kullanılan diğer belirteçler; (i) bir hücre iskelet proteini olan ve tüm postmitotik nöronlar tarafından ekspresyon edilen “nöron spesifik sınıf III β tubulin (TuJ1)” (190), (ii) mikrotübül bağlantılı protein olan göç edebilen nöroblastlar tarafından ekspresyon edilen Doublecortine (DCX) (191), (iii) postmitotik nöronlar tarafından geçici olarak ekspresyon edilen TOAD 64 (turned on after division) (192) ve (iv) bir nöronal hücre adezyon kuvvet molekülü olan (PSA-NCAM)'dir (193). Bu immatür nöron belirteçlerinden bazıları gerek non-nöronal hücrelerde ekspresyon edilmeleri, gerekse nörogenezden bağımsız olarak piriform korteks gibi çeşitli beyin bölgelerinde bulunabilmeleri (TOAD 64, DCX, PSA-NCAM) bu belirteçlerin kullanıldığı yapılan çalışmaların dikkatli biçimde yorumlanmasını gerektirmektedir (191-193).

2. Matür nöron belirteçleri

Matür nöronları göstermekte en sık kullanılan spesifik belirteçler Nöron spesifik enolaz (NSE), nöron spesifik nükleus protein (NeuN) ve mikrotübül alakalı protein (MAP-2) (194). Tıpkı immatür nöronların işaretlenmesinde kullanılan belirteçler gibi matür nöron belirteçlerinin de diğer hücre tiplerini işaretleyebildiği gösterildiğinden sonuçların yorumlanmasında dikkatli olunmalıdır .

Patolojik Durumlar ve Nörogenez

Erişkin dönemde nörogenezin devam ettiğinin gösterilmesi, beyni etkileyen pek çok patolojik durumda “nörogenezin rolü nedir” sorusunu gündeme getirmiş ve yeni çalışma alanlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Beyni etkileyen patolojik durum ne olursa olsun nörogenezin bir şekilde etkilenmesini beklemek doğal olmakla beraber nörogenez artış ya da azalışının bazı durumlarda hastalığın sonucu mu yoksa hastalığın sebebi mi olduğunun ortaya konulması çok da kolay olmamaktadır. Beyni etkileyen patolojik durumlar ve nörogenez ilişkisi Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4: Patolojik durumlar ve nörogenezle olan ilişkileri.

Nörogenez artışı ile birlikte görülen hastalıklar	Nörogenez azalması ile birlikte görülen hastalıklar
Temporal lob epilepsisi	Unipolar major depresyon
İskemi	Bipolar ruhsal bozukluk
Huntington hastalığı	Travma sonrası stres bozukluğu
Travmatik beyin hasarlanması	İlaç bağımlılığı (alkol, nikotin, opioid gibi)
Beyin tümörleri	Şizofreni

Nörogenezin İşlevsel Önemi

Erişkin nörogenezin saptandığı pek çok çalışma bulunmasına rağmen erişkin nörogenezin fonksiyonel önemi, bugün için çok açık olarak ortaya konulamamıştır. SVZ'de oluşan ve RMS aracılığıyla bulbus olfactorius'a göç eden ve granül hücrelerinin sayılarının azalmasıyla sonuçlanan, yenidoğan hücrelerin genetik ablasyonunun gerçekleştirildiği bazı çalışmalarda koku duyusunun ayırımında ve koku bağlantılı hafızada herhangi bir kaybın olmadığı gösterilmiştir (195). Yine hücre adezyon molekülü eksik farelerde yapılan bir diğer çalışmada da RMS vasıtasıyla gerçekleşen göç olayında defekt ortaya çıkması durumunda granüler hücre sayılarında belirgin bir düşüş gözlemlendiği, fakat bu durumun koku duyusunun algılanmasında ve kısa süreli koku hafızasında bir azalmaya neden olmadığı öne sürülmektedir (196). Bu verilerin aksine çevrede yer alan koku uyaran zenginliğinin artırılmasının bulbus olfactorius'ta yeni nöron sayısını ve nöronal sağkalımı artırdığını ve koku hafızasında belirgin bir artışa neden olduğu öne süren çalışmalar da bulunmaktadır. Dolayısı ile SVZ'de gerçekleşen erişkin nörogenez ile koku duyusu ve hafıza arasındaki ilişki tartışmalıdır.

Hippocampus'un gyrus dentatus'u erişkin memelilerde nörogenezin devam ettiği diğer bir bölgedir. Bu bölgede oluşan yeni hücrelerin yaklaşık üç günde granüler hücre tabakasına ulaştığı, yeni hücre aksonlarının granüler hücre tabakasından CA3 bölgesine ulaşmasının ise on gün içerisinde gerçekleştiği, 16-56. günlerde ise dentritik dikensi çıkıntılarının gittikçe artmasıyla matürasyonlarını tamamlayan hücrelerin hippocampus'un sinaptik döngüsüne katıldığı bildirilmektedir (197). Bu hücrelerin aksosomatik(197), aksodendritik ve aksospinöz sinapslar yaptığı elektron mikroskopi ile gösterilmiştir (198). Yeni nöronların matür nöronlar gibi aksiyon potansiyeli oluşturdıkları, spontan postsinaptik potansiyeller oluşturma yeteneğine sahip oldukları, delici yolların uyarılmasını takiben bir yanıt ortaya çıkardıkları da bilinmektedir (197). Dolayısı ile hippocampus'un trisinaptik yapısına entegre olan bu yeni nöronların öğrenme ve hafızada önemli etkilerinin olduğu, nörogenezin ablasyonu sonrasında gyrus dentatus'da sinaptik plastisitede, uzamsal hafızada ve uzamsal hafızanın uzun süreli hatırlanmasında azalma

meydana geldiği düşünülmektedir (199). Hippocampus'ta meydana gelen nörogenezin, öğrenme ve bellek üzerine olan etkilerinin dışında duygu durumun kontrolünde de önemli rolü olduğunu düşündüren çalışmalar bulunmaktadır (200). Kronik stres durumlarında hippocampus'ta nörogenezin ciddi şekilde azaldığı, antidepresan tedavilerle bu azalmanın ve ruhsal durum bozukluğunun tersine çevrildiği bildirilmektedir (201). Antidepresan tedaviler hippocampus'taki nörogenez üzerine etki gösterirken subventriküler zon'da yer alan hücreler üzerine etkisi bulunmamaktadır (201). Çevresel zenginleştirme hippocampus'ta oluşan yeni nöronların sağkalımını, istemli egzersiz uygulamaları ise çoğalmayı artırmakta iken subventriküler zon'da aynı etkiyi göstermemektedirler (202).

Gebelikte, annelik davranışlarının ortaya çıkmasında, gebelik sırasında artış gösteren prolaktinin uyarması sonucu artan nörogenezin rolü olabileceği düşünülmektedir (203). Prolaktin reseptör defekti oluşturulan farelerde yapılan bir çalışmada, annelik davranışlarında yetersizlik olduğu ve vahşi tiplere göre gebelik sırasında nörogenezin belirgin olarak daha az gerçekleştiği (204), ventriculus lateralis'in içine prolaktin reseptör blokerleri verilen bir diğer çalışmada ise SVZ'de progenitör hücrelerin etkilendiği ve annelik davranışlarının bozulduğu bildirilmiştir (203). Dişi fareler baskın erkek fare feromonlarına maruz bırakıldığında, SVZ'de ve hippocampus'ta nörogenez artışının ortaya çıktığı ve bu nedenle nörogenez artışının dişilerin eş seçimini etkilediği de gösterilmiştir. Bu veriler, nörogenezin yalnızca sağkalım için gerekli yeni kokuların saptanmasında ve ayırımında değil, aynı zamanda tür spesifik davranışların oluşumunda da oldukça önemli olduğunu düşündürmektedir.

Nörodejeneratif hastalıklarda ve beyin yaralanma durumlarında ortaya çıkan nöron kayıplarının nörogenez ile oluşan yeni nöronlar tarafından telafi edilebileceğini düşündüren çalışmalar bulunmaktadır. Deneysel iskemi modellerinde, SVZ'den köken alan progenitörlerin striatum gibi hasarlanma bölgelerine göç edebildikleri ve burada nörona farklılanabildikleri (205) ve vasküler endotelial büyüme faktörünü aşırı eksprese eden farelerde serebral tıkanıklık sonrasında, iskemi alanında ve SVZ'de nörogenezin çok fazla

arttığı ve büyük bir miktarda fonksiyonel düzelme gerçekleştiğini öne süren çalışmalar bu yönde önemli deliller ortaya koyan örnekler olarak verilebilir (206).

Erişkin beyinde nörogenezin devam ettiğini gösteren çalışmaların bir diğer fonksiyonel önemi santral sinir sisteminin hasarlanması durumunda hücrel tedavi için potansiyel fırsatların bulunduğunu ortaya koymasındır. Bu yöndeki hücrel tedavi yaklaşımları iki şekilde planlanabilir; (i) erişkin türevli nöronal progenitör ve kök hücrelerin endojen stimülasyonu veya (ii) bu hücrelerin otolog veya heterolog transplantasyonu. Nöronal progenitör hücreler, hücrel tedavi için erişkin beyinde hasarlanmamış bölgeden izole edilebilirler, kültür ortamında çoğaltılarak beyin fonksiyonlarının onarımı için greftlenebilirler. Bu uygulamanın olası avantajları otolog olarak uygulanması sebebiyle doku uygunluk antijenleri uyumlu bir donöre ve siklosporin gibi immünsupresif ilaçlara gereksinim duyulmamasındır. Ancak beyin hasarlanmamış bölgelerinden öncü hücrelerin temini esnasında bu bölgelerde ciddi hasarlanmaların oluşabilme ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır. Gelecekte nöronal progenitör ve kök hücreleri temin etmenin diğer bir yolu, bu hücrelerin postmortem dönemde alınarak bir havuz oluşturulması ve doku uygunluğu bulunan insanlarda kullanılması olabilir (207).

Nörogenezin erişkin dönemde de devam ettiğinin ortaya konmasından bugüne kadar, erişkin nörogenezin kontrol ve fonksiyonunu anlamaya yönelik sürekli bir ilerleme kaydedilmesine rağmen, bugün önemli pek çok soru cevap beklemektedir. Bugün için gerek subventriküler zon gerekse hippocampus'ta meydana gelen erişkin nörogenezin fonksiyonel önemi ve gelişimsel avantajları hala tam olarak anlaşılmış değildir. Neden özellikle SVZ ve SGZ'de yer alan progenitörlerin devamlı çoğalarak, beyin diğer bölgeleri hariç yalnızca bulbus olfactorius ve formatio hippocampi için yeni nöronlar üretmekte olduğu sorusunun cevabı erişkin nörogenezin fizyolojik öneminin aydınlatılmasında önemli rol oynayacaktır.

Çalışmanın Amacı

Pulmoner, renal, kardiyovasküler ve gastro-intestinal sistemlerin etkilenmesiyle karakterize olan sepsis yoğun bakım ünitelerindeki ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Sepsisin neden olduğu yaygın serebral disfonksiyona bağlı olarak bu hastalarda uzun dönemde bilişsel fonksiyonlarda zayıflama, hafıza, dikkat ve konsantrasyon değişiklikleri ile karakterize sepsisle ilişkili ensefalopati, sepsisli hastalarda mortalite ve morbiditeyi olumsuz etkileyen bir komplikasyon olarak görülebilmektedir. Sepsis ve sepsisle ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisini açıklamaya yönelik çalışmalarda uniform ve geçerli sepsis hayvan modellerinin oluşturulmasının önemi çeşitli çalışmalarda vurgulanmış, endotoksikoz ve i.v. bakteriyel infüzyon modellerine kıyasla peritonit modelleri "altın standart" olarak tanımlanmıştır. Domuz ve primatlarda geliştirilen peritonit modelleri insanlarda gözlenen klinik tabloyu yansıtan en iyi deney modelleri olarak tanımlansa da, büyük hayvanların deneysel çalışmalarda kullanımına yönelik güncel yaklaşımlar ve etik kaygılar bu hayvanların kullanımını kısıtlamış, daha yaygın bulunan, daha az masraflı ve genetik benzerliği olan kemirgen gibi memelilerin bu çalışmalarda kullanımını tercih edilir hale getirmiştir (78). CLP modeli kemirgenlerde sıklıkla uygulanan ve basit, yinelenebilirliği, insanlardaki klinik tabloyla özdeşliği gibi nedenlerle sıklıkla tercih edilen bir peritonit modelidir. Ancak, CLP modeli de dahil olmak üzere hayvan çalışmalarında elde edilen sonuçların, insanlarda gözlenen sepsis ve SİE tablosunu ne denli yansıttığı tartışmalıdır. Bu noktadan hareketle CLP oluşturulan hayvanlarda: (1) Kan basıncı, kalp hızı, rektal ısı takipleri, (2) Nörolojik refleks değerlendirmeleri, (3) Beyin elektriksel aktivite kayıtları, (4) Kan testleri ve kültürleri uygulayarak, sıçanlarda CLP uygulamasının insanlardaki klinik sepsis ve SİE'yi ne ölçüde yansıttığının belirlenmesi mevcut çalışmanın ilk temel amacı olarak belirlenmiştir.

Sepsiste olumsuz bir prognostik faktör olan SİE'nin patofizyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Nöronal apoptozun, gerek insanlarda (72) gerekse çeşitli sepsis modellerinde (73) SİE gelişiminde önemli rolü olduğunu, beyinde görülen apoptozisi engellemeye yönelik ajanların

deneysel sepsis oluşturulan hayvanların yaşam sürelerini uzattığını (72) bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Santral sinir sisteminde hücre ölümüne yol açan pek çok patolojinin, GD ve SVZ gibi bölgelerde erişkin nörogenezi uyardığı bilinmektedir. Yine son dönemde inflamasyonu erişkin nörogenezin düzenlenmesinde yeni bir aday olarak ön plana çıkaran çalışmalar da bulunmaktadır (208). Tüm bu noktalardan hareketle, CLP oluşturulan sıçanlarda erişkin nörogenezin nasıl etkilendiğinin incelenmesi çalışmanın ikinci temel amacıdır.



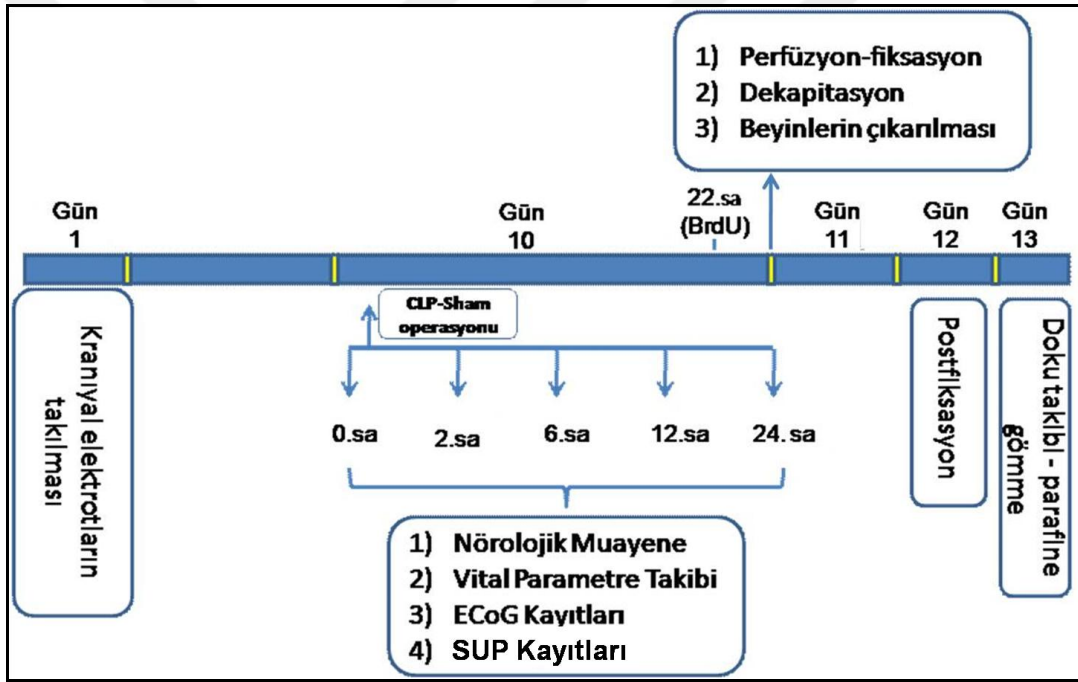
GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ve ağırlıkları 270 ± 30 gram arasında değişen 24 adet Wistar Albino türü erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen cerrahi ve deneysel protokoller Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi - Etik Kurulu'nun onayı alınarak ve i.p. olarak verilen tiopental sodyum (50 mg/kg) anestezisi altında uygulandı. Yapılan tüm invaziv işlemlerde steriliteye önem verildi ve cerrahi sonrası yara bakımı uygulandı. 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 ulaşimleri sağlandı.

Deney hayvanları protokoller öncesinde üç ayrı gruba ayrıldılar. Gruplar sırasıyla: CLP grubu, (n=8); sham kontrol grubu (n=8); non-opere kontrol grubu (n=8) olarak belirlendi. SİE gelişiminin doğrulanmasına yönelik olarak elektrokortikografi (ECoG) ve somatosensoriyel uyarılmış potansiyel (SUP) kayıtlarının alınabilmesi amacıyla her üç gruptaki deney hayvanlarına cerrahi işlemlerden 7-10 gün önce kraniyal elektrotlar yerleştirildi. Deneylerin gerçekleştirildiği gün invaziv olmayan bazal vital parametre kayıtlarını, ECoG ve SUP kayıtlarını takiben, CLP grubundaki hayvanlar ilgili sepsis modelinin cerrahi protokolü izlenerek cerrahi işlemlere tabi tutuldu. Sham grubundaki deney hayvanlarında, vital fonksiyonların ve beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi prosedürleri yanı sıra, CLP grubuna benzer şekilde laparotomi uygulandı, caecum görüldü ancak ligasyon ve perforasyon uygulanmadı. Non-opere kontrol grubunda ise vital fonksiyonların ve beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan, invaziv ve invaziv olmayan girişimler dışında, dekapitasyona kadar herhangi bir cerrahi operasyon uygulanmadı. CLP ve sham gruplarında uygulanan cerrahi

girişimler sonrasında 2, 6, 12 ve 24. saatlerde sırasıyla, (1) nörolojik muayene, (2) vital parametre monitorizasyonu, (3) ECoG kayıtları ve (4) SUP kayıt işlemleri gerçekleştirildi. Cerrahi işlemler sonrası 22. saatte her üç gruba 200mg/kg i.p. BrdU enjeksiyonu uygulandı ve 24. saat muayene ve kayıtlarını takiben anestezi verilen hayvanlar (tiopental sodyum) intrakardiyak perfüzyon ile tespit edildi (0,2 M fosfat tampon içinde, %4 paraformaldehid, ph 7,4) ve dekapitasyon sonrasında çıkarılan beyinler bir gün süre ile aynı fiksatif içerisinde bekletildikten sonra doku takibi işlemleri gerçekleştirilerek parafine gömüldü. Deneyler sırasında izlenen algoritma Şekil-7’de gösterilmiştir.



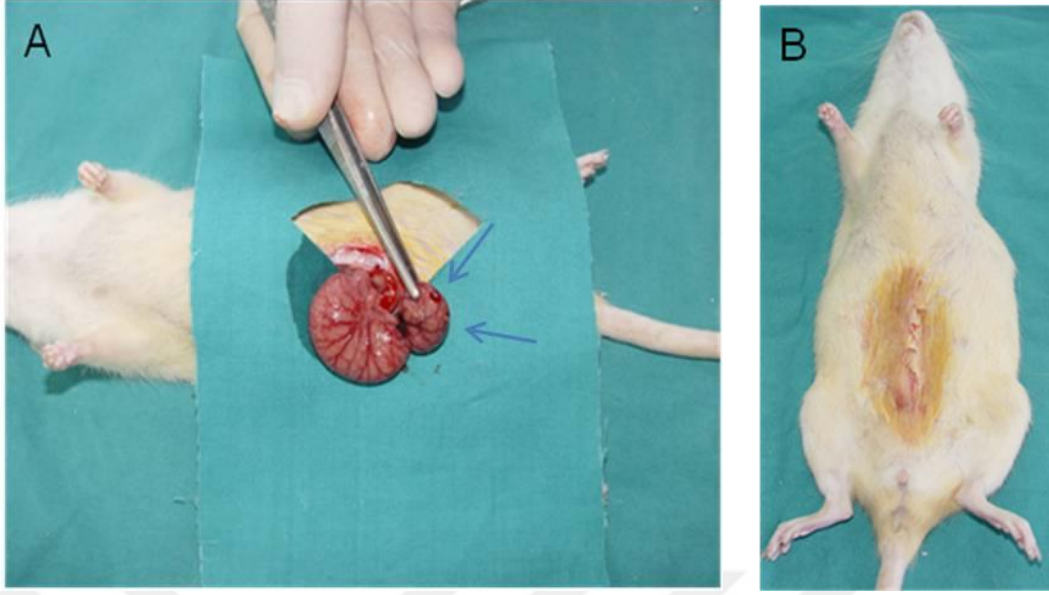
Şekil-7: Deneysel sürecin algoritması.

Abdominal Cerrahi

CLP grubunda i.p. olarak tiopental sodyum (50 mg/kg, i.p.) verilen hayvanların genel anesteziye girişi ve anestezi derinliği kuyruk refleksi ile takip edildi. Genel anestezi altındaki hayvanlarda batın aseptik şartlarda hazırlandıktan sonra, alt kadrınların orta hattından ve üretral orifisin 2 cm üstünden olacak şekilde 2 cm uzunluğunda, sagittal 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 caecum bağırsakların anatomik düzlemlerine dikkat edilerek herhangi bir dönmeye izin verilmeden steril cerrahi bez üzerine alındı. Bağırsak içeriği çıkan kolondan caecum'a doğru yapılan masajla itilerek caecum'un fekal içerikle dolması sağlandı. Gergin hale getirilen caecum, valva ileocaecalis ve çıkan kolon tekrar tespit edildikten sonra valva ileocaecalis altından ve caecum distal ¼'ünden, 4/0 cerrahi iplikle, fekal içeriğin terminal ileumdan çıkan kolona doğru olan seyrini engellenmeyecek biçimde bağlandı (Şekil-8A). Daha sonra bağlı olan kısmın 2 cm distalinde kalan caecum bölümü 22 G iğne ile antimezenterik serozal yüzden iki ayrı noktadan delindi ve caecum masajı yapılarak caecum içeriğinin bağırsak lümeni dışına serbestlenmesi sağlandı (Şekil-8A). Perforasyon oluşturulması esnasında caecum duvarındaki kılcal damarların zedelenmemesine dikkat edildi ve bağırsak duvarından kanama olup olmadığı kontrolü yapıldı. Daha sonra caecum dikkatlice anatomik pozisyonuna yerleştirildi ve batın aseptik olarak iki tabaka halinde 4/0 cerrahi iplikle suture edildi (Şekil-8B). Cerrahi işlemleri takiben 3 ml/100g serum fizyolojik cilt altına verilerek sıvı dengesinin sağlanması amaçlandı ve yara antiseptik solüsyon (% 10 polivinilpirolidoniyot) ile temizlendi. Daha sonra her sıçan kendine ait kafesine bırakıldı ve anesteziden çıkış ve düzelleme süreçleri takip edildi. Deney hayvanlarının abdominal yara bölgelerine 12. saatte topikal antibiyotik (% 0,2 nitrofurazon) uygulandı. Cerrahi sonrası, beslenme ve su içme davranışları yanında fekal çıkışları da gözlemlenerek kayıt edildi.

Sham grubunda , CLP grubunda yapılan tüm işlemler ligasyon ve perforasyon işlemleri hariç tutularak uygulandı. Bu grupta, abdominal insizyonu takiben caecum dışarı alındıktan sonra, CLP grubunda yapılan perforasyon öncesi ve sonrası işlemlere benzer şekilde masaj uygulandı ve anatomik pozisyonuna yerleştirildi. Non-opere kontrol grubunda ise abdominal cerrahi uygulanmadı ve sıvı replasmanı yapılmadı.



Şekil-8: CLP operasyonu; (A) Abdominal bölgenin aseptik olarak hazırlanmasını takiben, caecum'un ortaya çıkarılarak steril cerrahi bez üzerine alındığı, caecum'un distal 1/4'ünün bağlandığı ve sonrasında anti-mezenenterik serozal yüzden 22 G'luk iğne ile iki delik açıldığı; (B) Caecum'un yerine yerleştirilmesi sonrasında abdominal insizyonun 4/0 cerrahi ipekle suture edildiği gösterilmektedir.

Nörolojik Değerlendirme

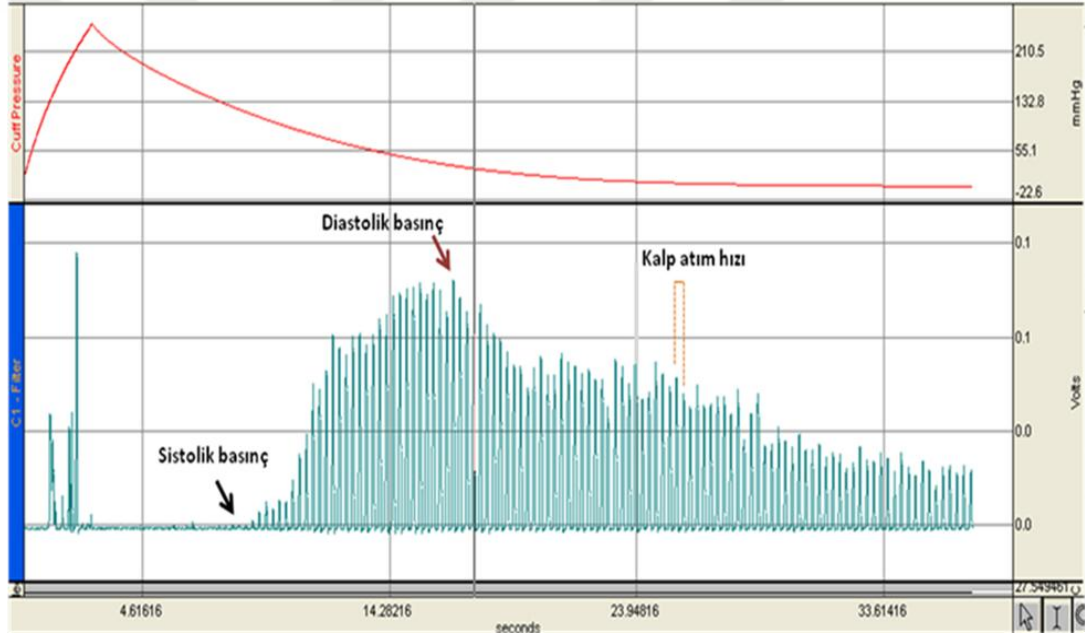
Hayvanlar kafeslerinden ayrılmadan, CLP uygulamasından 30 dk önce (0. saat) ve operasyon sonrası 2, 6, 12 ve 24. saatlerde vital parametrelerin monitorizasyonundan önce nörolojik değerlendirmeler yapıldı. Pinna refleksi, korneal refleks ve kuyruk refleksi basit postural somatomotor fonksiyonları değerlendirmek amacıyla, doğrulma refleksi ve kaçma yanıtı ise karmaşık postural somatomotor fonksiyonları değerlendirmek amacıyla incelendi. Elde edilen nörolojik yanıtlar 0 ile 2 arasında (0: yanıt yok, 1: zayıf yanıt, 2: güçlü yanıt) değerlendirilerek kaydedildi. Pinna ve kornea reflekslerine sırasıyla meatus acusticus externus'a sivri bir cisimle, korneaya pamukla dokunulması yoluyla hayvanın verdiği kafa sallama cevabı değerlendirilerek bakıldı. Kuyruk refleksi kuyruğun distal bölümünden verilen ağrılı uyarana karşı oluşan kuyruk çekme yanıtının varlığı ile, doğrulma refleksi ise sırt üstü bırakılan hayvanın normal pozisyona dönme süresi ile değerlendirildi. Kaçma reaksiyonunun değerlendirilmesi amacı ile ağrılı

uyaran sonrasında hayvanın ağırlı uyaran verilen yerden uzaklaşmak için gösterdiği kaçma hareketine bakıldı. Değerlendirilen beş adet refleksin her birine ait 0 ile 2 arasındaki puanlar toplandıktan sonra en düşüğü 0 ve en yükseğı 10 puan olacak şekilde nörolojik değerlendirme skoru Kadoi ve ark. tanımladığı yöntemeye uygun olarak hesaplandı (209).

Vital Parametrelerin Monitorizasyonu

Tüm deney gruplarındaki hayvanların vital parametreleri CLP uygulamasından 30 dk önce (0. saat) ve operasyon sonrası 2, 6, 12 ve 24. saatlerde monitorize edildi. Opere gruplarda, abdominal cerrahi işlemler öncesi 30. dk birinci zaman dilimi olarak belirlenirken, non-opere grupta 0. saat olarak alındı. Monitorizasyon işlemleri sırasında rektal ısı, kalp atım hızı, ortalama kan basıncı parametreleri takip edilerek kayıt edildi. Deney hayvanlarının rektal ısı parametrelerinin ölçümünde bir veri kayıt sistemine (Mp150 Data Acquisition System, Biopac Systems Inc., CA, USA) bağı bir amplifikatör ünitesi (ST100C temperature unit, Biopac Systems Inc., CA, USA) ve uygun transduser (TSD202F, Biopac Systems Inc., CA, USA) kullanıldı. Rektal ısı ölçümleri, deney hayvanları ısıtıcı ünite içerisine yerleştirilmeden önce yapıldı. Transduser içeren sıvı korumalı rektal prob deney havvanlarına rektal olarak yerleştirilip 5 dakika beklenildikten sonra 2 dakikalık bir zaman dilimi boyunca ölçüldü ve kayıt edildi. Kalp hızı ve kan basıncı parametreleri monitorizasyonu için aynı veri kayıt sistemine bağı kan basıncı monitorizasyon sistemi (NIBP200A- 220 V /50 Hz, Biopac Systems Inc., CA, USA) kullanıldı. Orta boy kısıtlayıcılar (Rxrestrainer-M) içerisinde hareketsiz hale getirilen deney hayvanları 32°C'ye ayarlı ısıtıcı ünite (Tail heating unit-B, Biopac Systems Inc. CA, USA) içerisine kuyrukları kısıtlayıcının dışarısında kalacak şekilde yerleştirildi. Isıtıcı ünite içerisinde 20 dk bekletilen hayvanlar ısıtıcı ünite dışına alınarak kuyruklarına kızıl ötesi (IR) algılayıcı (Rxtsensor-8, Biopac Systems Inc., CA, USA) ve uygun manşet (Rxtcuff-11, Biopac Systems Inc., CA, USA) yerleştirildi ve ölçümler öncesi hareketsiz kalmaları beklendi. Ardışık 10 ölçüm uygun veri kayıt ve analiz

yazılımı (AcqKnowledge 3,7) aracılığı ile bilgisayar üzerinde kayıt edilerek arşivlendi. Ölçümler öncesinde Mp150 sisteminde veri örnekleme hızı 200 örnek/saniye, örnekleme süresi ise 24 saniye olarak belirlendi. Kan basıncı ortalama arteriyel basınç (OAB) olarak elde edildi ve $[OAB = (2 \times \text{Diastolik basınç}) + \text{Sistolik basınç}) / 3]$ formülü kullanılarak hesaplandı. Kalp atım hızı ise dakikadaki atım hızı olarak belirlendi. Kalp atım hızı, her basınç ölçüm grafiğindeki basınç eğrilerinin tepe noktaları arasındaki zaman aralıkları kullanılarak ve 10 ardışık tepe noktasının ortalaması alınarak hesaplandı (Şekil-9). 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerde 10'ar kez tekrarlanan vital parametre ölçümleri IBM uyumlu bir bilgisayara aktarıldıktan sonra elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak kayıt edildi.



Şekil-9: Basınç ölçüm grafiği'nde kan basıncı ve kalp atım hızı değerlerinin belirlenmesi. Üstteki grafik manşon basıncını göstermekte ve alt grafikteki kalp atışının başlangıcı sistolik kan basıncını, yüksek tepe noktasına sahip basınç eğrisi zirvesi diastolik kan basıncını işaret etmektedir. Basınç eğrilerinin tepe noktaları arasındaki zaman aralığı ise kalp atım hızını göstermektedir.

Beyin Elektriksel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Her üç gruptaki hayvanlarda beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile ECoG ve SUP kayıtları alındı. ECoG ve SUP kayıtlarının alınabilmesi için deney hayvanlarına on gün öncesinde elektrotlar yerleştirildi. Elektrotların yerleştirilme işlemi öncesi deney hayvanları 50 mg/kg i.p. olarak verilen tiopental sodyum ile anesteziye edildi. Kafatası derisi antiseptik solüsyon (% 10 polivinilpirolidonyot) ile temizlendi ve uzunluğu üç santimetre olmak üzere bregma'yı açığa çıkaracak şekilde orta hattın sagittal olarak disseke edildi. Elektrotların yerleştirileceği vidaların takılabilmesi için Bregma'nın 10 mm ön tarafında midsagittal hattın ± 1 mm sağına ve soluna iki adet, bregma'nın 2,5 mm arkası ve midsagittal hattın 2.5 mm arka sağına ise bir adet olmak üzere yüksek hızlı bir matkap ve matkap ucu ile üç ayrı delik açıldı. Meninkslerin zarar görmemesi için matkap ile birlikte uygun ve standart delici iğne uzunluğu kullanıldı. Meninkslerden kanaması olan hayvanlar deney dışı bırakıldı. Açılan deliklere uygun vida tutucu (SD-1, Plastics One, USA) kullanılarak vidalar (0.8x1/8 3.2mm) yerleştirildikten sonra epidural elektrot uçları (MS333/2A, Plastics One, USA) vidalara takıldı. Elektrotlar ve vidalar kafatasına dental sement ile tespit edildi ve kafa derisi 4/0 cerrahi iplikle dikildi. Cerrahi işlem sonrası deney hayvanları sağaltım için kafeslerine bırakıldı.

i. Elektrokortikografi Kayıtlarının Alınması

Beyin elektriksel aktivitesi ile ilgili tüm ölçümler özel plastik ve şeffaf bir kafes (30x30x35 cm) içerisinde yapıldı. Her deney hayvanından uyanırken CLP uygulamasından 30 dk önce (0. saat) ve operasyon sonrası 2, 6, 12 ve 24. saatlerde ECoG kayıtları alındı. ECoG kayıtları için; uygun bir kablo (335-340/3 TT3C) yardımı ile elektrotların veri kayıt cihazına (MP150 (Biopac Systems Inc., CA, USA) bağlantısı yapıldı. Verilerin amplifikasyonunda ise bir biyoelektrik amplifikatör modülü (EEG100C, Biopac Systems Inc., CA, USA) kullanıldı. Kayıtlar, primer somatosensoriyel kortekse yerleştirilen S1 elektrotu ve referans olarak aynı taraf frontal elektrot kullanılarak alındı. Karşı taraf frontal elektrot topraklama olarak kullanıldı.

Biyoelektrik amplifikatör modülüne gönderilen sinyal 0,5 Hz “düşük akım” ve 130 Hz “yüksek akım” filtreleri ile filtrelenerek güç kaynağından kaynaklanan ve kas hareketleri nedeni ile oluşan artefaktlar azaltıldı. 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, delta 1.5-3 Hz ve subdelta 0,5-1.5) saniyede 2500 örnek hızında monitorize edildi (AcqKnowledge 3.7). Veriler kayıt esnasında ve sonrasında artefaktlar açısından tarandı. Dijital olarak kaydedilen veriler üzerinde “hızlı Fourier transform” (Fast Fourier transform: FFT) yöntemi uygulanarak toplam elektriksel aktivite (güç spektrumu) saptandı. Elde edilen spektral grafik üzerinden medyan frekans (MF, toplam elektriksel gücün %50’sinin altında kalan alan) ve ortalama dalga frekansı (SEF 95: Spectral edge frequency) 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 spektrumuna olan katkısı yüzde değer olarak ifade edildi. Daha önce yapılmış olan beyin elektriksel aktivite çalışmalarıyla karşılaştırabilmek 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.

ii. Somatosensoriyel Uyarılmış Potansiyel Kayıtlarının Alınması

Her deney hayvanından uyanırken CLP uygulamasından 30 dk önce (0. saat) ve operasyon sonrası 2, 6, 12 ve 24. saatlerde SUP kayıtları çekildi. Kayıtlar S1 elektrotundan ve referans olarak aynı taraf frontal elektrot kullanılarak alındı. Karşı taraf frontal elektrot topraklama olarak kullanıldı. SUP kuyruk proksimalinden ve sol taraftan epidermisin elektriksel olarak uyarılması ile elde edildi. Uyarı için MP150 uyarıcı çıkışları kullanıldı. İki adet uyarı elektrodu 2 mm aralıklı olarak kuyruğa tespit edildi ve 2 ms zamanlı kare dalga elektriksel uyarı verildi. Biyoelektrik amplifikatör modülüne gönderilen beyin elektriksel aktivitesi 2500 kat yükselttilerek ve 15-200 Hz

arasında filtrelendi ve 2,5 kHz örnek hızında dijital olarak monitorize edildi. Uyarın (2 ms, 5 mA kare dalga) ile eş zamanlı 256 veri noktası içeren toplam 100 adet SUP verisinin kayıt sırasındaki ortalamaları grafiksel olarak kaydedildi. SUP analizleri, SUP 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. SUP grafiklerinin analizi tüm kayıtlarda gözlemlenen 2 pozitif (P1 ve P2) ve 2 negatif (N1 ve N2) SUP dalgaları üzerinden yapıldı. P1, P2, N1 ve N2 dalgalarının taban-tepe dalga boylarının (μV) yanı sıra P1-P2, P1-N1, N1-P2, P2-N2 ve N1-N2 tepe noktaları arasında geçen süreler (ms) ve pozitif dalgaların mutlak gecikmeleri (uyarının başlangıcından dalga tepesine kadar olan süre) ölçüldü ve kaydedildi .

Kan Örnekleri ve Kan Kültürleri

Sepsis oluşturulan sıçanların takibinde kullanılan parametrelerin yirmi dördüncü saatteki kayıt işlemlerinin tamamlanmasından sonra anestezi altında bütün deney hayvanlarından intrakardiyak olarak (fiksatif verilmesinden hemen önce) kalbin sağ ventrikülüne steril bir enjektör iğnesi ile girilerek yaklaşık 5 ml kan örneği alındı. Kan örneklerinin 1 ml'si laktat ölçümü için 1 ml'si de tam kan sayımı için ethylenediaminetetraacetic asit içeren (EDTA) 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, USA) aktarıldı.

Kan kültürü şişeleri, BACTEC™ 9240 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) kan kültür sisteminde 7 gün süreyle 37°C'de inkübe edildi. Aerob, anaerob ve mikro-aerofilik organizmalar için üreme ortamı sağlayan sistemde, üreme sinyali veren örnekler cihazdan çıkarılarak %5'lik koyun kanlı agar ve Eosin Metilen Mavisı agar (EMM) plaklarına pasaj yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında üreme görülen plaklar değerlendirmeye 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 tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri Phoenix™ (BDDS, Sparks, USA) otomatize sistemde çalışıldı. BACTEC™ 9240 kan kültür sisteminde üreme sinyali saptanan ancak %5'lik koyun kanlı agar ve EMM agar besiyerlerinde üreme saptanmayan örnekler; %5'lik koyun kanlı agar ve çukulatalı agarda aerobik olarak; %5'lik koyun kanlı agar, EMM ve çukulatalı agarda anaerobik 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 üreme saptanmayan örnekler, bir haftalık süre sonunda negatif kültür olarak değerlendirildi.

Tam Kan Sayımı ve Kan Laktat Değerlerinin Ölçümü

Septik tablonun ortaya konulabilmesi amacıyla 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 elde edilen kan örnekleri EDTA'lı tüpler içinde buz akülerine konularak kısa bir süre içinde biyokimya araştırma laboratuvarına nakledildi. Kan örnekleri dakikada 3000 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 hayvanlarına cerrahi işlemin sonrasındaki 22. saatte i.p. olarak 200mg/kg'dan BrdU verildi ve takip eden 2. saatte nörolojik muayene ve monitorizasyon işlemleri gerçekleştirilerek beyin dokularının elde edilmesi amacı ile anestezi altına alındı (50mg/kg i.p., tiopental sodyum). Anestezi altına girdiğinden emin olunan hayvanlar intrakardiyak perfüzyon ile

0,2 M fosfat tampon içinde, %4 paraformaldehid (ph 7,4) verilerek tespit edildi. Kan numunelerinin alınması ve perfüzyon fiksasyonu için orificium urethralis'in 2 cm proksimalinden karın ön duvarı oblik olarak sağ arcus costarum'a doğru insizyon ile açılarak diaphragmaya kadar ulaşıldı. Daha sonra 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 yanlara doğru açılıp sabitlenerek kalp görüldü. Kanama olup olmadığının kontrolünden sonra, önce kalbin sağ ventrikülüne girilerek kan numuneleri alındı ve daha sonra sol ventriküle bir perfüzyon iğnesi yerleştirilerek sabitlendi ve sağ atriya ait auricula bulunarak ince kenarlı bir makas ile kesik atıldı. [Sol ventriküle verilerek perfüzyonu sağlanan heparin içeren (1000 IU/litre) 100 ml serum fizyolojik solüsyonunu takiben deney hayvanları 250-400 ml fiksatif (0.2M fosfat tampon içinde, %4 paraformaldehid, pH 7.4) ile tespit 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 3 cm'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 SVZ ve GD' a uyan bölümlerinden iki ayrı koronal dilim alındı. Birinci koronal dilim bregma'nın 1 mm önünden, ikinci koronal dilim bregma'nın 2 mm gerisinden arkaya doğru 2 mm kalınlığında olacak şekilde alınarak parafin bloklama öncesi işlemler için kasetler içerisinde kodlandı. Bloklar daha sonra artan konsantrasyonda etanol (%70, %80, %90, %96 ve %100) ile dehidrate edilerek ksilole tabi tutuldu ve parafine gömüldü. Her iki beyin yarım küresini de içeren parafin bloklardan mikrotom (American optical 820, USA) kullanılarak 5 µm'lik seri koronal kesitler elde edildi ve lizin kaplı lamalar (Sigma-Aldrich, P0425, USA) üzerine alınarak kodlandı. İmmünohistokimyasal olarak boyanacak alanların belirlenmesi amacıyla her 10 kesitten biri Nissle yöntemi (% 0,1 cresyl violet) ile boyandı. Birinci parafin

bloktan SVZ (Bregma-0.26 mm - Bregma-0.40 mm); ikinci bloktan GD alanlarını (Bregma-3.60 mm - Bregma-3.80 mm) içeren dilimlerden altışar adet kesit BrdU immünohistokimyası için ayrıldı. Her bloktan birer kesit ise BrdU immünohistokimyasal yöntemine ait pozitif ve negatif kontroller için kullanıldı.

Bromodeoksiuridin İmmunohistokimyası

BrdU ile işaretlenmiş hücre çekirdeklerini göstermek amacıyla içerisinde, (i) Denaturasyon solüsyonu, (ii) Bloklama solüsyonu, (iii) Fare anti-BrdU antikoru, (iv) Streptavidin-peroksidaz kompleksini içeren BrdU immünohistokimya sistem kiti (Calbiochem HCS30, Almanya) kullanıldı. Preperatlar, 60°C de etüv içerisinde 45 dakika yüksek ısıya tabi tutulduktan sonra ksilol ile deparafinize edildi ve azalan derişiklikte etanol serisi (%100 %90, %80, %70) içerisinde rehidrate edildiler. Distile su ile yıkanan kesitlerin etrafı PAP kalemi (Sigma, Z377821, USA) ile sınırlandırıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacı ile %2'lik hidrojen peroksit (60ml metanol içerisinde 4 ml %30'luk H₂O₂) ile 10 dakika işleme tabi tutuldular ve sonrasında fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandılar. Daha sonra fiksasyondan dolayı maskelenen antijenlerin açığa çıkarılması amacıyla tripsin ile 10 dakika nemli ortam içerisinde ve oda sıcaklığında enzimatik işleme tutularak distile su ile 2 dakika yıkandılar. Arkasından oda sıcaklığında 100 µl denatürasyon solüsyonu içinde 30 dakika bekletilip PBS ile yıkandılar. Primer antikorun ortamda bulunan kollajen ve diğer konnektif doku proteinleriyle reaksiyona girmemesi amacıyla bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletilen kesitler herhangi bir yıkama gerçekleştirilmeden bir gece 50-100 µl biotinlenmiş fare anti-BrdU ile 4 °C enkübe edildi. Ertesi sabah PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika süre ile 100 µl streptavidin peroksidaz kompleksi ile muamele edildi ve sonrasında iki kez PBS ile yıkandı. Kromojen olarak kullanılan 50-100 µl diaminobenzidin (DAB) solüsyonu ile işaretlenme 5-10 dakika boyunca takip edildi ve reaksiyon distile su ile yıkanarak durduruldu. Hematoksilen (Merck 53,0500 Harris) ile 20 saniye zıt boyama

işlemi gerçekleştirilen kesitler distile su ile yıkandı ve artan konsantrasyonda etanol serisinde (%95, %100) dehidratasyon işlemini takiben ksilen ile şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

Hücre Sayımı

Çalışmada yer alan hayvanlardan elde edilen ve BrdU immünohistokimya yöntemi ile işaretlenen beyin kesitlerinde pozitif olarak işaretlenmiş olan hücreler, Scion Image 4.02 görüntü 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, BrdU pozitif hücreler boyanma özellikleri dikkate alınarak belirlendi ve 1 mm² alandaki tüm BrdU pozitif hücreler sayıldı. Sayım işlemi her hayvan için toplam beş kesitte tekrarlandı ve bu sayıların ortalaması o hayvan için BrdU 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 SUP dalgalarına ait yükseklik ve uzama değerleri gibi SUP parametrelerinin istatistiksel olarak analizi sırasında, deney boyunca her grubun başlangıç değerleriyle olan karşılaştırılmalarında “Tekrarlı Ölçümler için Tek Yönlü Varyans Analizi” istatistik yöntemi kullanıldı. Değişkenler arasında normal dağılımın olmadığı durumlarda ise “Tekrarlı Ölçümler için Friedman Varyans Analizi” istatistik yöntemi 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 gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırma yapıldı. Beynin SVZ’unda BrdU immünohistokimya yöntemiyle pozitif boyanan hücre

Çekirdek sayıları, kan laktat ve hemogram parametreleri deney grupları arasındaki karşılaştırmalar amacıyla, “Kruskal Wallis testi” ile değerlendirildi ve anlamlı farklılıkların bulunduğu durumlarda “Mann-Whitney U testi” gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırma yapıldı. İstatistik testlerinin uygulanmasında Sigma-stat 3,0 ve SPPS 16,0 programları kullanıldı ve tüm karşılaştırmalarda $p < 0.05$ anlamlı bir farklılık olarak kabul edildi.



BULGULAR

Mortalite Oranları

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

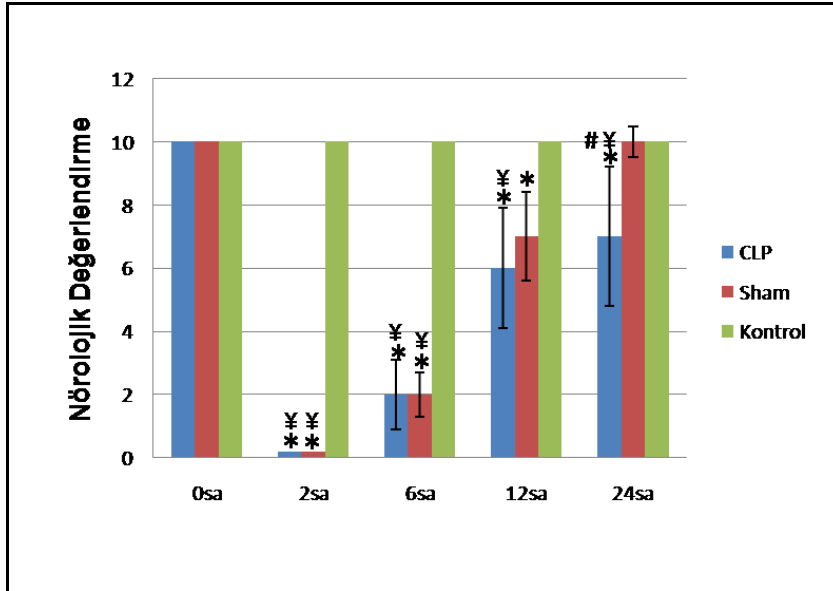
Klinik ve Laparotomik İnceleme Bulguları

CLP grubundaki tüm hayvanlarda CLP işleminden sonra piloereksiyon, laterji, titreme, oküler ve nazal akıntı gibi belirgin sepsis bulguları gözlemlendi. Üç hayvanda bu bulgulara 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 boşluğun temiz olduğu ve peritoneal sıvının şeffaf görünümlü olduğu gözlemlendi. CLP grubunda ise peritoneal sıvı kötü kokuluydu ve caecum çevresinde yer yer püy olduğu görüldü. Kontrol ve sham grubunda caecum, çevre omentum ve ince bağırsak kıvrımlarından bağımsız bir şekilde yer almakta ve parlak-canlı görünümlü olarak gözlenmekteydi. CLP grubunda ise bağlı olan caecum'un ileri derecede ödemli, iskemik ve mat görünümlü olduğu ve çevredeki ince bağırsak kıvrımlarıyla belirgin bir biçimde yapışıklık gösterdiği gözlemlendi.

Nörolojik Muayene Bulguları

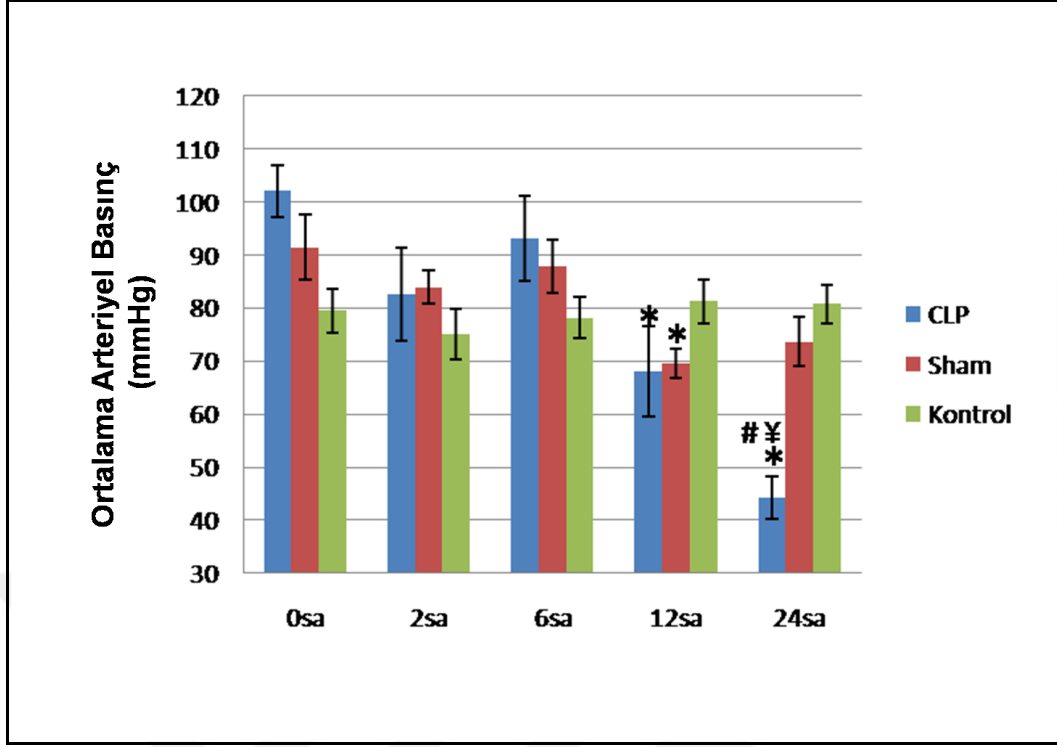
Nörolojik muayene bulguları değerlendirildiğinde; anestezinin etkisinin devam etmesinden dolayı, CLP ve sham gruplarında ilk 2 saatteki nörolojik değerlendirme skoru 0 olarak bulundu. Bunu takip eden 2 ile 12. saatler arasında anestezinin etkisindeki azalmaya bağlı olarak refleks cevaplar açısından hem sepsis hem de sham gruplarında kısmi cevap alınmaktaydı. 24. saatteki değerlere bakıldığında ise refleks cevapların sham grubunda başlangıç değerleri seviyesine yükseldiği fakat CLP grubunda başlangıç değerlerinin %70'ine ulaşabildiği görüldü (Şekil-10). Nörolojik değerlendirme 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 CLP ve sham gruplarında anlamlıydı. 24. saatteki değerlere bakıldığında ise CLP ile sham ve CLP ile kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık göze çarpmakta, sham ve kontrol grupları arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktaydı (Şekil-10).



Şekil-10: CLP, sham ve kontrol gruplarına ait nörolojik skor değerlerinin grafiksel görünümü (*, CLP ve sham grupları başlangıç değerlerine göre anlamlılık; ¥, kontrol grubuna göre anlamlılık; #, sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$).

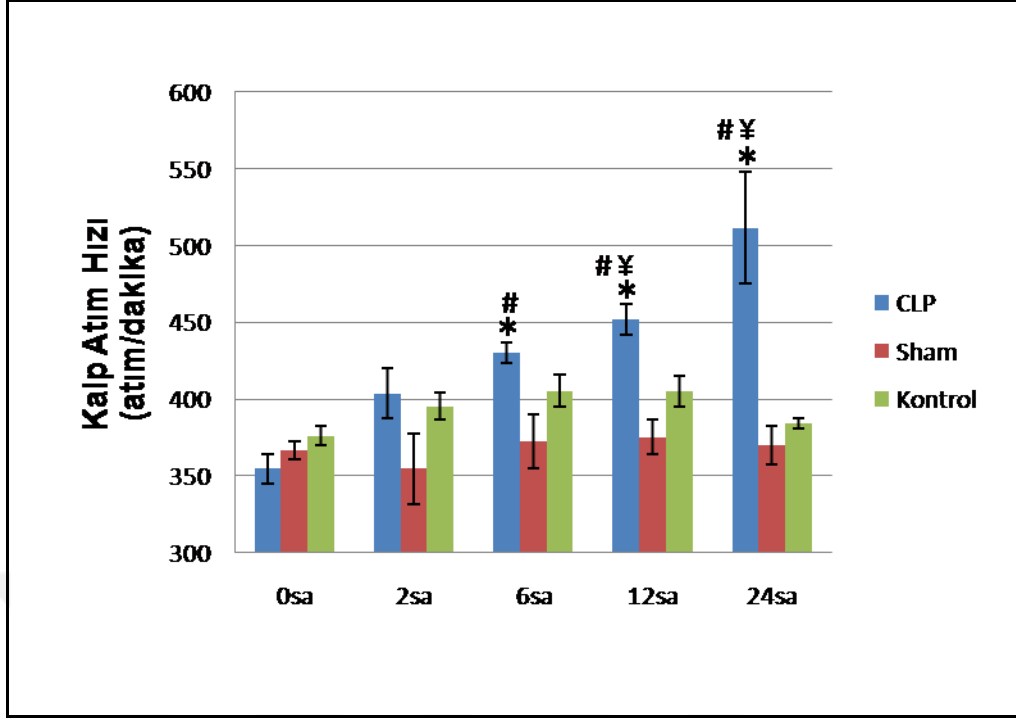
Vital Parametre Bulguları

Araştırmada kullanılan kontrol, sham ve CLP grubu deney hayvanlarından 0, 2, 6, 12 ve 24. saatte elde edilen vital parametrelere ait monitorizasyon sonuçları Şekil-11'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde kan basıncının CLP ve sham gruplarında ilk iki saatte düşme eğilimine girdiği, CLP grubunda 2 ile 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 düzeyde ($p<0,05$) olduğu saptandı. Kan basıncı değerlerinin CLP grubunda 24. saatte başlangıç değerlerine göre %46'lık seviyelere gerilediği görülmekteydi ($p<0,05$). Sham grubunda ilk iki saatte ortaya çıkan düşme eğiliminin, 12. saatte anlamlı olduğu ($p<0,05$) 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 ve düzelme eğilimi içinde olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise ilk iki saatteki görece düşüşe rağmen kan basıncının seyri açısından belirgin bir farklılık görülmedi. Kan basıncı için Kruskal Wallis test analizi üç deney grubu arasında 24. saatte anlamlıydı ($p<0,01$). Mann-Whitney U testi ile gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırma sonucunda ise CLP grubunda kan basıncındaki düşüşün hem kontrol hem de sham grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmekteydi (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,05$) (Şekil11).



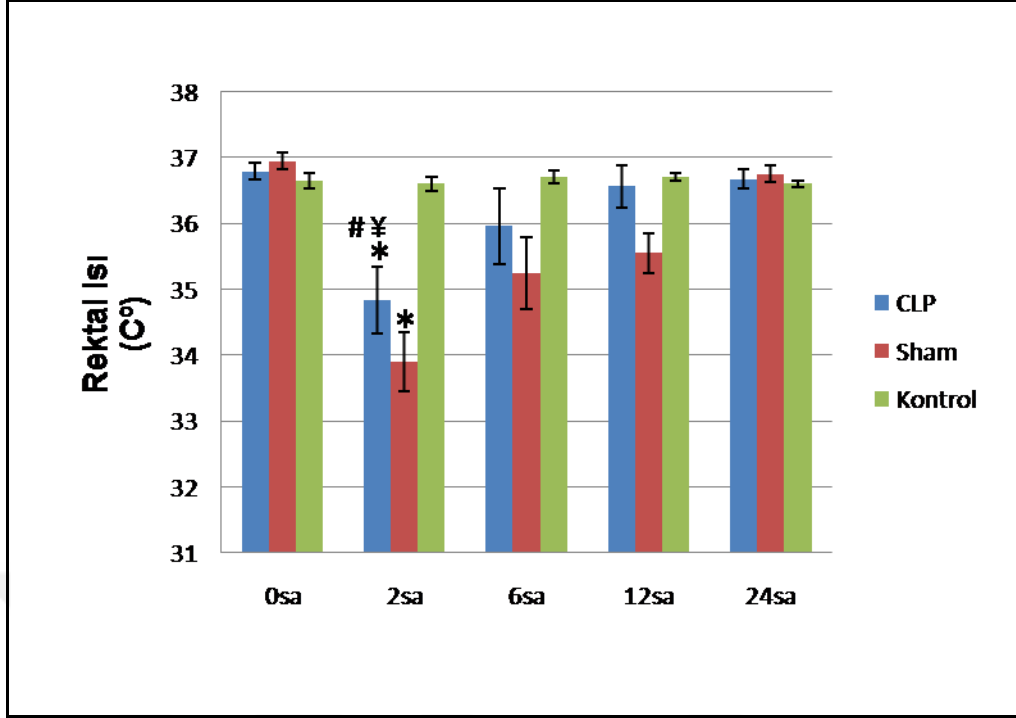
Şekil-11: CLP, sham ve kontrol gruplarına ait ortalama arteriyel basınç değerlerinin bar diagram görünümü (*,başlangıç değerlerine göre anlamlılık; ¥, kontrol grubuna göre anlamlılık; #, sham grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$).

Kalp hızı, CLP grubunda, başlangıç monitörizasyonundan itibaren sürekli bir artış eğilimi göstermekte, bu artış 6, 12 ve 24. saatte anlamlılık kazanmakta ($p<0.05$) ve 24. saatte başlangıç değerlerine göre %146 düzeyine yükselmekteydi. Sham ve kontrol grubunda ise kalp hızında ilk 24 saat içerisinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (Şekil-12). CLP, sham ve kontrol gruplarının kalp hızı parametresi açısından Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında, üç deney grubu arasında 6, 12 ve 24. saatlerde anlamlılık görüldü ($p<0.05$). Mann-Whitney U testi ile yapılan gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırmalar, CLP grubunda görülen kalp atım hızı artışının sham grubuna göre 6, 12 ve 24. saatlerde ($p<0.05$), kontrol grubuna göre ise 12 ve 24. saatlerde ($p<0.05$) anlamlılık göstermekteydi.



Şekil-12: CLP, sham ve kontrol gruplarına ait kalp atım hızı değerlerinin bar diagram görünümü (*, başlangıç değerlerine göre anlamlılık; ¥, kontrol grubuna göre anlamlılık; #, sham grubuna göre anlamlılık, $p < 0.05$).

Rektal ısı, CLP ve sham gruplarında ilk ikinci saatte başlangıç düzeylerine oranla anlamlı olarak düşük saptandı ($p < 0.05$). Her iki grupta da rektal ısıdaki bu düşmenin deney boyunca yavaş yavaş artma eğilimi gösterdiği, septik grupta 12. saatte, sham grubunda ise 24. saatte normal değerlere ulaştığı görüldü. Kontrol grubunda ise rektal ısının seyri açısından belirgin bir farklılık görülmedi. Üç deney grubu arasında, rektal ısı parametresi açısından Kruskal Wallis testi analizi ikinci saatte anlamlı farklılık olduğunu gösterdi ($p < 0.05$). Mann-Whitney U testi ile yapılan gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırmada 2. saatte kontrol ile CLP ve kontrol ile sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Şekil-13).



Şekil-13: CLP, sham ve kontrol gruplarına ait rektal ısı değerlerinin bar diagram görünümü (*, başlangıç değerlerine göre anlamlılık; ¥, kontrol grubuna göre anlamlılık; #, sham grubuna göre anlamlılık, $p < 0.05$).

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

CLP grubunda lökosit sayısı, sham ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük miktarlarda olmasına rağmen bu düşüşün Kruskal Wallis testi ile analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. CLP grubunda, monosit miktarlarındaysa bir artış olduğu, lenfosit ve bazofil miktarlarında düşüş olduğu, kandaki nötrofil ve eozinofil miktarında ise belirgin bir değişiklik olmadığı tespit edilirken elde edilen bu verilerden yalnızca monosit yüzdesindeki artışın Kruskal Wallis testi ile analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Kandaki monosit miktarlarının CLP, sham ve kontrol gruplarının ikili gruplar halinde Mann-Whitney U testi ile gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırma sonucunda kontrol ile sham ve CLP ile sham grupları arasında herhangi bir farklılık bulunmazken, CLP ile kontrol grupları arasındaki farklılık anlamlı bulundu. ($p < 0.05$) (Tablo-5).

CLP grubundaki eritrosit değerlerinin, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yükselmiş olduğu görüldü. (her iki grup için $p < 0,05$). Ayrıca CLP grubunda kandaki Hb, Hct, ve MPV değerlerinde bir miktar artma, MCV değerlerinde ise bir miktar azalma görölse de kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kandaki trombosit miktarları karşılaştırıldığında CLP grubunda trombosit seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşük olduğu görüldü ($p < 0.05$). Kontrol ile sham ve CLP ile sham grupları arasında ise trombosit miktarları açısından istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktaydı (Tablo-5).

Kan laktat seviyelerinin, CLP ve sham gruplarında kontrol grubuna oranla daha yüksek seviyelerde olduğu görüldü (Tablo-5). Bu yüksekliğin özellikle CLP grubunda belirgin olduğu, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği belirlendi (her iki karşılaştırma için $p < 0.05$). Kontrol ile sham grupları arasında ise kan laktat düzeyleri açısından herhangi bir farklılık görölmedi.

CLP grubundaki tüm hayvanlarda kan kültürlerinde gram negatif aerob bakteri üremesi saptanırken, gram pozitif bakteri üremesi gerçekleşmedi. CLP uygulanan hayvanların yarısında yalnızca E. coli'nin ürediği, diğer yarısında ise E. coli ve Klebsiella türlerinin birlikte ürediği görüldü. Kontrol ve sham gruplarında ise kan kültürlerinde herhangi bir üreme görölmedi.

Tablo-5: Kontrol, sham ve CLP gruplarına ait kan laktat ve hemogram değerleri (ortalama \pm standart hatası).

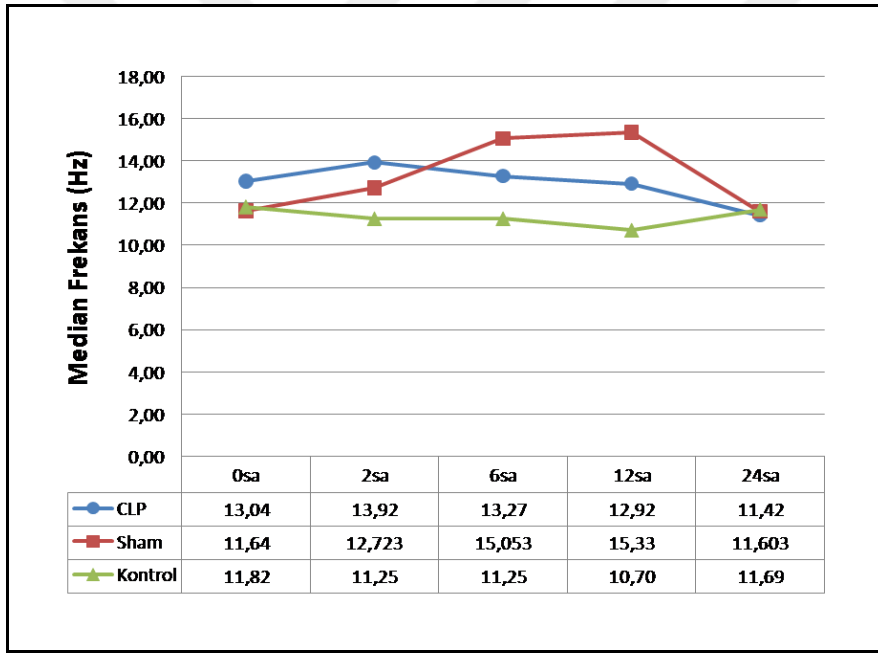
Kan Değerleri	Kontrol	Sham	CLP
Eritrosit ($\times 10^6 / \mu\text{l}$)	7,81 \pm 0,25	7,72 \pm 0,16	9,06 \pm 0,23 \neq #
Hemoglobin (g/dl)	13,80 \pm 0,48	14,03 \pm 1,20	15,50 \pm 1,02
Hematokrit (%)	40,90 \pm 0,98	40,03 \pm 1,60	45,72 \pm 1,15
MCH (pg)	17,54 \pm 0,48	17,47 \pm 0,41	17,23 \pm 0,58
MCHC (g/dl)	34,42 \pm 0,32	33,69 \pm 0,24	33,92 \pm 0,58
MCV (fl)	53,30 \pm 0,83	50,65 \pm 0,86	50,15 \pm 0,82
Lökosit ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	5,28 \pm 1,15	6,11 \pm 2,31	4,77 \pm 2,04
Nötrofil ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	2,90 \pm 0,45	4,59 \pm 1,72	3,22 \pm 1,69
Lenfosit ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	1,88 \pm 0,48	1,12 \pm 0,51	0,92 \pm 0,17
Bazofil ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	0,23 \pm 0,12	0,31 \pm 0,11	0,16 \pm 0,07
Monosit ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	0,08 \pm 0,04	0,32 \pm 0,15	0,64 \pm 0,32 \neq
Eozinofil ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	0,05 \pm 0,04	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
MPV (fl)	2,61 \pm 0,10	2,83 \pm 0,24	3,09 \pm 0,05
Trombosit ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	986 \pm 54,90	903 \pm 42,10	535,75 \pm 108,09 \neq
Laktat (mmol/l)	4,14 \pm 0,50	4,77 \pm 0,30	7,45 \pm 0,6 \neq #

(\neq , kontrol grubuna göre anlamlılık; #, sham grubuna göre anlamlılık, $p < 0.05$)

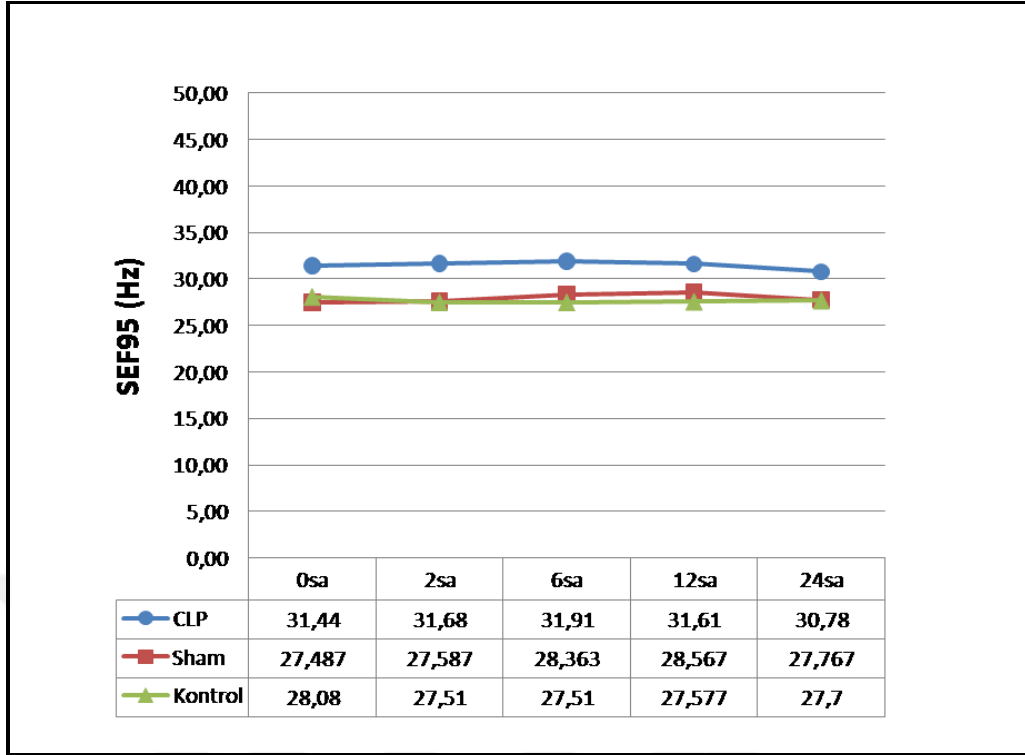
Elektrokortikografi Bulguları

Beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile ECoG kayıtları incelendiğinde CLP grubunda 24. saat medyan frekans (MF) ve SEF95 değerlerinin başlangıç değerlerine göre karşılaştırıldığında, sırasıyla %12,4 (13.04 Hz'den 11,42 Hz'e) ve %2.1 (31,44 Hz'den 30,78 Hz'e) azalma olduğu, sham ve kontrol gruplarında ise bu azalmanın %1'in altında olduğu görüldü (Şekil-14 ve Şekil-15). CLP grubunda gerek SEF95 gerekse MF değerlerindeki azalmanın anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$). ECoG kayıtlarındaki daha önceden belirlenmiş frekans bandlarının (alfa 8-13, beta 13-30, teta 4-8 ve delta 0,5-3 Hz) spektral güç analizleri yapıldığında, spektral güç frekanslarının, sham ve kontrol gruplarında başlangıç

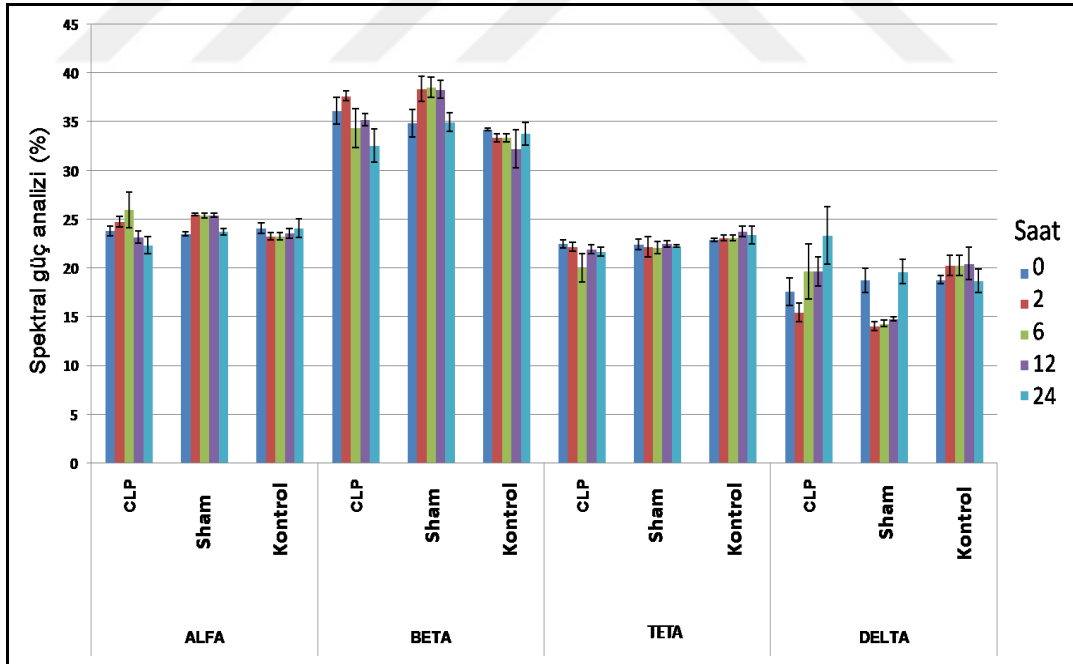
değerlerine oranla herhangi bir fark göstermediği, CLP grubunda ise alfa ve beta aktivitesinde başlangıç değerlerine göre sırasıyla %6 ve %9'luk bir azalma, delta aktivitesinde ise %32'lik bir artış bulunduğu saptandı (Şekil-16). Diğer gruplarda görülmeyen bu değişikliklerin anlamlı olmadığı saptandı. Veriler her bir hayvan için CLP grubu ayrı değerlendirildiğinde hayvanların yaklaşık %50'sinde delta aktivitesinde artış bulunduğu, yalnızca ECoG kayıtlarında değişiklik gösteren hayvanlar dikkate alındığında MF'da %20,8, alfa, beta ve teta aktivitesinde sırasıyla %12, %18, %8'lik bir azalma olduğu ancak farkın anlamlı olmadığı, delta aktivitesinin ise başlangıç değerlerine göre %65'lik bir artış gösterdiği ve bu değer anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$) (Şekil-17).



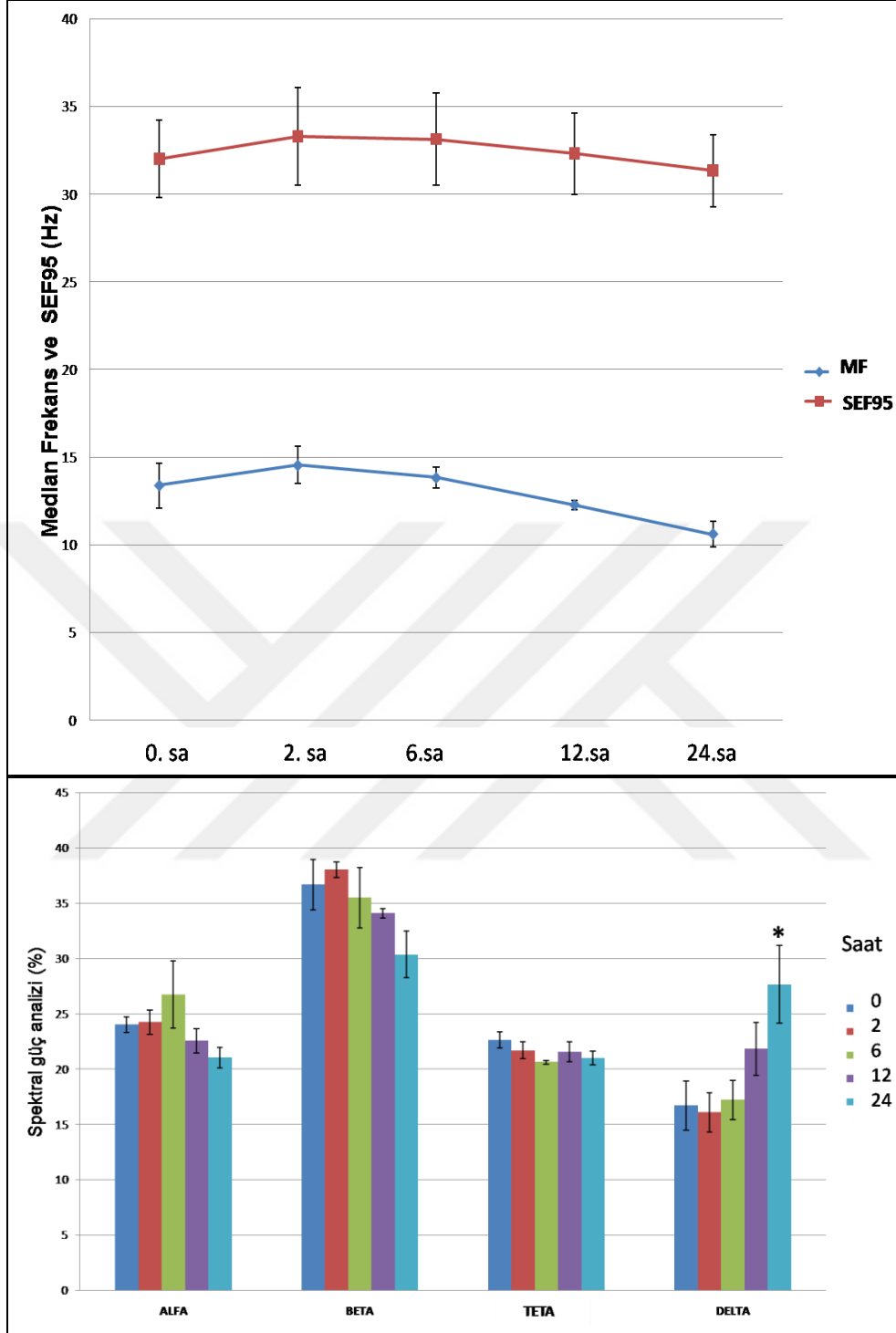
Şekil-14: CLP, sham ve kontrol gruplarında MF'a ait 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerdeki median frekans değerleri.



Şekil-15: CLP, sham ve kontrol gruplarında SEF95'e ait 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerdeki frekans değerleri.



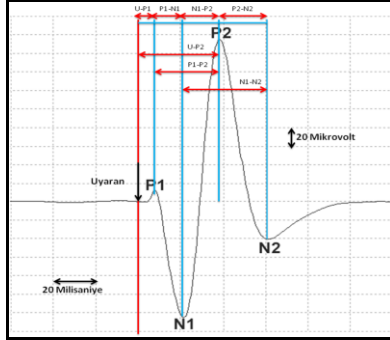
Şekil-16: CLP, sham ve kontrol gruplarında spektral güç analizinin 0, 2, 6, 12 ve 24. saatlerdeki frekans band değerleri.



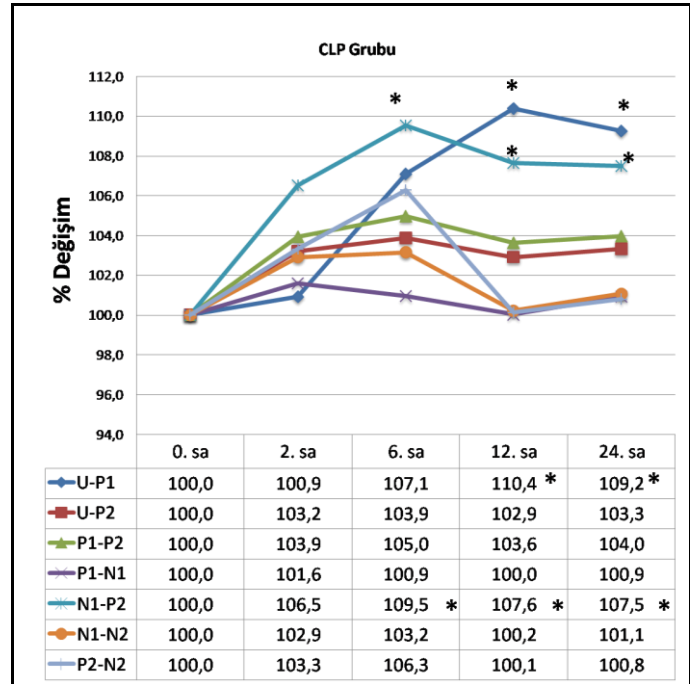
Şekil-17: EcoG ile beyin aktivite değişikliği tespit edilen CLP'li hayvanların spektral güç analizlerinin ve Median frekans ve SEF95 değerlerinin 0, 2, 6, 12 ve 24. saatler arasında karşılaştırılması.(* CLP grubunda delta dalgasındaki artışın istatistiksel anlamlılığını gösterir.)

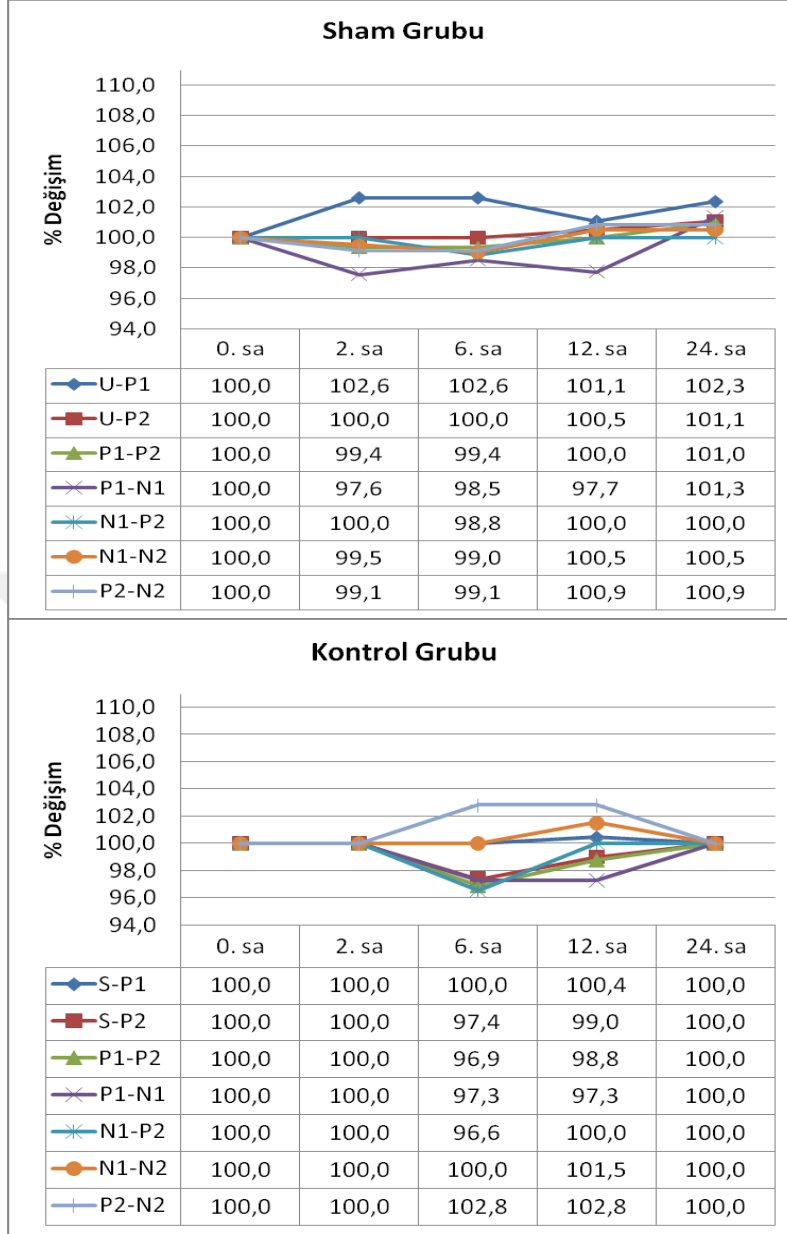
Somatosensoriyel Uyarılmış Potansiyel Bulguları

SUP sonuçları değerlendirildiğinde; CLP grubunda, uyarının başlangıcı ile pozitif dalga tepeleri arasındaki mesafeleri gösteren U-P1 ve U-P2 mesafeleri incelendiğinde U-P1'in ikinci saatten sonra uzamaya başladığı ve bu uzamanın 12. ve 24. saatlerde başlangıç değerlerine göre anlamlı düzeylerde yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$) (Şekil-18). U-P2 mesafesinde ise 6. saatten itibaren görülen hafif uzama anlamlı düzeyde değildi. Pozitif dalga tepeleri arasındaki mesafe P1-P2'nin de U-P2'ye benzer şekilde 6. saatten itibaren hafif derecede yüksek seyrettiği ve bu yükselmenin de anlamlılık göstermediği gözlemlendi ($p>0.05$). Pozitif ve negatif dalga pikleri arasında yer alan mesafelerden P1-N1 mesafesinde deney boyunca belirgin bir değişiklik görülmezken, N1-P2 değerlerinin 6. saatten itibaren başlangıç değerlerine göre anlamlı düzeylerde uzadığı, 12. ve 24. saatlerde de başlangıç değerlerine göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (Şekil-18). Sham ve kontrol grubunda ise SUP ölçümünden elde edilen değerler arasında belirgin bir değişiklik gözlemlenmedi (Şekil-19).



Şekil-18: SUP dalgalarına ait uzama mesafelerinin CLP grubundaki yüzde değişim grafiği (*, CLP grubunda başlangıç değerlerine göre anlamlılık, $p<0.05$).





Şekil-19: SUP dalgalarına ait uzama mesafelerinin sham ve kontrol gruplarındaki yüzde değişim grafiği.

SUP kayıtlarından elde edilen dalgaların dalga boyu değerleri, incelendiğinde CLP grubunda P1, P2 ve N1 dalgalarının dalga boylarında, operasyon sonrası 12. ve 24. saatteki değerlerinin başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında daha düşük düzeylerde olduğu fakat farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Tablo-6). Sham ve kontrol gruplarında ise, SUP ölçümünden elde edilen P1, P2 ve N1 dalgalarına ait dalga boyu değerlerinin seyri açısından belirgin bir farklılık gözlenmedi (Tablo-6). P1 dalgasına ait

dalga boyu değerleri, üç deney grubu arasında Kruskal Wallis test analizi ile incelendiğinde 12 ve 24. saatlerde anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0.005$). Mann Whitney-U testi ile gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırma sonucunda hem 12. saatte hem de 24. saatte CLP ile kontrol grupları arasında anlamlı farklılık görüldü (Her iki karşılaştırma için $p<0.01$). P2 ve N1 dalgalarına ait dalga boyu değerleri açısından ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo-6).

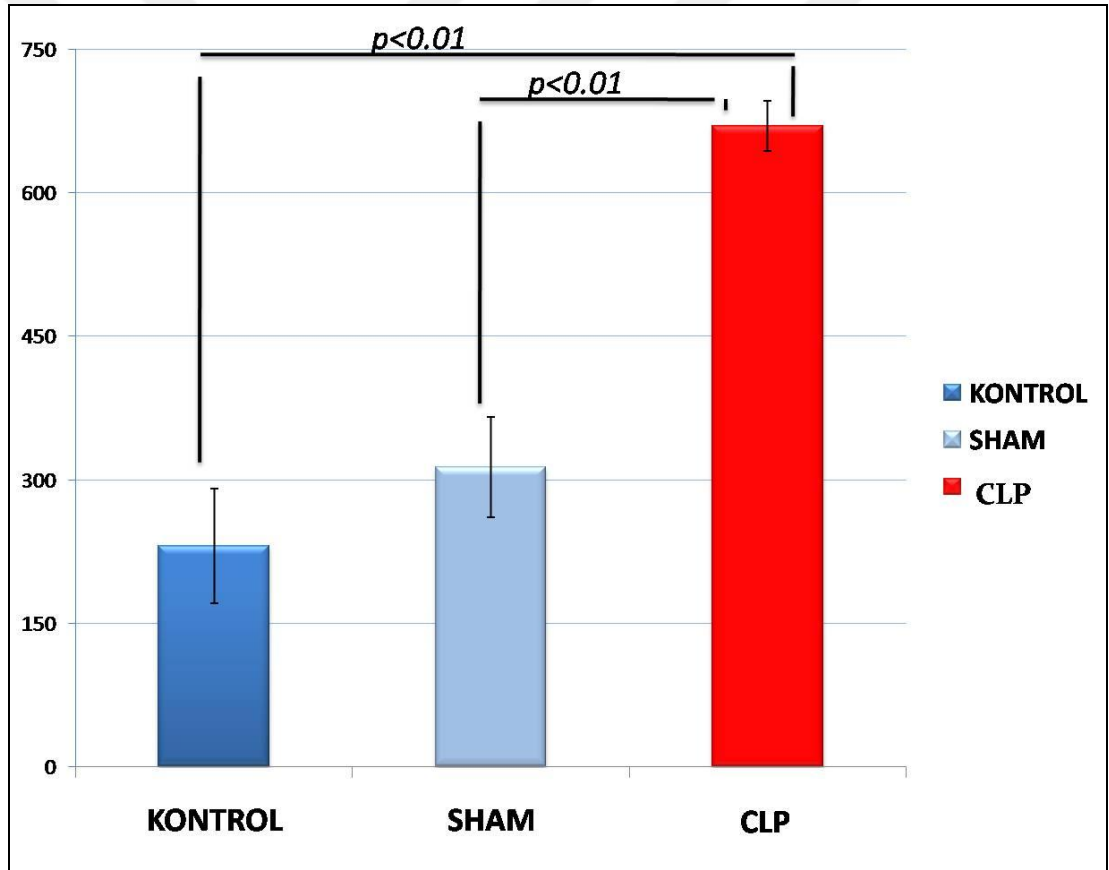
Tablo-6: CLP, sham ve kontrol gruplarında SUP dalgalarına ait dalga boyu değerleri (ortalama±standart hata).

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

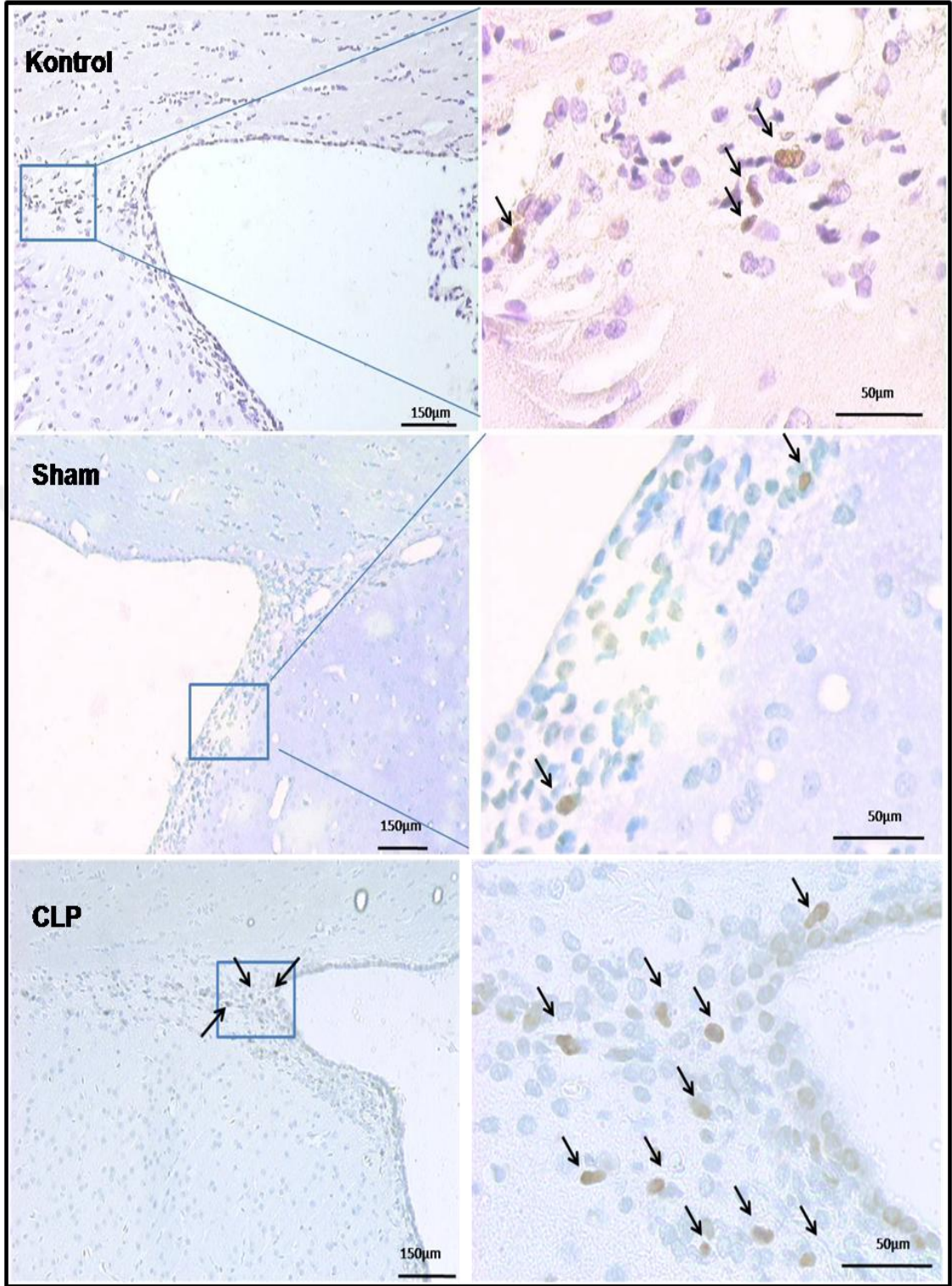
(* , CLP grubunda kontrol grubuna göre anlamlılık, $p<0.05$)

İmmünohistokimyasal Bulgular

BrdU immünohistokimyasal yöntemiyle işaretlenen beyin bölgelerinin morfolojik incelenmesi sonucu subventriküler zonda BrdU pozitif hücre çekirdeklerinin sayısının CLP ve sham-kontrol grubunda, kontrol grubuna göre artmış olduğu görüldü. CLP grubunda BrdU pozitif hücre çekirdeklerinin sayılarındaki artış sham-kontrol ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlılık saptanırken, sham-kontrol grubundaki BrdU pozitif hücre çekirdeklerinin sayılarındaki yüksekliğin istatistiksel bir anlamlılığı bulunmadı (Şekil-20, 21).



Şekil-20: Kontrol, sham ve CLP gruplarında BrdU immünohistokimyasal yöntemiyle pozitif boyanan mm²'deki hücre sayısı. (Kontrol ve sham grupları ile CLP grubu arasındaki anlamlılık $p < 0.01$)



Şekil-21: Kontrol, sham, CLP gruplarındaki hayvanlara ait, BrdU immünohistokimyasal yöntemiyle boyanmış subventriküler zon kesitleri. Okların ucu BrdU pozitif boyanmış hücre çekirdeklerini işaret etmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yoğun bakım ünitelerindeki hasta çeşitliliği ve geniş çaplı klinik çalışmaların yüksek maliyetli olması gibi olumsuz faktörler nedeniyle sepsis patofizyolojisinin açıklanmasında ve yeni tedavi yöntemlerinin ortaya konmasında hayvan çalışmaları tercih edilmektedir. Ancak çeşitli deneysel sepsis modeli çalışmalarında olumlu etkileri ortaya konan tedavi yöntemlerinin sepsisli hastalarda uygulandığında başarılı sonuçlar vermemesi, hatta mortalite oranlarını arttırıyor olması, sepsis hayvan çalışmalarının ortaya koyduğu sonuçların güvenilirliğini azaltmakta ve klinik sepsisi ne derece yansıtabildikleri konusunu tartışılır hale getirmektedir (90, 91). Birçok araştırmacıya göre CLP modeli, hem laboratuvar bulguları açısından hem de ortaya çıkan klinik sepsis tablosu açısından insanlarda gelişen sepsisi iyi bir şekilde taklit edebildiği düşünülen ve sepsis araştırmaları için “altın standart” olarak kabul edilen bir modeldir (97). Mevcut çalışmada da operasyon sonrası 24. saatte CLP grubundaki sıçanların tümünde; piloereksiyon, letarji, titreme, oküler ve nazal akıntıya eşlik eden anlamlı düzeyde azalan arteriyel basınç ve artış gösteren kalp atım hızı gibi sepsisle ilişkili klinik bulguların gözlenmiş olması ve kontrol ya da sham gruplarındaki sıçanların hiç birinde bu tür klinik bulgulara rastlanmamış olması, sepsisin deney grubunda başarılı bir şekilde oluşturulduğunu ve CLP yönteminin sepsisli hastalarda ortaya çıkan klinik sepsis tablosunu iyi bir şekilde yansıttığını düşündürmektedir. Sepsise ilişkin hiçbir klinik bulgu sham ya da kontrol grubunda gözlenmemiştir. Bu durum ileriye yönelik olarak planlanacak çalışmalarda sham-kontrol grubuna ek olarak non-opere kontrol grubunun kullanılmasına gerek olmadığını, böylece CLP modelinin uygulanan deneysel sepsis çalışmalarında, hayvan sayısının azaltılabileceğini ortaya koymaktadır (81).

SİE, sepsis'in önemli bir komplikasyonudur ve hastaların mortalitesinde artışa neden olmaktadır. SİE tanısı, hastaların bilinç durumunun ve kognitif fonksiyonlardaki değişikliklerin değerlendirilmesi ve

EEG kayıtları ile beyin elektriksel aktivitesindeki değişikliklerin belirlenmesi ile mümkündür (210). Yakın dönemde gerçekleştirilen çalışmalarda sepsis hastaları (211) ve çeşitli sepsis modellerinde (212, 213) gerçekleştirilen SUP kayıtlarının da nörolojik fonksiyonun değerlendirilmesinde genel bir yöntem olarak kullanılabilceği, bu yöntemin ensefalopatinin ciddiyetinin belirlenmesi ve SİE'de erken dönemdeki serebral fonksiyon değişikliklerinin tespit edilmesinde faydalı bir yöntem olarak kullanılabilceği öne sürülmektedir. Bu noktadan hareketle mevcut çalışmada CLP uygulanan hayvanlarda ensefalopati bulgularını ve bu hayvanlarda ensefalopati gelişimini doğrulamak üzere nörolojik refleksler değerlendirilmiş, ECoG ve SUP kayıtları alınmıştır. CLP grubunda nörolojik reflekslerde 24. saatte tespit edilen anlamlı kayıp, ECoG kayıtlarında median ve beta frekansında azalma, delta frekansında anlamlı artma ve SUP sinyallerinde genel yavaşlama ve uzama saptanmıştır. Bu bulguların hayvanların yaklaşık yarısında belirgin düzeyde görülmesi ve istatistiksel anlam kazanması, CLP modelini kullanan ve SİE'nin inceleneceği çalışmalarda, öncelikle SİE gelişiminin nörofizyolojik yöntemlerle doğrulanmasının, sonuçların doğru yorumlanması için faydalı olabileceğini düşündürmektedir. ECoG kayıtları çok yoğun ve yorumlanması güç veriler oluşturması nedeniyle tercih edilmeme ihtimali taşımaktadır. bUna karşılık kortikal aktivitenin bozulduğunu doğrulayan SUP kayıtları, sepsis hayvan modellerinde SİE gelişiminin tespiti amacıyla kullanılabilir.

Mevcut çalışmanın ortaya koyduğu bir diğer önemli ve yeni bulgu ise CLP uygulanan sıçanlarda SVZ bölgesinde BrdU pozitifliği gösteren, dolayısı ile çoğalmakta olduğu düşünölen hücre sayısında anlamlı düzeyde artış saptanmasıdır. Yakın zamana kadar bilimsel kabul gören görüş, santral sinir sisteminin fonksiyonel üniteleri olan nöronların oldukça büyük bir bölümünün embriyolojik gelişim sırasında biçimlendiği ve erişkin dönemde yeni nöron oluşumunun söz konusu olmadığı yönündedir. Özellikle son yirmi yıl içinde gerçekleştirilen çalışmalarda (214, 215) erişkin beyinde yeni nöronların sürekli oluştuğu ve oluşan yeni nöronların matürasyon sürecini tamamladıktan sonra nöronal ağa katılarak fonksiyonel hale geldiği açık şekilde gösterilmiştir. 1998 yılında Cameron ve McKay bu yeni nöronların

çoğalmakta olan nöronal kök hücre veya progenitor hücre havuzundan köken aldıklarını göstermişlerdir (216). Bu öncü hücrelerin içinde bulunduğu mikro çevredeki herhangi bir değişikliğin nörogenezi engelleyebileceği (216), ektopik nörogeneze yol açabileceği (217), hafıza ve öğrenme kayıplarına sebep olabileceği (218), beyin tümörlerinin gelişiminde rol alabileceği (111), çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. SSS'de nöronal hasarın gerçekleştiği Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıkların çoğunun inflamasyon ile beraber seyrettiğinin ortaya konması ile nöronal kök hücrelerin rejenerasyonunun şekillenmesinde inflamasyonun etkisini anlamaya yönelik, nörogenezin çoğalma, farklılaşma, göç süreçlerinin pro-inflamatuvar mediatörler tarafından etkilenip etkilenmediğini araştıran çalışmalar son yıllarda hızla artmaktadır (219). Stres, hasarlanma, enfeksiyon gibi çeşitli patolojik süreçler beyinde belirgin bir mikrogial aktivasyona ve bu hücrelerden pro-inflamatuvar moleküllerin salınımına yol açarak hücreyel olaylara ve çeşitli moleküler mekanizmaların tetiklenmesine neden olabilmektedir (219). Muhtemelen bu süreçte nöronal kök hücreler ve progenitör hücreler de etkilenmekte ve nörogenez içinde yer alan süreçler arasındaki denge gerek SVZ gerekse GD'un SGZ'unda bozulmaktadır. Nitekim inflamasyonu takiben salınan kimyasalların öncü hücrelerin göç kabiliyetini etkilediği gösterilmiştir. Beyinde; hipoksi, iskemi, bakteriyel ve viral enfeksiyonları içine alan çok sayıda patolojik durumda nöroinflamatuvar bir reaksiyonun rol oynadığı hasarlanmalar meydana gelmektedir. Bu yanıtın oluşmasında pro- ve anti-inflamatuvar sitokin ve kemokinler salgılayan mikrogialar, astrositler ve periferik makrofajlar anahtar rol oynarlar. Salgılanan bu pro-inflamatuvar mediatörler, iki ucu keskin bıçak olarak değerlendirilebilir. Bu maddeler bir taraftan beyinde immün koruma sağlarken diğer taraftan nöronal ölüme sebep olabilmektedirler (220). SSS'de inflamasyona ait veriler 1900'lü yıllarda rapor edilmeye başlanmış ve son birkaç yıl içerisinde de inflamatuvar mediatörlerin nöronal kök hücrelerde daha büyük değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (208). SSS hasarlanmalarının birçoğunda bir latent periodu takiben nörojenik bölgelerdeki progenitör hücrelerde çoğalma artışı olmakta ve bazı

durumlarda ise yenidoğan nöronlar hasarlanma bölgesine göç edebilmektedir (221). Beyinde hasarlanma oluşturabilen serebral iskemi (222, 223), epileptik nöbetler (224) ya da nörotoksik lezyonlarda (188) GD'da nörogenez oranındaki artış oldukça fazla olabilmektedir. Fokal veya global iskemi sonrası nörogenez artışına rehberlik eden mekanizmalar tam olarak anlaşılammış olmakla beraber, iskemi sonrası GD'un SGZ'unda nörogenez artışının fibroblast growth factor-2 (FGF-2) salınımı tarafından, SVZ'de ise bir sitokin olan eritropoetin tarafından uyarıldığını gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır (219, 225). Akut beyin hasarlanmalarının yanısıra Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi pek çok kronik nörodejeneratif hastalıkta, mikroglia aktivasyonu tarafından gerçekleştirilen atipik inflamatuvar yanıt varlığı hastalığın ana özelliği konumundadır. Alzheimer ve Parkinson hastalıkları için geliştirilen fare modellerinde farklı nörojenik beyin bölgelerinde nörogenezin artabildiği Alzheimer modelinde GD'da, Parkinson modelinde ise SVZ'de bu aktivasyonun görüldüğü bildirilmektedir (226, 227). Benzer şekilde Huntington hastalığı ve Prion hastalıklarında da hücre çoğalmasının arttığı gösterilmektedir (228). Enfeksiyonların esas kaynağı konumundaki bakteriler ve virüsler için beyin çok önemli bir hedeftir. Monje ve ark. (229) bir bakteriyel sepsis modeli olarak erişkin dişi sıçanlara i.p. bakteriyel lipopolisakkarit vererek oluşturdukları sistemik inflamasyonun hippocampus'ta nörogenez üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çoğalma işaretleyicisi olarak BrdU, erken nöronal işaretleyici (Dcx: Doublecortine) ve mikroglia işaretleyicisi (CD68: cluster of differentiation) kullanılan bu çalışmada; GD'da aktive olmuş mikroglia yoğunluğunda %240 oranında artma, nörogenezde ise %35 oranında azalma gerçekleştiği bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, kortikosteroidlerin nörogenezin potent inhibitörü olduğu bilindiğinden, non-steroid bir anti-inflamatuvar ajan olan indometazin kullanmış ve indometazinin LPS'in oluşturduğu inflamasyon sürecinin nörogenez üzerine olan etkisini ortadan kaldırdığını, kontrol hayvanlarında ise nörogeneze etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmayı destekler şekilde, Ekdahl ve arkadaşları (230) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise LPS uygulanan sıçanlarda

hippocampus'ta nörogenezin güçlü bir şekilde engellendiği ve mikroglial aktivasyonu inhibe eden minosiklin uygulanan sıçanlarda ise etkilenen nörogenezin düzeltilebildiği ileri sürülmüştür. Mevcut çalışmada ise CLP uygulanarak sepsis oluşturulan sıçanlarda bir diğer nörogenez bölgesi olan SVZ'de nörogenezin anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. LPS modeli ile elde edilen sonuçlarla, bizim sonuçlarımız arasındaki farklar (i) nörogenezin incelendiği bölgenin farklı olmasına ve (ii) kullanılan yöntemin inflamasyona olan etkisinin farklı hızda gerçekleşmesine bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Alzheimer hastalarında hippocampus'un SGZ'unda nörogenezde belirgin bir artış saptanırken, bir diğer nörojenik bölge olan SVZ'da nöronal progenitör hücre havuzunun azalabildiğinin gösterilmesi (226), en azından bu hastalıkta beyin iki nörojenik bölgesinde nörogenez biçiminin farklı olduğunu düşündürmektedir. Dolayısı ile LPS uygulanarak gerçekleştirilen iki çalışma ile, CLP modelinde ilk kez gerçekleştirilen mevcut çalışmanın sonuçları arasındaki farklılığın bir nedeninin incelenen bölgenin farklı olmasından kaynaklanabileceğini düşünmek mümkündür.

Mevcut çalışmada ortaya konulan sonuçlar ile Monje ve ark. (229) ile Ekdahl ve ark.'nın (230) elde ettikleri sonuçların farklı olmasının bir diğer nedeni kullanılan yöntem olabilir. Akut sepsis modellerinden olan LPS modelinde, gram negatif bakteri duvarından izole edilen bir glikolipit olan LPS yukarıda adı geçen çalışmalarda sırasıyla i.p. yolla ve bir miniosmotik pompa kullanılarak beyine infüzyon yoluyla uygulanmıştır. Bu şekilde uygulanan bakteriyel toksinlerin konakta abartılı bir sitokin salınımına yol açtığı ve konak üzerinde daha belirgin bir zararlı etki gösterdiği düşünülmektedir (231) Ayrıca farklı türlerin LPS'e olan duyarlılıkların farklı olabileceği, örneğin kemirgenler, kediler ve köpeklerin endotoksine insanlara oranla daha dirençli olduğu da bilinmektedir (232) Dolayısıyla endotoksine dirençli hayvanlarda yüksek doz LPS kullanımının, insanlar gibi endotoksine duyarlı türlerde oluşmayan toksik etkilere yol açabileceği düşüncesi LPS modeli konusunda bir diğer çelişkili durumu oluşturmaktadır (233). Ayrıca; endotoksinin yalnız gram negatif bakteriler tarafından salınan bir madde olmasına rağmen, gram pozitif

bakteriler tarafından da sepsis oluşturulabilmesi (26) ve kortikosteroid veya anti-TNF α kullanımının LPS modelinde etkili olurken (234), klinik çalışmalarda etki göstermemesi (235), araştırmacılar arasında LPS enjeksiyonunun bir “sepsis modeli” olarak değil, “endotoksemik şok modeli” olarak adlandırılabilmesi yönünde uzlaşmaya varılmasına neden olmuştur (235). Oysa mevcut çalışmada kullanılan CLP modelinde sepsis bir cerrahi işlemle gerçekleştirilmekte, septik tablo karışık bakteriyel floranın peritoneal kontaminasyonu ile başlayan süreçte, inflamasyonun akut olarak değil kademeli olarak oluşmasına neden olmaktadır. LPS ve CLP modelleri arasındaki bu süreç farklılığı beyinde inflamatuvar sürecin başlamasında temel faktör olan mikroglial aktivasyonda da farklılıklara neden olabilir. Nitekim mikroglial aktivasyonun nasıl etkileyeceğinin, mikroglial aktivasyonun biçimine bağlı değişkenlik gösterebileceğine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır (229, 230). Bu varsayımı destekleyecek şekilde LPS tarafından oluşturulan mikroglial aktivasyonun nörogenez ve oligodendrojenizi engellediği ve bu etkiyi IL-1 β , IL-6, IFN- γ ve TNF α gibi pro-inflamatuvar mediyatörlerin mikroglialarda salınımının artmasıyla gerçekleştirildiği bildirilmektedir (229, 230). Ancak farklı şekilde mikroglial aktivasyonun nörogenez farklı yönde etkilediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; IL-4 ve IFN- γ aracılığıyla gerçekleşen adaptif bağışıklık cevabında, mikroglia aktivasyonunun nöronal sağkalımı artırdığı, nörogenez ve oligodendrojenizi uyardığı gösterilmiştir (236). Mikroglial aktivasyonun çoğalmakta olan nöronal kök veya öncü hücrelere uyarıcı etki oluşturabildiğini gösteren bir diğer kanıt da, deneysel otoimmün ensefalomyelitte mikroglia ve salınan sitokinlerin hasar alanına nöronal prekürsör hücre göçü ve takiben oligodendrogliozis oluştuğunu gösteren çalışmalardır (237). Walton ve ark. (238) istrahatteki mikroglial hücrelerin herhangi bir uyarı sinyali olmaksızın nörogenez pozitif yönde düzenleyebileceği iddia etmektedirler. Bu çalışmada SVZ'den izole edilen ve mikroglial hücrelerle birlikte kültür ortamına ekilen nöronal prekürsör hücrelerin nöroblast oluşturma yeteneğini artırdığı öne sürülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızda kullanılan CLP modelinin zaman içerisinde gelişen mikrogial aktivasyonu ve sitokin salınımının, LPS uygulamasının akut olarak uyardığı mikrogial aktivasyondan farklı gelişmesi, iki farklı modelde elde edilen sonuçların farklılığının açıklanmasını sağlayabilecek bir diğer yaklaşımdır.

SVZ'da yeni oluşan nöronlar normal şartlar altında rostral göç akımını kullanarak bulbus olfactorius'a gelmekte ve burada internöronlara farklılanmaktadır. Arteria cerebri media obstruksiyonu gibi patolojik durumlarda oluşan yeni nöronların striatum gibi farklı beyin bölgelerine göç edebildiği ve burada farklılanarak hasar bölgesinin rejenerasyonuna katkı sağlayabildiği bildirilmiştir (154). Mevcut çalışmada beyinde yer alan germinal merkezlerden biri olan ventriculus lateralis'in SVZ'unda, hem dorsolateral köşe olarak tanımlanan bölümünde hem de dış duvar bölümünde, CLP uygulanan hayvanlarda kontrol gruplarına oranla çoğalmakta olan BrdU pozitif hücrelerin anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. Elde edilen bu bulgular, sepsiste serebral disfonksiyonun ortaya çıkışının engellenmesine yönelik olarak bazı beyin bölümlerinde nörogenezin artışıyla karakterize bir yanıt olduğunu düşündürmektedir. Gelecekte yapılan çalışmalarda çoğalma sonrası oluşan yeni nöronların farklı bir göç yolu kullanıp kullanmadıklarının, inflamasyonun etkilediği bir mikroçevrede oluşan yeni nöronların sağkalım sürelerinin değerlendirilmesi gerekli görülmekte ve bu çalışmaların sepsiste SVZ'de arttığını saptadığımız yeni hücre oluşumunun, serebral fonksiyon bozukluğuna olan etkisinin anlaşılmasına katkısı olacağını düşünmek mümkün görünmektedir.

Sepsisli hastaların beyinlerinde ve farklı hayvan sepsis modellerinde beyin çeşitli bölümlerinde apoptotik hücre ölümünün arttığını gösteren çalışmalar (50, 72) ile mevcut çalışmada SVZ'de saptadığımız çoğalma artışının, artmış apoptoza bağlı hücre kayıplarını kompanse etmeye yönelik bir süreç olabileceğini de düşündürmektedir.

Nörogenez çalışmalarında en çok tercih edilen çoğalma işaretleyicisi olarak kullanılan BrdU ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, incelenecek olan beyin bölgesi için gerekli BrdU dozunun farklılık

gösterebildiğini, SVZ için ise gerekli doz miktarının GD için gerekli dozdan daha az olduğunu göstermektedir (160). Literatürde CLP yöntemi sepsis modeli olarak çok sık kullanılmakla birlikte nörogenezin incelenmesi yönünde bu yöntem kullanılarak yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle mevcut çalışmada öncelikle hedeflendiği gibi SVZ'de nörogenez değerlendirilmesi yapılarak artmış hücre çoğalmasının varlığı ortaya konulmuştur. Ayrıca hippocampus'un GD'unda çoğalmakta olan hücrelerin incelenmesi ile kontrol, sham ve CLP grupları arasında karşılaştırma yapılamayacak kadar az sayıda çoğalmakta olan hücre sayısına ulaşılması, uygulanan BrdU dozunun hippocampus'un bir bölümü olan GD'un incelenmesi için yeterli olmadığını düşündürmüştür. Bu durumu aydınlatmak amacıyla BrdU'nun farklı doz uygulamasının yapılacağı çalışmalar planlanmalıdır.

Mevcut tez çalışmasıyla elde edilen sonuçlar;

- 1) CLP modelinin sepsis çalışmaları için kullanılabilecek, uygun ve sepsisli hastalarda görülen bulgulara benzer bulguların geliştiği bir model olduğunu
- 2) CLP modeli üzerinde SİE patofizyolojisi ya da tedavisine yönelik gelecekte yapılması planlanacak çalışmalarda ensefalopati gelişiminin doğrulanması amacıyla EcoG ve SUP kayıtları gibi yöntemlerin kullanılmasının faydalı olabileceğini ve
- 3) CLP uygulanan hayvanlarda SVZ'de nörogenez artışının sepsis ve SİE'de beyinde ortaya çıkan patolojik etkileri ve hücre kaybını telafi etmeye yönelik bir mekanizması olacağını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Wenzel RP, Pinsky MR, Ulevitch RJ, Young L. Current understanding of sepsis. *Clin Infect Dis* 1996;22:407-12.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, et al. Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest* 2005;127:942-51.
10. 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.
11. 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.
12. Flaatten H. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. *Crit Care* 2004;8:180-4.
13. Sundararajan V, Maclsaac CM, Presneill JJ, et al. Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. *Crit Care Med* 2005;33:71-6.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
 17. Balk RA. Severe sepsis and septic shock: definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin* 2000;16:179-92.
 18. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207-14.
 19. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*. 1998;26:2078-86
 20. Wilson JX, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Neurol J Southeast Asia* 2003;8:65-76.
 21. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457-69.
 22. Schaberg DR, Culver DH, Gayners RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991;Suppl B:725-55.
 23. Yap HY, Kwok KM, Gomersall CD, et al. Epidemiology and outcome of *Candida* bloodstream infection in an intensive care unit in Hong Kong. *Hong Kong Med J*. 2009;15:255-61.
 24. Adukauskienė D, Kinderytė A, Dambrauskienė A, Vitkauskienė A. Candidemia in an intensive care unit. *Medicina* 2009;45:351-6.
 25. Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:87-91.
 26. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *Lancet* 2005;365:63-78.
 27. Mollnes TE, Christiansen D, Brekke OL, Espevik T. Hypothesis: combined inhibition of complement and CD14 as treatment regimen to attenuate the inflammatory response. *Adv Exp Med Biol* 2008;632:253-63.
 28. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-147.
 29. 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.
 30. Paterson RL, Webster NR. Sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *J R Coll Surg Edinb* 2000;45:178-82.
 31. Tsitou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 2005;11:76.
 32. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996;77:110-17.
 33. 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.
 34. Fink MP. Therapeutic options directed against platelet activating factor, eicosanoids and bradykinin in sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1998;A:81-94.
 35. Consales G, Gaudio AR. Sepsis associated encephalopathy. *Minerva Anestesiol* 2005;71:39-52.

36. Bleck TP, Smith MC, Pierre-Louis SJ-C, et al. Neurologic complications of critical medical illnesses. *Crit Care Med* 1993;21:98–103.
37. 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
38. Pytel P and Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol.* 2009;22:283-7.
39. Young GB, Bolton CF, Austin TW, et al. The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med* 1990;13:297-304.
40. Bolton CF. Neuromuscular manifestations of critical illness. *Muscle Nerve* 2005;32:140-63.
41. Witt NJ, Zochodne DW, Bolton CF, et al. Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest* 1991;99:176-84.
42. 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.
43. 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.
44. Straver JS, Keunen RWM, Stam CJ, et al. Nonlinear analysis of EEG in septic encephalopathy. *Neurol Res* 1998;20:100–6.
45. Sharshar T, Gray F, Poron F, et al. Multifocal necrotizing leucoencephalopathy in septic shock. *Crit Care Med* 2002;30:2371-5.
46. Davies DC. Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. *J Anat* 2002;200:639-46.
47. 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.
48. 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
49. 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.
50. 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.
51. 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
52. 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
53. Brown GC. Nitric oxide as a competitive inhibitor of oxygen consumption in the mitochondrial respiratory chain. *Acta Physiol Scand* 2000;168:667-74.

54. 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.
55. Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, et al. Pathophysiology of septic encephalopathy: A review. *Crit Care Med* 2000; 28: 3019-24
56. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000;117:841-54.
57. Buado RJ. Molecular biology of brain capillaries. Introduction to the blood-brain barrier. In: Partridge WM (ed). UK: Cambridge University Press; 1999. 151-164.
58. Virgintino D, Monaghan P, Robertson D, Errede M, Bertossi M, Ambrosi G, Roncali L. An immunohistochemical and morphometric study on astrocytes and microvasculature in the human cerebral cortex. *Histochem J* 1997;29:655-60.
59. Nishioku T, Dohgu S, Takata F, et al. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol* 2008 .
60. Pan W, Yu C, Hsuchou H, et al. Neuroinflammation facilitates LIF entry into brain: role of TNF. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:C1436–C1442.
61. Pan W, Hsuchou H, Yu C, Kastin AJ. Permeation of blood-borne IL15 across the blood-brain barrier and the effect of LPS. *J Neurochem* 2008; 106:313–319.
62. Hofer S, Bopp C, Hoerner C, et al. Injury of the blood brain barrier and upregulation of icam-1 in polymicrobial sepsis. *J Surg Res* 2008; 146:276– 281.
63. Audoy-Remus J, Richard JF, Soulet D, et al. Rod-shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2. *J Neurosci* 2008; 28:10187–10199.
64. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, et al. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int* 2008; 52:447–456.
65. Sprung CL, Cerra FB, Freund HR. Amino acid alterations and encephalopathy in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1991;19:753-7.
66. 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.
67. 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.
68. DeMeester SL, Qiu Y, Buchman TG, et al. Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit Care Med*. 1998;26:1500-9.
69. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1440-50.

70. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:1149-63.
71. 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.
72. Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D, Annane D. Science review: The brain in sepsis--culprit and victim. *Crit Care* 2005;9:37-44.
73. 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.
74. 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.
75. Dodds WJ. An effective mass-screening program for animal models of the inherited bleeding disorders. *Prog Clin Biol Res* 1982;94:117-32.
76. 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.
77. Wijdicks EFM, Sharbrough FW. New-onset seizures in critically ill patients. *Neurology* 1993;43:1024-42.
78. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49:186-96.
79. 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.
80. McCuskey RS, McCuskey PA, Urbaschek R, Urbaschek B. Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity. *Infect Immun* 1984;45:278-80.
81. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature Rev Drug Discov* 2005;4:854-65.
82. Wyler F, Neutze JM, Rudolph AM. Effects of endotoxin on distribution of cardiac output in unanesthetized rabbits. *Am J Physiol* 1970;219:246-51.
83. 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.
84. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001;88:22-30.
85. Remick DG, Kunkel SL. Pathophysiologic alterations induced by tumor necrosis factor. *Int Rev Exp Pathol* 1993;Pt B:7-25.
86. 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.
87. Spohn G, Bachmann MF. Therapeutic vaccination to block receptor-ligand interactions. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:469-76.

88. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002;14:103-10.
89. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986;234:470-4.
90. 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;334:1697–702.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Pass LJ, Schloerb PR, Pearce FJ, Drucker WR. Cardiopulmonary response of the rat to gram-negative bacteremia. *Am J Physiol* 1984;246:H344-50.
96. Crocker SH, Lowery BD, Eddy DO, et al. Pulmonary clearance of blood-borne bacteria. *Surg Gynecol Obstet* 1981;153:845-51.
97. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 2007;81:137-43.
98. 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.
99. Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock* 2005;Suppl 1:7-11.
100. 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.
101. William J. Hubbard, Mashkoor, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005;24: 52–7.
102. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 2005;353: 811–22.
103. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 1999;286:548-52.
104. Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10910-7
105. Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 2002;22:1784–93.

106. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997;276:66–71
107. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 2006;16:250-60.
108. Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* 2005;36:1278-82.
109. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, et al. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001;411:42-3.
110. Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14895-900.
111. Angelo L, Vescovi, Rossella Galli and Brent A. Reynolds Brain tumour stem cells *Nature* 2006;6:425-36.
112. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997;17: 5046-61.
113. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994;264: 1145-8.
114. 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.
115. 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.
116. Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 1996;16: 7599-609.
117. Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:135-41.
118. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287:1433-38.
119. Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Brain Cell* 1999;97:1-20.
120. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo MG. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 2002; 22: 629-34.
121. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999;96: 25-34.
122. Menezes JRL, Smith CM, Nelson KC, Luskin MB. The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci* 1995;6:496-508.
123. Thomas LB, Gates MA, Steindler DA. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia* 1996;17:1-4.

124. Lim DA, Alvarez-Buylla A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7526-31.
125. Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. Proliferation “hot spot” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 1990;5: 101-9.
126. Malate P, Hartfuss E, Gotz M. Isolation of radial glial cell by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 2000;127:5253-63.
127. Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 2001;31:727-41.
128. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 2001;409:714-20.
129. Petreanu L, Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 2002;22:6106–13.
130. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, and Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 2003;6: 507–18,.
131. Hughes P, Dragunow M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 1995;47:133–178.
132. Huang L, Bittman EL. Olfactory bulb cells generated in adult male golden hamsters are specifically activated by exposure to estrous females. *Horm Behav* 2002;41: 343–50.
133. Amaral DG. Memory: anatomical organization of candidate brain regions. In: Brookhart JM, Montcastle VB, Bethesda MD (eds). *Handbook of Physiology, V: The Nervous System*. Bethesda: American Physiological Society; 1987. 211–94.
134. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989;31:571-91.
135. Lathe R. Hormones and the hippocampus. *J Endocrinol* 2001;169:205-31.
136. Mark FB, Barry WC, Michael A. Paradiso (eds). *Neuroscience exploring the brain*. 3th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 77.
137. Noback CR, Demarest RJ. *The Nervous System*. 3rd edition. New York: Mc Graww-Hill Book Comp; 1986. 265-6.
138. Amaral DG, Insausti R. Hippocampal Formation. In: Paxinos G (ed). *The Human Nervous System*. 2nd Edition. California: Academic Press Inc; 1990.
139. Green JD. The Hippocampus. In: Field J (ed). *Handbook of Physiology* 1st edition. Vol. 2. Washington: American Physiological Society; 1960. 1373-89.
140. Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33:232-52.

141. Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 1963;145: 573-92.
142. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965;124: 319-36.
143. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4: 1313-17.
144. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, et al. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 5263-67.
145. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001;21: 7153-60.
146. Kaplan MS, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 1984;4:1429–41.
147. Sakakibara SI, Nakamura Y, Satoh H, Okano H. RNA-binding protein musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J Neurosci* 2001;21:8091–107.
148. Ming, GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2005;28: 223–50.
149. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 1993;56: 337-44.
150. Song H, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002;5: 438-45.
151. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:191-8.
152. Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* 1998;8: 939-42.
153. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386: 493-5.
154. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8: 963–70.
155. Yoshikawa K. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res* 2000;37: 1-14.
156. Nevins JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992;258: 424-29.
157. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81: 323-30.
158. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, and Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992;359: 295–300.
159. Jacobs LF, Schenk F. Unpacking the cognitive map: the parallel map theory of hippocampal function. *Psychol Rev* 2003;110:285–315.

160. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 2005;85:523-69.
161. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997;17: 5820–29.
162. Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, et al. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 5874-79.
163. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994;13: 1071-82.
164. Okano HJ, Pfaff DW, Gibbs RB. Expression of EGFR-, p75NGFR-, and PSTAIR (cdc2)-like immunoreactivity by proliferating cells in the adult rat hippocampal formation and forebrain. *Dev Neurosci* 1996;18:199–209.
165. Jin K, Mao XO, Sun Y, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2002;22: 5365-73.
166. Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 1997;17: 7850–59.
167. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001;21: 1628-34.
168. Kirschenbaum B, Goldman SA. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 210-14.
169. Jin K, Zhu Y, Sun Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11946-50.
170. Marti E and Bovolenta P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 2002;25: 89–96.
171. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia- Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000;28:713-26.
172. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965;124: 319-35.
173. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 1966;126:337-89
174. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 1989;18: 311-18.

175. Kaplan MS. Proliferation of subependymal cells in the adult primate CNS: differential uptake of DNA labelled precursors. *J. Hirnforsch* 1983;24:23–33.
176. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386: 493–5.
177. Yang H, Lu P, McKay HM, et al. Endogenous neurogenesis replaces oligodendrocytes and astrocytes after primate spinal cord injury. *J Neurosci* 2006; 26: 2157-66.
178. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 2000;405: 951–955.
179. Gould, E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 1999a;286, 548-52.
180. Gould, E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999b;96, 5263-67.
181. Cameron H.A., McKay R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2001;435, 406–417.
182. Zhao M., Momba S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100: 7925-30.
183. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 11879-83.
184. Philippe T. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations and validation. *Brain Res Rev* 2007;53:198-214.
185. Kee N, Sivalingam S , Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis *J Neurosci Methods* 2002;115:97-105
186. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121: 2228-223.
187. Mandyam CD, Norris RD, Eisch AJ. Chronic morphine induces premature mitosis of proliferating cells in the adult mouse subgranular zone. *J Neurosci Res* 2004;76: 783-94.
188. Gould E, Tanapat P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 1997;80: 427-36.
189. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 1999;19:8487-97.
190. Akamatsu W, Okano HJ, Osumi N, et al. Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 9885-90.

191. Minturn JE, Geschwind DH, Fryer HJ, Hockfield S. Early postmitotic neurons transiently express TOAD-64, a neural specific protein. *J Comp Neurol* 1995;355: 369-79.
192. Francis F, Koulakoff A, Boucher D. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 1999;23: 247-56,
193. Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7:640-46.
194. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992;116: 201-11.
195. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, et al. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 2008;11: 1153-61.
196. Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1823-28.
197. Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002;415, 1030-34.
198. Toni N, Teng EM, Bushong EA, et al. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 2007; 10:727-34.
199. Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, et al. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PNAS* 2006;103:17501-6.
200. Duman RS. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 2004;56:140-5.
201. Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 12796-801.
202. Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2003;17, 2042–46.
203. Shingo T, Gregg C, Enwere E, et al. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 2003;299: 117-20.
204. Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA. Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 1998;139: 4102–7.
205. Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez AP, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 2006;26: 6627-36.
206. Wang DD, Krueger DD, Bordey A. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J Physiol* 2003;550: 785–800.
207. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001;411:42-3.

208. Sulagna D, Anirban B. Inflammation: A new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci* 2008;86:1199-208.
209. 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.
210. Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, Sprung CL. The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA* 1996; 275: 470-73.
211. Young GB, Bolton CF, Archibald YM, et al. The electroencephalogram in sepsis-associated encephalopathy. *J Clin Neurophysiol* 1992; 9:145-52.
212. Young GB, Bolton CF, Austin TW, et al. The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med* 1990;13:297–304.
213. 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.
214. Goldman SA, Kirschenbaum B, Harrison-Restelli C, Thaler HT. Neuronal precursors of the adult rat subependymal zone persist into senescence, with no decline in spatial extent or response to BDNF. *J Neurobiol* 1997;32: 554–66.
215. Gage FH. Stem cells of the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8: 671-6.
216. Cameron HA, McKay RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 1999;2: 894-7.
217. Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, et al. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 2000;41:10-8.
218. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110:429-41.
219. Simard AR, Rivest S. Role of inflammation in the neurobiology of stem cell. *Neuroreport* 2004;15:2305-10.
220. Basu A, Lazovic J, Krady JK, et al. Interleukin-1 and the interleukin-1 type 1 receptor are essential for the progressive neurodegeneration that ensues subsequent to a mild hypoxic/ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:17–29.
221. Parent JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 2003;9:261–72.
222. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 1998; 18:776-78.
223. Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13:127-32.
224. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;17:3727-38.

225. Jin K, Mao XO, Sun Y, Xie L, Greenberg DA. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2002;110:311-19
226. Jin K, Galvan V, Xie L, et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw}, Ind) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 13363-67.
227. Shan X, Chi L, Bishop M, et al. Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells* 2006;24:1280-87
228. Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, et al. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9023-7.
229. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302: 1760-65.
230. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience* 2009;158:1021-9.
231. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 1994;120:771-83.
232. Alejandra GG, Luiz FPF, Maurício RS. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir Bras* 2004;19:82-8.
233. Piper RD, Cook DJ, Bone RC, Sibbald WJ. Introducing critical appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24:2059-70.
234. Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999; 27:1608-16.
235. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003;112:460-7.
236. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2006 ;31:149-60.
237. Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13211-6.
238. Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, et al. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 2006;54: 815-25.

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonunca desteklenen T2006/24 nolu “Deneysel Sepsis Sıçan Modelinde Sepsisin Beyin Dokusuna Etkilerinin Araştırılması” isimli proje kapsamında gerçekleştirdiğim bu çalışmanın planlamasında ve yürütülmesinde bilgi ve becerisinden yararlandığım, bana destek olan ve yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. M. Ayberk Kurt hocama, çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. İlker M. Kafa, Uzm. Dr. Murat Uysal’a ve Prof. Dr. N. Őimřek Cankur, Prof. Dr. İhsaniye Coşkun, Prof. Dr. Hakan Oygucu, Prof. Dr. Erdoğan Őendemir, Prof. Dr. İlknur Arı hocalarıma, Uludağ Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı’ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma, destek ve sevgilerini hiç bir zaman esirgemeyen eşim Mehpere ve oğlum Rüzgar Bakırcı’ya teşekkür ederim.