

GÜLTEN ATEŞ ULUÇAY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**SEPSİS OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA BEYİN VE KAS
DOKUSUNDA İYONOTROPİK GABA RESEPTÖR
BLOKAJININ ETKİLERİ**

GÜLTEN ATEŞ ULUÇAY

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE ŞULE TAMER**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora öğrencisi Gülten ATEŞ-ULUÇAY tarafından Prof.Dr.Ayşe Şule TAMER.'in danışmanlığında hazırlanan "Sepsis Oluştulmuş Sıçanlarda Beyin ve Kas Dokusunda İyonotropik GABA Reseptör Blokajının Etkileri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 26/12/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Levent ERTUĞRUL
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Fiziyojji Anabilim Dalı

**Jüri-Danışman**

Prof.Dr.Ayşe Şule TAMER
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Fiziyojji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof.Dr.Elif ÖZKÖK
İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar DETAE SİNİRBİLİM AD

**Jüri**

Prof.Dr.Asiye NURTEN
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fiziyojji AD

**Jüri**

Doç.Dr.Gül İLBAY
Kocaeli Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fiziyojji AD



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

GÜLTEN ATEŞ ULUÇAY

İTHAF

Geçtiğim okul sıralarından çeşitli nedenlerle geçemeyen, olduğum yaşı göremeyen
insanlara,
Tüm kayıplarına ve
Necef Gözler'e ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bana yardımcı ve yol gösterici olan, ilgisini ve desteğini esirgemeyen öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum danışmanım Prof. Dr. Ayşe Şule Tamer'e, çalışma boyunca yardımları ve desteğiyle yanımda olan Prof. Dr. Elif Özkök'e, histolojik çalışmalarda yardımcı olan, Dr. Öğr. Üyesi Gül İpek Gündoğan'a, Fizyoloji Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Aytül Uyar'a, tüm Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve asistan arkadaşlarıma,

İlgisini, desteğini ve paylaşımlarını esirgemeyen İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Asiye Nurten ve Dr. Öğr. Üyesi Aslı Zengin Türkmen'e, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Demir Budak ve tüm tıp fakültesi öğretim üyeleri ve eski-yeni tüm asistanlarına,

Ateş, Uluçay, Gözler ve Acar ailelerine, sevgili öğretmenim Sakine Yağmur'a, tüm bu süreçte desteği hep benimle olan Selin Yağmur'a, görsel ve işitsel motivasyonumun kaynağı Pentagram grubuna,

Eğitim hayatıma her türlü destek ve katkıları sonsuz olan, beni yetiştiren eğitim sevgisini küçük yaşlardan beri aşılayan annem ve babama her zaman yanımda olan kardeşime, tüm zorlukları birlikte aştığım yol arkadaşım Doruk Uluçay'a,

Hayatıma dokunan, yollarımızın kesiştiği herkese ve tüm kahramanlarıma,

ve bir kadın olarak eğitim hayatımı borçlu olduğum Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk'e,

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. SEPSİS	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Tanım	2
2.1.3. Etiyoloji.....	3
2.1.4. Epidemiyoloji.....	4
2.1.5. Patogeneze	5
2.1.6. Patofizyoloji	5
2.1.6.1. Pro ve Anti-inflamatuvar Hücresel Sinyal / Sinyal İletimi	5
2.1.6.2. Nükleer Faktör Kappa-β,.....	7
2.1.6.3. Pro-ve Anti-İnflamatuvar Mediyatörlerin Salınması	8
2.1.6.4. Yüksek Mobilite Grup 1 Proteini	9
2.1.6.5. Bağışıklık ve Nonimmün Efektör Hücre Disfonksiyonu	9
2.1.6.6. Ciddi Sepsiste Nötrofil Disfonksiyonu	10
2.1.6.7. Hızlandırılmış Lenfositik Apoptoz	10
2.1.6.8. Ciddi Sepsiste Diğer Biyolojik Sistemlerle Etkileşimler	10
2.1.6.9. Ciddi Sepsiste Pıhtılaşma Kaskadı.....	10
2.1.6.10. İmmunoinflamatuvar Yanıtın Nöral Regülasyonu: Vagal İnflamatuvar Refleks Ve Sempatik Sistemin Konak Yanıtına Etkileri	11

2.1.7. Endotoksin	12
2.1.8. Septik Ensefalopati	14
2.1.8.1. Klinik Belirtiler	16
2.1.8.2. Patogenez	16
2.1.8.3. Serebral Endotelyal Hücreler	18
2.1.8.4. Astrositler	19
2.1.8.5. Nöronlar	19
2.1.9. Septik Miyopati.....	21
2.2. SİTOKİNLER	21
2.2.1. Pro-inflamatuvar sitokinler	22
2.2.2. Anti-inflamatuvar sitokinler.....	24
2.3. SİNAPTİK İLETİ PROTEİNLERİ.....	25
2.3.1. SNARE Proteinleri.....	25
2.3.2. Sinaptofizin	27
2.4. GAMMA AMİNO BÜTİRİK ASİT (GABA)	28
2.4.1. GABA Reseptörleri:.....	29
2.4.1.1. GABA _A Reseptörü:.....	30
2.4.1.2. GABA _B Reseptörü:.....	30
2.4.1.3. GABA _C Reseptörü:.....	31
2.5. BICUCULLINE	31
2.6. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)	33
2.6.1. Lipid Peroksidasyonu.....	34
2.7. ELEKTROFİZYOLOJİK KAYIT YÖNTEMLERİ	36
2.7.1. Elektroensafalogram (EEG).....	36
2.8. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER	39
2.8.1. Nöron Spesifik Enolaz (NSE).....	39
2.8.2. S100-β	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Deney Grupları:	41
3.2. Sepsis Modelinin oluşturulması:	42
3.3. Bicuculline Uygulaması:.....	42
3.4. Anestezi:	42
3.5. Vücut Sıcaklıklarının Ölçülmesi:.....	42

3.6. Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması:	42
3.7. Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi:	43
3.8. Doku Homojenizasyonu:	43
3.9. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) Çalışmaları:	43
3.10. Bouge Metodu ile TBARS Düzeylerinin Ölçülmesi:	43
3.11. İmmünfloresan Boyama:	44
3.12.1. Preparat hazırlama:	44
3.12.2. Çoklu Floresan Boyama:	44
3.12.3. Protokol Basamakları:	46
3.12. İstatistiksel İncelemeler:	47
3.13. Kullanılan Cihazlar	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Sepsis Bulguları	48
4.2. Deneysel Bulgular.....	49
5. TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR	73
HAM VERİLER	88
FORMLAR	89
ETİK KURUL KARARI	90
PATENT HAKKI İZNİ	91
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	92
ÖZGEÇMİŞ	93

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Gruplar arası EEG analizi.....	53
Tablo 2: Gruplara göre beyin dokusunda TNF- α değerlerinin karşılaştırılması.....	54
Tablo 3: Gruplara göre beyin dokusunda IL-10 değerlerinin karşılaştırılması	54
Tablo 4: Gruplara göre beyin dokusunda GABA değerlerinin karşılaştırılması	54
Tablo 5: Gruplara göre beyin dokusunda MDA değerlerinin karşılaştırılması	55
Tablo 6: Gruplara göre kas dokusunda TNF- α değerlerinin karşılaştırılması	55
Tablo 7: Gruplara göre kas dokusunda IL-10 değerlerinin karşılaştırılması	55
Tablo 8: Gruplara göre kas dokusunda GABA değerlerinin karşılaştırılması.....	56
Tablo 9: Gruplara göre kas dokusunda MDA değerlerinin karşılaştırılması.....	56
Tablo 10: Gruplar arası serum NSE değerleri	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Her 100.000 vakada sepsis insidansı (ABD), Dünya Sepsis Günü Organizasyonu, 2014	4
Şekil 2-2: İnflamatuvar Sinyal Yolağı (Jay, 2006) ²²)	7
Şekil 2-3: Endotoksinin dokular üzerine etki mekanizması	14
Şekil 2-4: Sepsis ve Septik Ensefalopati İlişkisi (Dal-Pizzol ve ark., 2014) ⁵⁴	15
Şekil 2-5: Sinapsın yapısı, nörotransmitter salınımı ve sinaptik proteinler	27
Şekil 2-6: GABA üretimi ve ilişkileri (Is Your Brain Making Enough GABA? – Dr. Jocker).....	29
Şekil 2-7: Sistemik İnflamasyondan – Beyin disfonksiyonuna giden mekanizmada ROS/RNS’lerin Rolü	35
Şekil 4-1: Deney Öncesi Ölçülen Vücut Sıcaklıkları (°C).....	48
Şekil 4-2: Gruplar arası lökosit sayılarının karşılaştırılması	48
Şekil 4-3: Gruplara göre beyin dokusunda TNF- α ve IL-10 seviyeleri.....	49
Şekil 4-4: Gruplara göre beyin dokusunda GABA ve MDA seviyeleri	50
Şekil 4-5: Gruplara göre kas dokusunda TNF- α ve IL-10 seviyeleri	51
Şekil 4-6: Gruplara göre kas dokusunda GABA ve MDA seviyeleri.....	52
Şekil 4-7: Sepsisli Sıçandan alınan non-invaziv EEG kaydı	53
Şekil 4-8: Gruplar arasında beyin dokusunda DAPI, NEUN, S100- β boyamaları x 10. 57	
Şekil 4-9: Gruplar arasında beyin dokusunda S100- β boyamaları x 10, x 40	58
Şekil 4-10: Gruplar arasında beyin dokusunda DAPI, NEUN, Sinaptofizin boyamaları x 10	59
Şekil 4-11: Gruplar arasında beyin dokusunda Sinaptofizin boyamaları x 10, x 40	60
Şekil 4-12: Gruplar arasında kas dokusunda DAPI, NEUN, S100- β boyamaları x 10 ..	61
Şekil 4-13: Gruplar arasında kas dokusunda Sinaptofizin boyamaları- x 10, x 40	62
Şekil 4-14: Gruplar arasında immünofloresan boyama skorlaması (S100- β).....	63
Şekil 4-15: Gruplar arası immonofloresan boyama skorlaması (Sinaptofizin-Beyin) ...	63
Şekil 4-16: Gruplar arası immünofloresan boyama skorlaması (Sinaptofizin-Kas).....	64

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACCP: Amerikan Göğüs Hastalıkları Uzmanları Derneği

ACh: Asetilkolin

ADA: Adenozin deaminaz

ADP: Adenozin difosfat

ALT: Alanin aminotransferaz

AMP: Adenozin monofosfat

APC: Aktive protein C

ARDS: Akut respiratuvar distres sendromu

AST: Aspartat Aminotransferaz

ATP: Adenozin trifosfat

BIC: Bicuculline

BMI: Bicuculline methiodide

CARS: Kompensatuvar anti-inflamatuvar yanıt sendromu

CD14: Yüzey farklılaşma antijeni 14

CDC: Hastalık kontrol ve önleme merkezi

CK: Kreatin Kinaz

COX: Siklooksijenaz

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DIC: Dissemine intravasküler koagülasyon

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EEG: Elektroensefalogram

EPSP: Uyarıcı Postsinaptik Potansiyel

GABA: Gamma (γ)- amino bütirik asit

GABA_A: Gamma amino bütirik asit Reeptörü- A

GABA_B: Gamma amino bütirik asit Reseptörü- B

GABA_C: Gamma amino bütirik asit Reseptörü- C

GABA-T: GABA – transaminaz

GAD: Glutamik asit dekarboksilaz

GSH: Glutasyon
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HMGB1: Yüksek mobilite grubu kutu 1 proteini
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICAM-1: Hücreler arası adezyon molekülü-1
IFN γ : İnterferongama
IL: İnterlökin
IPSP: İnhibe edici Postsinaptik Potansiyel
i.p.: İntraperitoneal
iNOS: Nitrik Oksit Sentaz
JAK: Janus Kinaz
LBP: Lipopolisakkarid Bağlayıcı Protein
LDH: Laktat dehidrogenaz
LPS: Lipopolisakkarid
M.Ö.: Milattan Önce
MDA: Malondialdehit
mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
MYD88: Miyeloid farklılaşma birincil tepki proteini 88
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit
NeuN: Nöronal Nukleus
NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa-Beta (β)
NK: Doğal öldürücüler
NSCLC: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
NSE: Nöron spesifik enolaz
PGE₂: Prostoglandin E₂
RAGE: İnsanda ileri glikasyon son ürünleri
RNS: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
s.c.: Subkutan

S100- β : S100 kalsiyum bağlayıcı protein β
SCCM: Yoğun Bakım Derneği
SCLC: Küçük hücreli akciğer kanseri
SE: Septik ensefalit
SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
STAT: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TBARS: Tiyobarbitürik reaktif ürünleri
TH: yardımcı T hücreleri
TIR: Toll / interlökin 1 (IL-1) reseptör homologisi
TIRAP: Toll / interlökin 1 (IL-1) reseptör homologisi adaptör protein
TLR: Toll benzeri reseptör
TNF- α : Tümör nekrotizan faktör-alfa
TRAM: TRIF adaptör molekülü
TREG: T-düzenleyici hücreler
TRIF: TIR domeni içeren adaptör protein-indükleyici interferon-b
VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
 α 7nAChR: alfa-7-nikotinik asetilkolin reseptörü
 α 5nAChR: alfa-5-nikotinik asetilkolin reseptörü

ÖZET

Ateş Uluçay G. Sepsis oluşturmuş sıçanlarda beyin ve kas dokusunda iyonotropik GABAreseptör blokajının etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, Ensefalit, GABA, Bicuculline, Kas

Sepsis, konağın enfeksiyona karşı düzensiz yanıtı ile başlayan hayatı tehdit eden organ yetmezliği olarak tanımlanır. Sepsisi takiben gelişen ensefalopati Merkezi Sinir Sistemi ile birlikte pek çok dokuyu etkileyen bir durumdur. Mortalite ve morbidite oranı oldukça yüksektir. Çalışmamızda, lipopolisakkarid (LPS) uygulaması ile sepsis oluşturduğumuz sıçanlarda inflamasyonun beyin ve kas dokusunda oluşturduğu hasarın iyonotropik GABA_A reseptörü antagonisti olan Bicuculline'in etkilerini incelemeyi amaçladık. Deneysel olarak LPS ile sepsis oluşturulan sıçanlar; kontrol, LPS (10 mg/ kg i.p.), Bicuculline (1.5 mg/kg s.c.), LPS+Bicuculline olmak üzere 4 gruba ayrıldı. LPS 10 mg/kg olarak 24 saat süreyle i.p. olarak uygulandı. Hemodinamik değişikliklerin takibi amacıyla vücut sıcaklıkları rektal olarak ölçüldü. Nörofizyolojik değişiklikler EEG ile non-invaziv olarak kaydedildi. Kas ve beyin dokusunda sitokinlerden pro-inflamatuvar TNF- α , anti-inflamatuvar IL-10 seviyeleri ile GABA düzeyleri incelendi. İnflamasyon bulguları ve hasar takibi için, lökosit sayısı ve serum Nöron Spesifik Enolaz (NSE) düzeyleri ölçüldü. Morfolojik analiz için NeuN, S100- β ve sinaptofizinin antikorları kullanılarak immünofloresan boyama yöntemi ile incelendi. İstatistiksel analiz, tek yönlü varyans analizi ve post-hoc Tukey testi ile yapıldı. Sonuçlarımızda, LPS grubunda inflamasyonun beyin ve kas dokusunda inflamatuvar parametreleri kontrol grubuna göre yükselttiğini ve immünofloresan boyamada S-100 β tutulumunun artması ve sinaptofizinin tutulumunun azalması ile birlikte doku düzeyinde hasara neden olduğunu gözlemledik. Elektrofizyolojik kayıtlarda LPS grubunda akut non-fokal nöbetle uyumlu aktivite gözlemlenirken diğer deney gruplarında istirahat durumu ile uyumlu aktivite bulunmaktadır. GABA_A antagonisti olan Bicuculline Methiodide'in, sepsisli sıçanlarda görülen nörotransmitter dengesinin bozulması, pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinde artma, anti-inflamatuvar sitokin seviyelerinde azalma, lipid peroksidasyon seviyelerinde artma gibi inflamatuvar süreci iyileştirici yönde bir ajan olabileceğini düşünmekteyiz.

ABSTRACT

Ates Ulucay G. The effects of ionotropic gaba receptor blockade in brain and muscle tissue in sepsis induced rats. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Physiology. Doctoral Thesis. Istanbul. 2018.

Key Words: Sepsis, Encephalitis, GABA, Bicuculline, Muscle

The encephalopathy which develops following sepsis is defined as life-threatening organ failure due to the irregular response of the host to infection which has extremely high mortality-morbidity rate and affects the nervous system and muscle. In our study, we aimed to investigate effects of inflammation on brain and muscle tissue and the effects of GABA_A receptor antagonist Bicuculline in rats with sepsis. Experimentally, sepsis induced with LPS on rats; they were separated 4 groups: control, LPS (10 mg/kg i.p.), Bicuculline (1.5 mg/kg s.c.), LPS+Bicuculline. Electrophysiological recordings and body temperature measurements were completed at 24 hours after injection, Blood was taken from the heart for Leukocyte count and Neuron specific enolase (NSE) levels measured. Brain and gastrocnemius muscle tissue taken for TNF- α and IL-10 and GABA levels were measured by ELISA method. Tissue imaging was performed with S100- β , NEUN and Sinaptophysin by immunofluorescence staining. One-way ANOVA and Tukey test was used for statistical analysis. In our results, we observed in LPS group inflammatory parameters were significantly increased in brain and muscle compared to the control and caused S-100 β involvement increased and synaptophysin involvement decreased in immunofluorescence staining resulting in tissue level damage. In electrophysiological recordings, activity consistent with acute non-focal seizures was observed in the LPS group, while it was consistent with resting status in others. We thinks that Bicuculline Methiodide that is a GABA_A antagonist, may be a prophylactic agent in the sepsis which caused to impaired neurotransmitter balance, increased pro-inflammatory cytokine and lipid peroxidation, decreased anti-inflammatory cytokine levels.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis yoğun bakım ünitelerinde sık karşılaşılan ve ölüm nedeni yüksek olan semptomlarından biridir. Ciddi sepsis ve septik şok, enfekte edici organizmalar ile konak cevabının çeşitli unsurları arasındaki karmaşık etkileşimlerin bir sonucu olarak gelişmektedir. Konak organizma tarafından mikrobiyal bir patojenik tehdite karşı birincil cevabı yansıtmaktadır. Sepsisin klinik belirtileri, enfeksiyonun başlangıç bölgesine, enfeksiyon kaynağına, akut organ fonksiyon bozukluğuna, hastanın altta yatan sağlık durumuna ve tedaviye başlamadan geçen süreye bağlı olarak değişiklik gösterir.

Sepsis sırasında, etkilenen Merkezi Sinir Sistemi (MSS) klinik olarak septik ensefalopati veya sepsisle ilişkili deliryum şeklinde kendini gösterir. Septik hastaların % 8-70'inde, septik ensefalopatinin, daha çok tanı ölçütlerine atfedilen geniş varyasyon ile gerçekleştiği bildirilmiştir. Ancak mekanizması tam olarak açıklanmamıştır ve standart bir tedavi planı oluşturulamamıştır.

Yapılan çalışmalarda septik ensefalopatisi olan hastalarda ve deney hayvanlarında MSS'nin temel inhibitör nörotransmitteri olan gamma aminobütirik asit (GABA) seviyelerinin artmış olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle sepsisin neden olduğu MSS hasarının, nörotransmitter düzeylerinin bozulması, nöronal inhibisyon artışı ve immün yanıtta azalma ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bicuculline, GABA nörotransmitterinin ve asetilkolinesteraz'ın iyi bilinen bir antagonistidir. Kimyasal olarak 4 farklı formu bilinen Bicuculline'in iyonotropik GABA_A reseptörlerine bağlanarak GABA'nın blokajını gerçekleştirdiği bildirilmiş ve GABA blokajı yapmış olmasına rağmen konvülzan etkisi olmayan Bicuculline methiodide en çok kullanılan formu olmuştur.

Çalışmamızda deneysel olarak gram negatif bakterilerin hücre duvarından elde edilen lipopolisakkarid (LPS) ile sepsis oluşturduğumuz sıçanlarda beyin ve kas dokusunda iyonotropik GABA_A reseptör blokajının etkilerini moleküler, morfolojik ve elektrofizyolojik düzeyde incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEPSİS

2.1.1. Tarihçe

Modern dönemde kullanımına daha çok yoğun bakım ünitelerinde rastlanılan “sepsis” kelimesi tıbbi anlamda kavram olarak oldukça eski bir tarihe sahiptir. Yunanca “bakterilerin varlığında hayvansal veya bitkisel organik maddelerin çürümesi” olarak tanımlanan “sepsis” ilk olarak Homeros’un İlyada’sında [σηπω]- “sepo” olarak kullanılmış daha sonra ise Hippocrates’in, *Corpus Hippocratum*’unda [σηπεδ’ων]- “sepidon” olarak yer almıştır (M.Ö. 460-370). Aristoteles, Plutarch ve Galen de Hipokrat’la aynı anlamda [σηψις]- “sepsis” kelimesini kullanmışlardır.

"Sepsis" sözcüğü, yaklaşık 2.700 yıl boyunca hemen hemen hiç değişmemiş ve aynı anlamda kullanılarak günümüze kadar ulaşmıştır (1,2).

2.1.2. Tanım

Sepsis hakkında genel ve ortak bir tanım oluşturmak amacıyla 1991, 2001 ve 2016 yılları dahil toplam üç adet konsensus toplanmıştır. Amerikan Göğüs Hastalıkları Uzmanları Derneği (ACCP) ve Yoğun Bakım Derneği (SCCM)’nin yaptığı güncel ortak tanımlama, “konağın enfeksiyona karşı düzensiz yanıtı nedeniyle oluşan, hayatı tehdit eden organ yetmezliği”dir (3).

Klinik olarak sepsisi tanımlayan terminoloji çok çeşitli şekillerde kullanılmakla birlikte genellikle, enfeksiyon anlamındadır. Sepsisi karakterize eden bir dizi klinik parametreyi tanımlamaya yönelik ilk girişim 1989’da, Roger Bone ve arkadaşları tarafından sepsis sendromu terimi önerisi ile bildirilmiştir. Sepsis sendromu tanımından sonra, ACCP ve SCCM 1991’de standartlaştırılmış tanımlar dizisi yaratmak amacıyla ilk konsensus konferansını düzenledi (4).

ACCP-SCCM’ye göre enfeksiyon, mikroorganizmaların veya mikrobik toksinlerin normal-steril dokulara girmesi ile karakterize edilen bir mikrobik fenomen olarak tanımlanmıştır. SIRS olarak da bilinen sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, sepsisin belirgin bir özelliği olarak kabul edilen inflamasyonla uyumlu fizyolojik

özellikleri tanımlamak için klinik ölçütlerin kullanımı kapsayan bir tanım olmuştur.. Böylece SIRS, sepsis de dahil olmak üzere herhangi bir etiyolojinin sistemik bir inflamatuvar yanıtı, sepsis ise doğrulanmış / şüphe edilen bir enfeksiyon varlığında sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmıştır (5).

Organ işlev bozukluğu ile ilişkili sepsisler, ciddi sepsis, yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen sepsis ile indüklenen hipotansiyonun eşlik ettiği ciddi sepsis ise, septik şok olarak adlandırılmıştır. Bu konsensus daha yeni ve ilişkili tanımlarla sınıflandırma yapmış daha sonra Sepsis-1 olarak anılmıştır (4). Sepsis-2 ise 2001'de gerçekleştirilmiş ve SIRS kriterlerinin aşırı hassas ve nonspesifik olduğu düşünülerek ve özellikle ciddi sepsis ve septik şokun daha iyi gösterilmesi için yeni belirteçlerin tümü eklenmiştir. SIRS tabanlı kriterler güncellenmiştir (4,6).

2016 yılındaki konsensus yani Sepsis-3 ise bu kavramı temel bir ilke olarak içermektedir. Bu nedenle, en yeni tanımlar, sepsisin erken fark edilmesi gerektiği ve enfeksiyon karşısında düzenlenmemiş bir konakçı yanıtı olduğu şeklindeki çifte zorunluluğu kavramsallaştırmada geliştirilmiş bir girişimi yansıtmaktadır. Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirme skorlaması (SOFA), son adım olarak konağın yanıtını nicelleştirmek için kullanılmaktadır.

Sepsis sırasında gelişen organ yetmezliği, en önemli klinik belirti olmakla birlikte hastalığın seyri ve ölümlerle doğrudan ilişkilidir. Mekanizması hakkında birçok çalışma olmasına rağmen nasıl geliştiği hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde sepsis nedeniyle gerçekleşen ölümler yüksek orandadır (5).

2.1.3. Etiyoloji

Sepsis etiyolojisine genel olarak antibiyotik öncesi dönem ve antibiyotik dönemi olarak iki farklı açıdan yaklaşılmaktadır. Antibiyotik öncesi dönemde Gram-pozitif bakterilerin sepsis insidansı daha yüksek görülürken, antibiyotik döneminde Gram-negatif bakteriler ve bazı *Candida* türlerinin antibiyotik direncinin katlanarak artması sonucu bu türlerin sepsis insidansı artış göstermiştir (7,8).

1986-1995 tarihleri arasında bakterilerin sebep olduğu enfeksiyon hastalıkları incelendiğinde, kültür sonuçlarından elde edilen veriler sıklıkla; *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas auresinosa* ve *Staphylacoccus aureus* türlerinin baskın olarak bulunduğunu bildirmektedir (9). Bakterilerin neden olduğu enfeksiyon

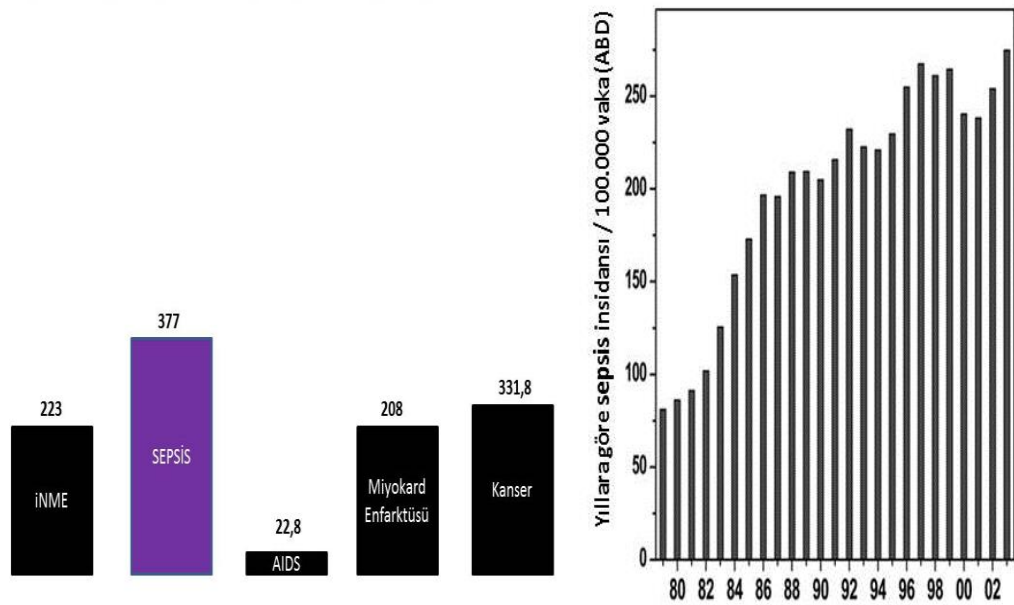
odakları, toplum ve hastane kaynaklı olarak ayrım göstermektedir. Pnömoni, menenjit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kolesistit, piyelonefrit, endokardit, kolanjit toplum kaynaklı en sık görülen sepsislerdir (8,10).

2.1.4. Epidemiyoloji

Sepsis; Dünya’da sık karşılaşılan, ölüm oranı ve maaliyeti yüksek halk sağlığı sorunudur (11,12).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), ciddi sepsisin yıllık insidansını 100.000 kişi başına yaklaşık 50-100 olgu olarak belirtmiştir.

Sepsise bağlı gelişen ölümlerin en önemli belirleyicisi olarak organ yetmezliği gösterilmiştir. Mortalite hızı organın fonksiyonunun derecesi ve kaybına bağlı olarak ilişkilendirilmektedir (15). Yaşlı popülasyonunun, kronik hastalıkların, immünosüpresyon tedavilerin, kemoterapilerin, transplantasyonların, ve invaziv operasyonların artması mortalite insidansındaki artışa neden olmuştur. Olgu/mortalite oranı ise ciddi klinik durumu olan hastalarda destek tedavilerinin ve farkındalığın artması sonucu azalmıştır (16,17).



Şekil 2-1: Her 100.000 vakada sepsis insidansı (ABD), Dünya Sepsis Günü Organizasyonu, 2014

2.1.5. Patogenez

Sepsis, tamamıyla anlaşılmamış, doğrusal bir seyri olmayan, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar yanıtlarının, kompleman ve koagülasyon sistemlerin, metabolik değişikliklerin, hormonal çeşitliğin, mitokondriyal disfonksiyonların (sitopatik hipoksi), epitelyel ve mikrosirküler disfonksiyonların aktivasyonu ve disregülasyonunu da kapsayan, patofizyolojik bir süreçtir (18,19). Bu sistemlerin her biri adaptif olarak karakterize edilebilmesine rağmen, düzensiz aktivasyonları, şiddetli oksidatif hücresel stresle sonlanan ortak yolak sonucu pozitif geri bildirimli organ yaralanmasına neden olur (18).

Sepsisten septik şoka doğru uzanan süreçte, bakteriyel ürünler bir dizi olayı başlatır, şok indüklü hipoperfüzyon, hücresel hipoksi ve konak hücre hasarı tarafından salınan ürünler kaskadı hızlandırır. Ortaya çıkan hücresel işlev bozukluğu ve organ hasarı derecesi, zaman ilerledikçe katlanarak artan ve doğrusal olmayan bir ilişki göstermektedir. Hücre hasarı ve disfonksiyonundaki logaritmik artış, erken antibiyotik tedavisi ve hücresel perfüzyonun restorasyonunun önemini göstermektedir (20).

Bakteriyemide, sepsisin gelişimi için iki olay önemlidir:

- a. Oksidasyona karşı enfeksiyon direnci,
- b. Bakterilerin eritrositlerden erken oksijen salınımını hızlandırmaktadır.

Bu iki olayın sonuçları sepsisin seyrini ve septik şok gelişimini belirlerler. Kan plazması bileşenlerinin oksidasyonu ve eritrositlerdeki oksijen eksikliği dokuların yaralanmasına neden olur (20).

2.1.6. Patofizyoloji

2.1.6.1. Pro ve Anti-inflamatuvar Hücresel Sinyal / Sinyal İletimi

Ligandların spesifik reseptörlerine bağlanması (örn., bakteriyel LPS, sitokinler) hücre dışı ortamdaki değişikliklere cevap olarak bir dizi hücre içi olayı başlatırlar. Bu moleküler etkileşimler, gen ürünlerinin (yani protein üretiminin) yapışmasından tutunma ve kemotaksiye kadar uzanan spesifik hücresel yanıtların uyarılmasını tetiklerler. Çok sayıda hücre içi sinyal yolları, başlangıç olayları olarak, bir hedef proteinin fosforilasyonu ile aktive olurlar. Bu aktivasyon tipik olarak bir enzimin (bir kinaz) hedef proteine bağlanmasıyla gerçekleştirilir ve aşağıdakilere yol açabilir:

- (1) Enzim aktivitesinin aktivasyonu veya değiştirilmesi,
- (2) Hedef proteinin stabilitesinde değişiklikler,
- (3) Proteinin hücre içi lokalizasyonu
- (4) Diğer proteinler ile etkileşimler.

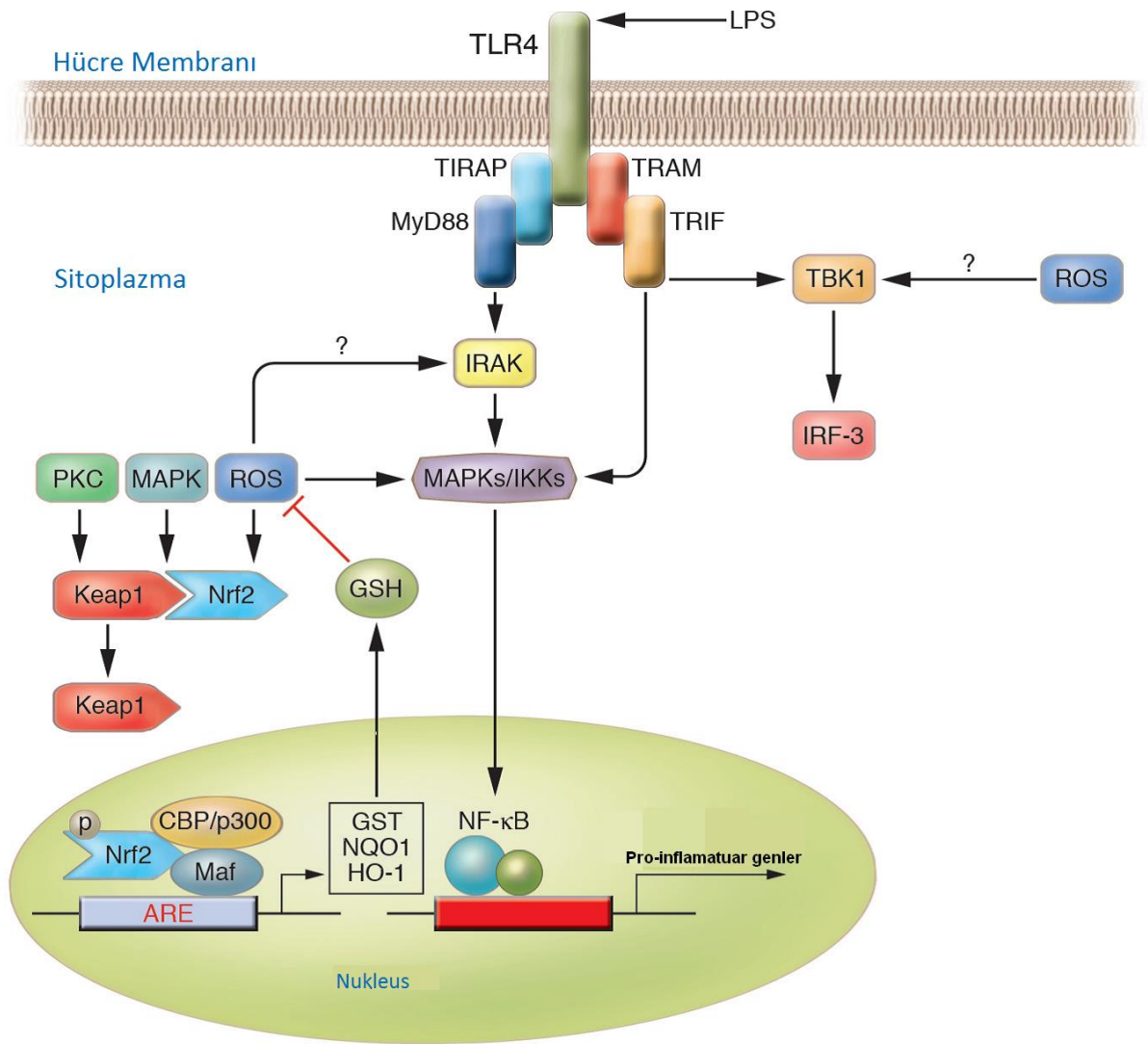
Bir çok sinyal yolağı, enzim aktivasyonunda yer alan kinaz ve substrat (lar) ın kinaz-substrat etkileşiminin protein ürünleri olduğu 2 veya daha fazla kinaz içeren bir dizi sinyalleme kaskadları içerir.

Kinaz kaskadları, ligand-spesifik reseptörlerin (örn. Gram-negatif LPS (Lipopolisakkarid) / TLR -4 (Toll benzeri reseptör-4)) bağlanmasından sonra aktive olur ve ek olarak, hücrel homeostaz bozulmaları (örneğin, oksidasyon durumundaki değişiklikler) kinaz kaskadlarının aktivasyonuna yol açabilir (21).

Kinaz kaskadları arasındaki etkileşimler, belirli bir kaskadın artan aktivitesinin "tersine" kaskadlarda aktivitenin baskılanmasını sağlayacak şekilde meydana gelebilir. Ek olarak, kinaz- kinaz- kinaz etkileşimi, kinazların ilgili hücre-içi bölgelerdeki adaptör proteinleri üzerinde lokalizasyonu ile kolaylaştırılır. Hücrel sinyallemenin yukarıdaki akışının açıklanabilmesi sepsiste konakçı-patojen etkileşiminden sonra ortaya çıkan ilk olayların anlaşılması için gereklidir (22).

Ciddi sepsiste endotoksinin, spesifik ligandlarına (TLRS) bağlanmasından sonra, ve sinyalleme kaskadlarının aktivasyonunu takiben esas olarak transkripsiyon faktörleri ile nükleer ve sitoplazmik düzenleyici proteinler olmak üzere hücre içi proteinlerin anahtar aktivitesinin modifikasyonu vardır (21).

TLR'ler için, sinyalleme esas olarak 4 adaptör proteine bağlıdır: miyeloid farklılaşma birincil tepki proteini 88 (MyD88); ve 3 adet MyD88 proteini: (1) toll / interleukin 1 (IL-1) reseptör homologisi (TIR) domeni içeren adaptör protein (TIRAP); (2) TIR domeni içeren adaptör protein-indükleyici interferon- β (TRIF); ve (3) TRIF ile ilgili adaptör molekülü (TRAM). MyD88 bağımlı ve MyD88 bağımsız sinyal iletim yolları prototipik transkripsiyon faktörünün, nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aktivasyonu ile sonuçlanır. Ek olarak, çeşitli anahtar hücrel işlevler ve hücrel sinyallemenin (kaspazlar, fosfoinositid 3-kinaz [PI3K] ve Rho GTPazlar) yönlerini düzenleyen önemli enzim sistemleri aktive edilir (21,22) (Şekil 2.2).



Şekil 2-2: İnflamatuvar Sinyal Yolağı (Jay, 2006)²²⁾

(LPS: Lipopolisakkarid, TLRs: Toll- like reseptör, MyD 88: myeloid birincil yanıt gen 88, IRAK: Kinaz-1 ile ilişkili IL-1 reseptörü, ROS: Reaktif Oksijen Türleri NF-κB: Nuklear Faktör- Kappa B)

2.1.6.2. Nükleer Faktör Kappa-β,

Nükleer Faktör Kappa-B (NF-κB), ciddi sepsis ve septik şokla ilişkili birçok inflamatuvar yanıtın ekspresyonunun modüle edilmesinde yer alan prototipik transkripsiyon faktörüdür. Pro protein ailesinin (P50, P105, P52, P100, P65 [Rel A], C-Rel) üyelerinden oluşan homo veya heterojen dimerler olarak bulunur ve inflamasyonda önemli rol oynar ve NF-κB'nin çeşitli kombinasyonları, transkripsiyon aktivitesi

derecelerinde farklılık gösterir (NF- κ B1-P50 1 P105, NF- κ B2-P52 1 P100, Rel A [P65]). Hücresel aktivasyonun yokluğunda NF- κ B, I κ B ailesinin inhibitörleri ile etkileşerek latent formda sitoplazmada bulunur (I κ B-a, I κ B-b, I κ B-g, I κ B-3, Bcl-3, p100, p105). MyD88-bağımlı ve MyD88-bağımsız kinaz yolları, bakteriyel ürünler (LPS, peptidoglikanlar), sitokinler (Tümör nekroz faktör- α [TNF- α], IL-8, IL-1 β), reaktif oksijen türleri ve iskemi gibi hücresel ortamda değişiklikler çeşitli uyarılarla TLR ligasyonunu takiben NF- κ B'yi aktive eder. Uyarılardan bağımsız olarak, aktivasyon, I κ B moleküllerinin fosforilasyonu ve ardından 26S proteozomu tarafından bozunması ile gerçekleşir. Bu adım NF- κ B'nin nükleer translokasyonu, spesifik gen promoter bölgelerine bağlanması ve gen transkripsiyonu ile sonuçlanır. NF- κ B, baskın olarak pro-inflamatuvar gen ürünlerinin birkaçının indüksiyonunda rol oynar.

Septik hastalarda NF- κ B aktivasyonunun derecesi, septik şokta hasta sağkalımı ile ilişkili görünmektedir. Aşırı NF- κ B aktivasyonunun patofizyolojik sonuçlarına ek olarak, yetersiz stimülasyon da septik şokta artmış morbiditeye yol açabilir (23).

Çalışmalar, kusurlu NF- κ B sinyalleşmesinin, sepsiste immün baskılanmaya yol açtığını ve immün efektör hücrelerde istenmeyen sonuçları olan apoptozu desteklediğini göstermektedir. Bu nedenle, özellikle hastalığın seyrinde erken dönemde aşırı aktivasyon ya da sepsiste aşırı negatif regülasyon, konak doku hasarı ya da immünoparaliz ve bunun sonucunda doğrudan doku hasarı ile birlikte aşırı inflamasyona neden olabileceği düşünülmüştür (24).

2.1.6.3. Pro-ve Anti-İnflamatuvar Mediyatörlerin Salınması

Ciddi sepsis ve septik şokta hücresel sinyallerin sonuçları, daha fazla immün efektör hücrenin aktive edilmesi ve bunların enfeksiyon yerine yerleştirilmesi için artan miktarda mediyatörün sistemik dolaşımında sentezlenmesi ve serbest bırakılmasıdır. Bu oldukça güçlü moleküller normal olarak dolaşımında düşük konsantrasyonlarda bulunurlar, fakat yüksek konsantrasyonlarda veya uzun süreli maruz kalma ile potansiyel olarak zararlı biyolojik etkiler yaratabilirler (23). Sepsisin seyrinde erken dönemde inflamatuvar mediyatörlerin aşırı ekspresyonu, septik şokun gelişiminde önemli bir rol oynar. Böylece mediyatör salınımı sitokin kaskadı olarak adlandırılmıştır (24). Sepsiste, erken klinik olaylardan sorumlu sitokinler, yüksek pro-inflamatuvar özellik gösteren TNF- α ve IL-1 β ile sepsiste sitokin salınım paternlerine ışık tutmuştur.

Pro-inflamatuvar sitokin salınımını takiben karşı inflamatuvar mediyatörlerin salınımı da gözlenmiştir. Ek olarak, septik şok gelişiminde spesifik sitokinlerin kaynağı, yapısı ve etkileri daha net anlaşılmıştır. Seçilen yeni sitokin molekülleri ve iyi bilinen mediyatörlerin rolü ile ilgili yeni fikirler aşağıda ele alınmıştır (21).

2.1.6.4. Yüksek mobilite grup 1 proteini

Yüksek mobilite grubu 1 proteini (HMGB1), nükleer bağlayıcı bir protein olarak 3 yıl önce keşfedilen nükleer ve sitoplazmik bir proteindir ve elektroforez jelleri üzerindeki hızlı hareketliliği nedeniyle bu ismi almıştır. HMGB1, ökaryotlarda en yaygın bulunan proteinler arasındadır ve nükleozom oluşumunu stabilize ederek gen transkripsiyonunu kolaylaştırmada önemli bir rol oynar.

Daha yeni bulgular HMGB1'in aktif inDNA rekombinasyonu, onarımı, replikasyonu ve gen transkripsiyonunun, N terminusun (HMG kutuları) pozitif yüklü domenlerinin tekrarları ile kolaylaştırıldığını göstermektedir. HMGB1, mikrobik patojenlerin aktivasyonu üzerine nekrotik (ancak apoptotik olmayan) hücreler ve makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler tarafından pasif olarak salınır. HMGB1'in bilinen biyolojik etkileri, hücre kültürlerinden elde edilen verilere dayanmaktadır. HMGB1, makrofajlar / monositler ve endotelial hücrelerde TNF ve IL-8 dahil olmak üzere pro-inflamatuvar sitokinlerin salınmasını uyarır.

HMGB1 ayrıca insanda gelişmiş glikasyon son ürünleri (RAGE) ve adhezyon molekülleri (vasküler hücre adezyon molekülü-1 [VCAM-1], hücreler arası adezyon molekülü-1 [ICAM-1]) için hücrel reseptörün ekspresyonuna bağlanabilir ve endotel hücrelerini indükleyebilir. RAGE'nin indüklenmiş ekspresyonu transkripsiyon faktörü NF-KB ve MAPK'lerin aktivasyonunu kolaylaştırır. Bu gözlemler, HMGB1'in bağırsak bariyeri fonksiyonu üzerinde önemli olumsuz etkileri olduğu ve koagülasyon sisteminin düzenleyicisi pro-inflamatuvar bir sitokin olarak rol oynadığını düşündürmektedir (21).

2.1.6.5. Bağışıklık ve Nonimmün Efektör Hücre Disfonksiyonu

Sitokin salınmasına yanıt olan normal immün efektör yanıt ciddi sepsiste kaybolur. Disfonksiyonlar, nötrofillere ve makrofajlara antijen sunan hücrelere kadar (dendritik hücreler) her hücre tipini içerebilir. Hücrel disfonksiyon, hücrel aktivite

de artış veya hücreyel yanıtta azalma ile ilişkili sitokin homeostazındaki dengesizliğe benzer bir yapıdadır (21).

2.1.6.6. Ciddi sepsiste nötrofil disfonksiyonu

Nötrofiller, doğuştan gelen bağışıklık sistemindeki anahtar hücrelerdir. Adhezyon, kemotaksi, fagositoz ve sitotoksik moleküllerin salımını içeren koordineli bir dizi ile patojenleri tanıyarak ve yok ederek hareket ederler. Sistemik dolaşımda yaklaşık 7 saat geçirmesi ile nötrofillerle apoptotik hücre ölümü izlenebilir.

Ciddi sepsiste nötrofil fonksiyonunun regülasyonu kaybolur, bu da aşırı nötrofil aktivasyonuna yol açar. Böylece aktive edilmiş nötrofiller endotelial disfonksiyonu indükler, sitotoksik molekülleri serbest bırakır ve inflamatuvar konakçı organ hasarına yol açar (21).

2.1.6.7. Hızlandırılmış lenfositik apoptoz

T-yardımcı lenfositler, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin antijen-sunan hücreleri tarafından aktivasyonunun ardından adaptif immün tepkisi de anahtar rol oynar. Aktivasyonun ardından, ilk lenfosit cevabı pro-inflamatuvarıdır. Ciddi sepsiste yaygın immün olmayan hücreyel disfonksiyon görülür (25).

2.1.6.8. Ciddi sepsiste Diğer Biyolojik Sistemlerle Etkileşimler

2.1.6.9. Ciddi sepsiste pıhtılaşma kaskadı

Doğal antikoagülan sistemler vasküler hasarın yokluğunda pıhtı oluşumunu önler ve vasküler yaralanma sonrası oluşan pıhtıların lizisini gerçekleştirir. Hemostatik sürecin prokoagülan ve antikoagülan kolları arasındaki denge ciddi sepsiste bozulur. Ağır enfeksiyona verilen inflamatuvar yanıt, koagülasyon sisteminin sistemik işlev bozukluğu ile sonuçlanır. Septik şokta koagülasyon disfonksiyonunu oluşturan olaylar antifibrinolitik sistemlerin baskılanması sonucu oluşan düzensiz yanıt ile başlar (26-28). İnflamatuvar yanıtta salınan sitokinler, ciddi sepsis ve septik şokta tetiklenebilen koagülasyona aracılık ederler. Sepsiste, koagülasyon ve inflamatuvar sistemler arasındaki etkileşimin iki yönlü olduğu anlaşılmaktadır. Pıhtılaşma proteazlarının

(trombin veya TF) veya antikoagülan proteinlerin (aktive protein C [APC]) spesifik mononükleer hücreler veya endotelial hücrelerin reseptörlerine bağlanması, sitokin üretimini veya inflamatuvar hücre apoptozunu etkileyebilir. Endotelial hücreler, aktive olmuş lökositler tarafından eksprese edilen ve salınan sitokinlere cevap verir. Endotelial hücreler, adezyon moleküllerini ve inflamatuvar yanıtı destekleyen büyüme faktörlerini ve pıhtılaşmayı da etkileyebilir. Endotelial hücreler, sepsiste koagülopati ile ilişkili 3 ana patojenik yolda belirgin rol oynamaktadır: Doku faktörü aracılı trombin oluşumu, disfonksiyonel antikoagülan yollar ve fibrinoliz inhibisyonu.

APC, pıhtılaşma faktörlerin Va ve VIIIa'yı etkisiz hale getirmek için kofaktör protein S ile birlikte hareket ederek protrombinaz kompleksi tarafından sürdürülen trombin oluşumunu önler.

APC ayrıca, sitokin üretimini inhibe ederek, nötrofil aktivasyonunu ve lökosit adezyonunu önleyerek inflamasyonu inhibe edebilir. Sepsiste koagülasyon kaskadındaki diğer mediyatörler arasında ise antitrombin ve doku faktörü yolu inhibitörü bulunur.

İnflamatuvar ve koagülasyon kaskadları arasındaki bu karşılıklı çapraz ilişki, kesintisiz bir şekilde, doku hasarı, organ disfonksiyonu ve hücre ölümüyle sonuçlanan bir kısır döngüyü temsil eder (21,26-28).

2.1.6.10. İmmunoinflamatuvar yanıtın nöral regülasyonu: Vagal inflamatuvar refleks ve sempatik sistemin konak yanıtına etkileri

Pro-inflamatuvar mediyatörlerin aşırı salınımından kaynaklanan doku hasarını önlemek için hareket eden humoral mekanizmalara ek olarak yapılan araştırmalar, inflamasyonun nöral modülasyonunda rol oynadığını göstermektedir (29).

Hayvan sepsis modellerinde yapılan çalışmalarda, bu modellerde vagal uyarımı takiben TNF ekspresyonunun önemli ölçüde inhibe olduğu gösterilmiştir (30,31) ve bu hayvanlara genetik manipülasyon veya vagotomi yoluyla vagal stimülasyona bağıklık kazandırıldığında ise, artmış pro inflamatuvar sitokin cevabı gelişmiştir (32).

Çalışmalarda vagal uyarılma sonucu salınan asetilkolinin (ACh), makrofajlar ve diğer bağıklık efektör hücreleri tarafından eksprese edilen ACh reseptörleri ile etkileşimi girdiği bildirilmiştir (33,34).

Sitokinleri baskılayan kolinerjik reseptörlerin en iyi bilineni, nikotinik asetilkolin reseptörünün $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) alt birimidir. Sempatik nöronlar ve adrenal

medulladan salınan nörotransmitterler katekolaminlerdir. Ayrıca bağışıklık efektör hücreleri de ciddi sepsiste bir katekolamin kaynağıdır. Septik şok daha sık endojen katekolamin depolarının tükenmesi ve muhtemelen katekolamin direnci ile karakterizedir (28, 35).

2.1.7. Endotoksin

Endotoksinler, öldürücü şoka neden olabilen gram-negatif bakterilerin dış zarının yaklaşık % 75'ini oluşturan glikolipid yapıda lipopolisakkarid (LPS) makromolekülleridir (36). LPS'nin yapısını genellikle hidrofobik lipid A bölgesi, oligosakkarit çekirdek ve en dıştaki O-antijen polisakkaridi oluşturmaktadır (37). Lipid A, LPS'nin mikrobiyal membrana bağlanmasını sağlayan hidrofobik di-glukozamin tabanlı bir lipiddir. *E. coli*'nin yüzeyinde yaklaşık 106 birimlik lipid A molekülü barındırdığı bilinmektedir. Lipid A çeşitliliğe sahip bir moleküldür. Çeşitlilik kısmen yağ asidi yan zincirlerinin sayısından ve terminal fosfat rezidü varlığından kaynaklanır (38).

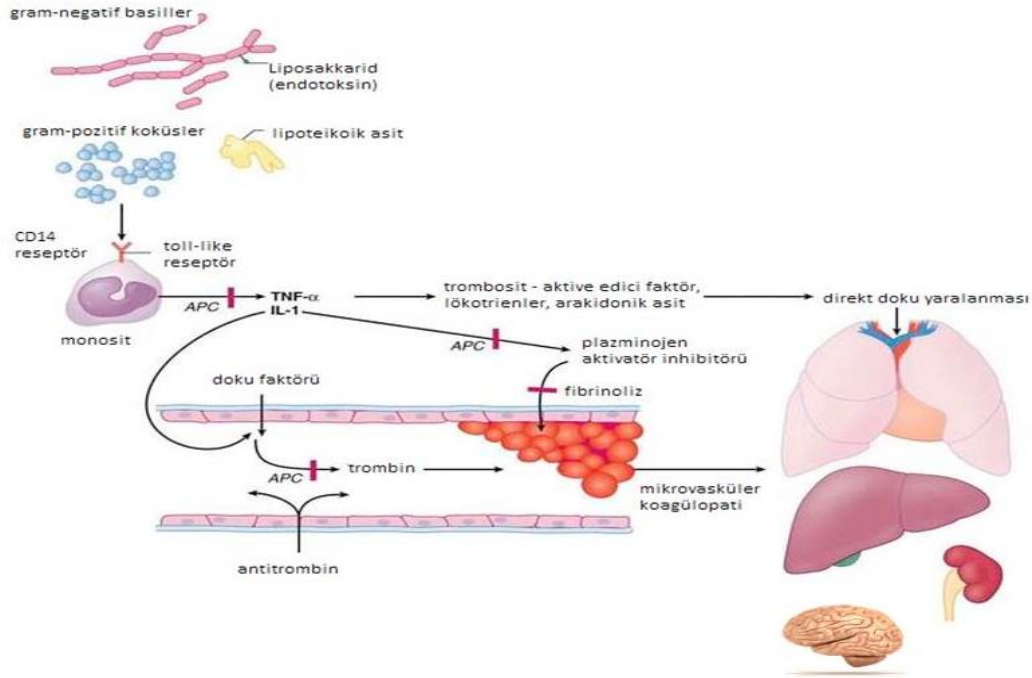
Lipid A, doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından tanınan LPS'nin tek bölgesidir ve pikomolar konsantrasyonları TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinler üretmek ve bir makrofajı tetiklemek için yeterlidir (39). Doğal bir bağışıklık tepkisini tetiklemek için, tek başına LPS'nin lipid A kısmı yeterli olmakla birlikte, enfeksiyon esnasında adaptif bağışıklık tepkisi genellikle O-antijene yönlendirilir. LPS tanıma için anahtar kalıp tanıma reseptörü Toll benzeri reseptör 4'dür (TLR4). Dolaşımdaki LPS, serumdaki LPS bağlayıcı protein (LBP) ile çözünür hale getirilir. Endotoksin daha sonra, CD14 olarak adlandırılan lökositler üzerine ekstrinsik bir glikosilfosfatidilinositol ile bağlı membran proteinine aktarılır. CD14 ayrıca çözünür formda mevcut olabilir. CD14, LPS'yi MD2'ye aktarır, bu daha sonra TLR4-MD2 reseptör kompleksini oluşturmak için TLR4'e bağlanır ve LPS tanımayı tetikler. Çözünür MD2, TLR4'le kovalent olmayan bir şekilde bağlıdır, ancak TLR4'ün yokluğunda bile doğrudan LPS'ye bağlanmaktadır. LPS-MD2-TLR4 kompleksi oluştuktan sonra, kompleksin tamamı Toll-interleukin-1 reseptör (TIR) alanları ile etkileşim yoluyla sitoplazmik adaptör moleküllerini dimerize eder (40,41). LPS'nin tanınması üzerine TLR4 aktive edildiğinde, ya bir MyD88 (miyeloid farklılaşma primer yanıt geni 88) bağımlı ya da MyD88'den bağımsız bir yol izler. MyD88'e bağlı yol, pro-

inflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açan NF- κ B ve mitojen ile aktive olan protein kinaz genlerinin aktivasyonunu uyarırken, MyD88 bağımsız yolağı da (TRIF yolu-Toll-interleukin-1 reseptör alanını içeren, adaptör- interferon β üretecek), Tip-1 interferon-indüklenabilir genlerini ve bunu takiben NF- κ B üretimini aktive eder. LPS'nin Lipid A bileşeni doku faktörü ve pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu uyararak endotelial hücre hasarına neden olup, apoptozu başlatır. Dolaşımdaki enfeksiyonda lipid A varlığı endotoksin şokuna neden olabilir. Sıçanlardaki TLR4'te, 82 amino asit uzunluğunda hiper değişken bölge, lipid A'nın tanınmasından sorumludur (42). Asil zincirlerin yapısı uzunluğu ve sayısı, insan TLR4 sinyallemede kritik öneme sahiptir. CAMP'ler, ökaryotlar tarafından üretilen bir grup peptiddir. Patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin önemli bir bileşenidir. Katyonik özelliklerinden dolayı, CAMP'ler, anyonik hücre duvarı ve fosfolipid zar içine girerek bakteri yüzeyini bozarak patojeni öldürürler. Araştırmalar, lipid A'nın modifiye edilmesi için çok düşük bir CAMP konsantrasyonunun yeterli olduğunu bildirmektedir. Lipid A'nın modifikasyonları, *S. Typhimurium* da dahil olmak üzere birkaç gram negatif bakteri içinde PhoP-PhoQ olarak adlandırılan çevresel sensör kinaz regülatörü olan iki bileşenli bir sistemdir. Bu iki bileşenli sistem *S. Typhimurium*'un CAMP'lere karşı direncini artırır ve ayrıca patojenin insan ve fare makrofajları içinde hayatta kalmasını sağlar (43) (Şekil 2.2).

LPS inflamatuvar hücrelerin, IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-1, IL-12 ve IFN γ gibi bir dizi pro-inflamatuvar sitokinlerin eksprese etmesine neden olur; ancak TNF- α , endotoksik şok sırasında kritik öneme sahip olduğu bildirilmektedir (44). TNF- α inflamasyon sırasında doku hasarına neden olur. Bazı klinik araştırmalarda ve sepsisin hayvan modellerinde, anti-TNF antikorlarının, septik şokun tedavisinde yardımcı olduğu gösterilmiştir. TNF reseptörün yokluğu endotoksin yanıtını azaltır (45).

LPS ile indüklenen şok sırasında TNF- α ; IL-10 ve IL-4, gibi anti-inflamatuvar sitokinleri indüklemenin yanı sıra pro-inflamatuvar sitokinlerin, IL-1, IL-6 ve IL-8'in ekspresyonunu tetiklemektedir (Şekil 2.3). Sitokin indüksiyonunun yanı sıra, TNF- α da nitrik oksit (NO) ve prostaglandin E2 (PGE2) üretimini katalize eden nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz (COX-2) 'ı tetikler. Hem NO hem de PGE2 vazodilatatörlerdir endotel-lökosit bağlanmasını inhibe ederek nötrofillerin enfeksiyon bölgesine göçündeki azalmaya neden olur (46,47). LPS, TNF- α ile kombinasyon halinde, bağırsak, akciğerler ve timus da dahil olmak üzere çeşitli dokularda endotel tabakasının

apoptozunu indükler (Şekil 2.3). Endotoksin şokunu iyileştirmek için çeşitli stratejiler hem prelinik hem de klinik araştırmalarda test edilmiştir. LPS'nin septik şokun patofizyolojisinde önemli bir faktör olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (48).



Şekil 2-3: Endotoksinin dokular üzerine etki mekanizması

(TNF: Tümör Nekroz Faktör- α , IL-10: İnterlökin- 10, APC: Adenomatöz Poliposis Koli)

2.1.8. Septik Ensefalopati

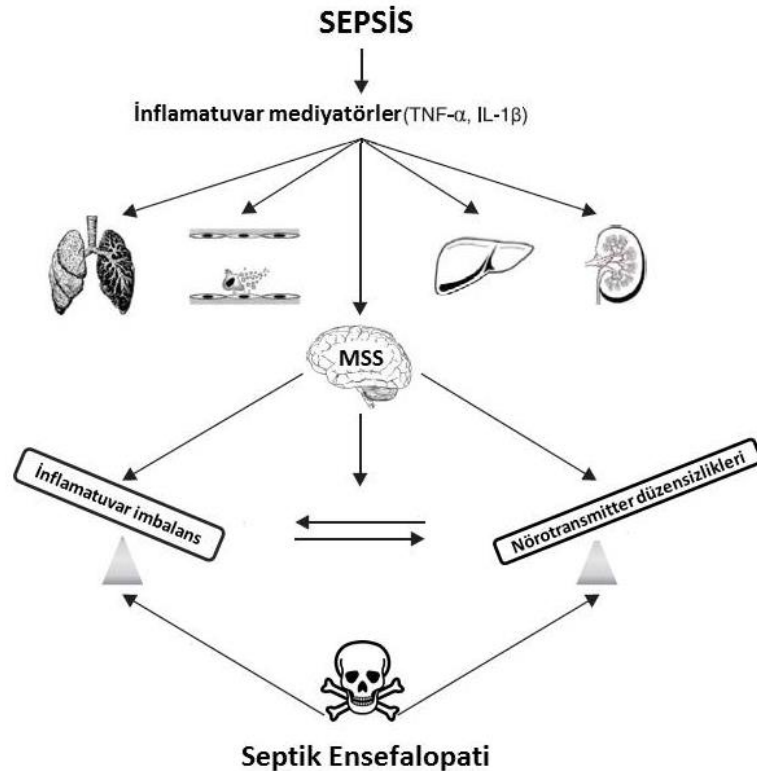
Sepsisin ensefalopatisi, çoklu organ yetmezliği ya da hipotansiyon ve diğer sistemik fenomenlerin eşlik ettiği “geç ensefalopati” öncesinde ortaya çıkan “erken veya septik ensefalopati” olarak sınıflandırılabilir. Erken veya septik ensefalopati, hepatik veya böbrek fonksiyon bozukluğu, hipotansiyon veya hipoksi ile açıklanamayan bir kavram olarak göreceli olarak yenidir (49).

Septik ensefalopati beyindeki inflamatuvar mediatörlerin etkisinden veya beyindeki aracılıları tarafından bu mediatörlere sitotoksik yanıttan kaynaklanır.

Sepsis ve türevleri, sepsis sendromu, septik şok ve akut respiratuar distres sendromu (ARDS), yoğun bakım ünitelerinde ölümlerin % 10- % 50'sini oluşturan mortalitenin önde gelen nedenlerindendir (50). Septik ensefalopatinin septik hastaların % 8 - % 70'

inde görüldüğü ve yoğun bakım ünitelerinde hastalar arasında sık görülen ensefalopati şekli olduğu bildirilmiştir (49,51). Septik ensefalopatinin bildirilen insidansındaki büyük varyasyonun sebebinin kullanılan sepsis ve ensefalopati tanımlarından kaynaklanmış olabileceği bildirilmektedir (49,52,53). Bunun nedeni ise birçok kritik hasta, sedasyon, mekanik ventilasyon veya nöromüsküler kavşak blokajı gibi nöral disfonksiyon belirtilerini maskeleyen etkiler altında olduğundan septik ensefalopati tanısı alamamasıdır.

Septik hastalarda böbrek veya karaciğer yetmezliği, ARDS, elektrolit bozuklukları, asit-baz değişiklikleri, hipo/hiperglisemi, hipotansiyon, hipoksemi, hipo/hipertermi veya endokrin anormallikler de olabilir. Bunlarla ilişkili koşullar, sepsisin beyin üzerindeki etkilerinin izole olarak incelenmesini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, ensefalopatinin başlangıcı sıklıkla bu anormalliklerin önündedir, bu da septik ensefalopatiye bu anormalliklerin neden olmadığını düşündürmektedir (53) (Şekil 2.4).



Şekil 2-4: Sepsis ve Septik Ensefalopati İlişkisi (Dal-Pizzol ve ark., 2014)⁵⁴

2.1.8.1. Klinik Belirtiler

Septik ensefalopati tanısı, ekstrakraniyal enfeksiyon ve bozulmuş mental durum kanıtı gerektirir. % 50'nin üzerinde bir oranda hastalarda kan kültürü pozitif bulunmuştur. Beyin lezyonlarının aksine, ensefalopatide nörolojik bulgular simetriktrir. Karaciğer, böbrek veya endokrin bezlerinde yetmezlikle sonuçlanan ensefalopatide bulunan asteriks, tremor ve multifokal miyoklonus, sepsiste nadir görülür. Hipoksemi, hipotansiyon, periferik organ yetmezliği ve eksojen ilaçlar saf dışı bırakılmalıdır. Lomber ponksiyon, bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans; menenjit, ensefalit, beyin apsesi ve subdural ampiyem gibi farklılıkları önemli şekilde ayırt edebilmeyi sağlar. Elektroensefalografi septik ensefalopatiyi belirlemede önemlidir ve klinik değerlendirmenin zor olduğu yoğun bakım ünitelerinde önemli bulgudur.

Elektroensefalografik anormalliğin derecesi veya daha şiddetli olgularda Glasgow Koma Skalası skoru ile derecelendirilebilen ensefalopatinin şiddeti mortalite ile ilişkilidir (52,55).

2.1.8.2. Patogenez

Septik ensefalopatinin patofizyolojisine birçok faktör neden olabilir. Septik ensefalopatinin yaygın serebral mikroabselerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (56). Gram-negatif bakteriyemi, Grampozitif bakteriyemi, fungemi veya herhangi saptanmış bir organizma bulunmayan hastalarda septik hastalarla benzer oranlarda septik ensefalopati geliştiği rapor edilmiştir (49). Bu bulgular, ensefalopatinin pankreatit gibi enfeksiyöz olmayan durumlarda ortaya çıkması ile birlikte (57), enfekte edici organizmaların ve / veya toksinlerinin doğrudan ensefalopatiye neden olmadığını düşündürmektedir. Enfeksiyon veya diğer nedenlerden kaynaklanan sistemik inflamasyon, septik ensefalopatinin sebebi olarak ortaya çıkmaktadır. Sepsiste lökositler tarafından salınan inflamatuvar mediatörlerin endotelial hücreler ve astrositler üzerinde derin etkileri vardır. Bu hücrelerin hasarlanması, bozulmuş nöronal fonksiyona neden olur (58). İnflamasyon başlangıçta lokal bir süreç olmakla birlikte, ciddi enfeksiyonlarda, yağun doku hasarında ve büyük miktarda nekrotik doku varlığında, karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp üzerinde olumsuz etkilere neden olan sistemik bir inflamatuvar mediatör salınımı sağlar. Akciğerler, karaciğer ve dalak düşük performans gösterir ve lizozomal enzimler ve oksijensiz serbest radikalleri serbest bırakan aktive lökositler biriktirir. Retiküloendotelial sistemin organlarının aksine, beyin lökosit

birikimine dirençlidir (59). Yapılan çalışmalarda trombosit aktive edici faktör, interlökin-8, interlökin-1 ve tümör nekroz faktör- α 'nın intraserebral enjeksiyonunun farelerde beyin parankimi içine lökosit infiltrasyonuna neden olmadığını göstermiştir (60). Bunun birkaç nedeni vardır. İlk olarak, merkezi sinir sistemi potansiyel antijenleri ayıran lenfatik bir sistemden yoksundur. İkincisi, merkezi sinir sistemi, kan-beyin bariyeri tarafından inflamatuvar hücre infiltrasyonundan korunmaktadır. Serebrovasküler endotelial hücre pinositozu sepsiste artmasına rağmen, immünolojik olarak ilgili moleküllerin geçmesine izin vermekle birlikte, hücreler arası sıkı bağlantılar morfolojik olarak bozulmadan kalır ve bu nedenle muhtemelen inflamatuvar hücrelere bir engel teşkil eder (61). Üçüncüsü, merkezi sinir sisteminin hücreleri, bağışıklık tepkilerinin indüksiyonunda ve düzenlenmesinde temel bir rol oynayan majör doku uyuşmazlığı kompleks antijenlerinin çok düşük seviyelerini ifade eder. Son olarak, serebrovasküler endotel, periferel vasküler endotele kıyasla VCAM-1 ve ICAM-1 gibi çok düşük seviyelerde lökosit adhezyon molekülleri içerir. Sepsis sırasında beyinde lökosit birikimi olmamasına rağmen, inflamatuvar mediatörler kan beyin bariyerini geçerek beyin üzerinde olumsuz etkilere neden olurlar (56,61).

İntraserebral interlökin-1 veya interlökin-2' nin deney hayvanlarına enjekte edilmesi, septik ensefalopatinin elektroensefalografik değişikliklerini ve sporadik etkilerini taklit ettiği ve hipotalamus üzerindeki etkisiyle ısı artışına neden olduğu bildirilmiştir. Tavşanlarda TNF- α 'nın subaraknoid enjeksiyonu serebral oksijen alımını ve serebral kan akışını azaltır ve intrakraniyal basıncı ve beyin omurilik sıvısı laktatını artırır. TNF- α , endotelin üretimini artırır ve düz kas hücreleri tarafından nitrik oksit oluşumunu inhibe eder (59,50).

Dolaşımdaki aktive lökositler, eritrosit hücre membranları ile reaksiyona giren ve endotoksin uygulanan normal insan eritrositlerinin deformabilitesini azaltan oksijensiz radikaller oluşturur. Serebral mikrodamarlardaki eritrositlerin fekal peritonitli domuzlarda genişlediği ve yuvarlaklaştığı görülmektedir. Bu anormal şekilli eritrositler mikrodamarlar boyunca sıkışıp hareket edememekte, bu da sepsiste meydana gelen serebral hipoperfüzyonu şiddetlendirebilmektedir (49,56,60,61).

2.1.8.3. Serebral Endotelial Hücreler

Normal serebral mikrodamar endoteli, diğer birçok dokulardan farklı olarak, hücreler arası sıkı bağlantılara sahiptir ve birkaç pinositotik vezikül içerir. Septik ensefalopatinin kan-beyin bariyerinin yıkılması ile ilişkili olduğu görülmektedir. Septik ensefalopatisi olan hastalarda beyin omurilik sıvısında yüksek protein seviyelerine rastlanmıştır ayrıca kolloidal demir oksit, ^{14}C -amino asitler ve ^{125}I -albümünün septik kemirgenlerde dolaşımdan beyin parankimasına geçtiği bildirilmiştir (62).

Normalde dolaşımdaki katekolaminlerin düşük dozlarının serebral kan damarları üzerinde hiçbir etkisi yoktur, çünkü bunlar kan beyin bariyeri tarafından merkezi sinir sisteminden serbestlerler. Dolaşımdaki katekolaminlerin yüksek konsantrasyonları, arteriyel kan basıncında bir artış ve dolayısıyla vasküler duvarların distansiyonundan kaynaklanan serebral kan damarlarının genişlemesine neden olabilir. Kan-beyin bariyerinin bozulması, sepsiste meydana gelen yüksek düzeydeki endojen katekolaminlerin ve yoğun bakım ünitelerinde uygulanan çeşitli vazopresörlerin serebral vasküler direncini doğrudan etkilemesine neden olur. Norepinefrin gibi α_1 -adrenoseptör aktivitesi olan ajanların, kan-beyin bariyerini geçtikleri ve sepsiste serebral vazokonstriksiyona neden oldukları bildirilmiştir (63). Buna karşılık, kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin etkilenmediği hemorajik şok sırasında, norepinefrin serebral vaskülatür üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir (64).

Köpeklerde, domuzlarda ve insanlarda, endotoksik şokun, serebral kan akımında azalmaya neden olduğu ve ortalama arteriyel basınca etkili olmadığı gösterilmiştir, bu da serebral ödemin olabileceğini düşündürmektedir. Sepsiste kafa içi basınç artar, bu ortalama arter basıncının yükselmesinden sonra serebral kan akımındaki artışa karşındır. Bu hipotez ayrıca, domuzlarda endotokseminin arteriyel hipotansiyona rağmen intrakranial hipertansiyona neden olduğu gerçeği ile desteklenmektedir (61).

Sepsis sırasında bozulmuş serebral oksijen kullanımının bir başka nedeni mitokondriyal fonksiyonun inhibisyonu olabilir. Sıçan karaciğerinden, düz kastan ve pulmoner epitelyumdan, endotoksemi ve pro-inflamatuvar sitokinlerin, muhtemelen nitrik oksit aracılı mekanizmalarla mitokondriyal disfonksiyona yol açtığına dair kanıtlar vardır (65).

2.1.8.4. Astrositler

Astrositler merkezi sinir sisteminde önemli destekleyici ve homeostatik hücrelerdir. Yaralanmaları birkaç mekanizma ile nöronal hasarı şiddetlendirebilir. İlk olarak, yüksek nöronal aktiviteye sahip bölgelerde, nöronlardan hücre dışı alana bir potasyum akışı vardır. Potasyum astrositler tarafından alınır ve endotel hücrelerine aktarılır. Daha sonra yerel kan damarlarını genişletmek için vasküler lümene salınır (65).

Astrosit sonu ayaklarının yaralanması, bu bağlanma sürecini bozabilir ve bu nedenle sinaptik aktiviteyi azaltabilir. Üçüncüsü, astrositler serebral endotelyumdaki kan-beyin bariyeri özelliklerini indüklemeye önemlidir ve hasarları sepsiste kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırabilir (66). Astrositler inflamatuvar mediatör reseptörlere sahiptirler. İnsan astrosit kültürlerinde, rekombinant insane interferon- γ , interlökin-1 β ve toksik olan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indükler (67). Kemirgen hücre kültürleri ile yapılan çalışmaların sonuçları astrositlerin nöronların savunmasızlığını, hipoksik, eksitotoksik ve serbest radikal aracılı yaralanmaları etkilediğini göstermektedir (56). Bu nedenle, sepsiste nöronal hasarın modüle edilmesinde astrositlerin rolü ile ilgili açıklayıcı çalışmalar yeterli değildir.

2.1.8.5. Nöronlar

Septik ensefalopati, bilinci ve dikkati kontrol eden retiküler aktivasyon sisteminin rahatsızlıkları ile ilişkilidir. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda çekal ligasyon ve ponksiyonun, raphe çekirdekleri tarafından glukoz kullanımını ve beyindeki serotonin döngüsünü arttığı gösterilmiştir. Aynı hayvan modelinde sepsiste, lokus seruleus tarafından glikoz kullanımı ve tüm beyin norepinefrin içeriğinin azaldığı bulunmuştur (68,69).

Hepatik ve üremik ensefalopatide artmış serotoninergic ve azalmış noradrenergik nörotransmisyon da bildirilmiştir. Bununla birlikte, nörotransmisyondaki bu değişikliklerin ensefalopati veya epifenomen nedenleri olup olmadığı belirsizdir. Değiştirilmiş seviyelerde tirozin, triptofan ve fenilalanin, sepsiste bulunan nörotransmisyondaki değişiklikleri açıklayabilir, ancak bu tür değişiklikler sepsiste cereyan eden karaciğer ve böbrek yetmezliğine sekonder olabileceğinden, veriler dikkatle yorumlanmalıdır. Bu aromatik amino asitlerin plazma ve beyin

konsantrasyonları septik hastalarda ve çekal ligasyon ve ponksiyondan sonra sıçanlarda artmasının nedeni, kas yıkımı sonucu dolaşımda bırakılmasıdır (70).

Başlangıçtaki enerji gereksinimleri için sepsiste serebral kan akımı yeterli olsa bile nöronlar, yüksek sinaptik aktivite sırasında fonksiyonel olarak sınırlanabilir. Bozulmuş serebral kan akımı karmaşık bilginin işlenmesini engelleyebilir ve böylece sepsiste meydana gelen nöronal aktivitede azalma olmadığı sürece serebral kan akışında azalmaya neden olan septik ensefalopatinin semptomlarına katkıda bulunabilir. Septik hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, serebral kan akımının baskılanmış olmasına rağmen, PaCO₂ değişikliklere karşı serebrovasküler yanıtının bozulmadığı gösterilmiştir (65).

Endojen benzodiazepin ligandları ile gamma- amino bütirik asit (GABA) aracılı nörotransmisyonun artması, bozulmuş motor fonksiyonuna ve hepatik ensefalopatide bilinç azalmasına katkıda bulunabilir (71). Septik ensefalopatide GABA'nın rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Glutamat, beyindeki sinapsların % 75'inde nörotransmitter olarak kabul edilir (72). Hasarlı nöronlar tarafından salınan glutamat ve astrosit glutamat taşıyıcının tersine taşınması, hepatik ensefalopati de dahil olmak üzere birçok bozuklukta nöronal hasara (eksitotoksiste) neden olur. Ancak septik ensefalopatide rolü değerlendirilmemiştir (73,74).

Ensefalopati sıklıkla sepsisin ilk belirtisidir (64) ve ensefalopatisi olan septik hastalarda ensefalopatisi olmayanlara göre daha yüksek mortaliteye sahiptir (65,68,69). Bu bulgular septik hastalarda ensefalopatinin ölüm sebebi olabileceğini düşündürmektedir.

Sepsiste, beyin hasarı en az diğer organlardaki hasar kadar sıklıkla ortaya çıkar. Lökositlerin ürettiği serbest radikaller eritrositlere zarar verir ve böylece beyine oksijen verilmesini sınırlar. Lökositler tarafından salınan inflamatuvar mediatörler, beyin tarafından mitokondriyal fonksiyonu ve oksijen ekstraksiyonunu bozar. Bu mediyatörler kan-beyin bariyerini de açarlar, bu da peri mikrodamar ödemine ve astrosit son ayaklarının bozulmasına neden olur. Sonuç olarak, bu değişiklikler geniş nöronal yaralanmaya neden olur ve bu nedenle, sepsisten kurtulan hastaların uzun süreli nöropsikiyatrik / nörolojik bozukluklara sahip olma risklerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (61).

2.1.9. Septik Miyopati

Sepsiste gözlemlenen kas zayıflığına bağlı semptomlar ve zayıflık sendromları, hastalardaki mortalite ve uzun süreli morbiditenin ana nedenidir, ancak bu sendromların gerçek oluşum oranı ve prevalansı bilinmemektedir (75,76). Sendromların klasik tanıları büyük ölçüde elektrofizyolojik testlere dayanmaktadır ve birincil bir nöropatik süreç veya birincil miyopatik sürecin varlığıyla tanımlanmıştır (77). Yapılan yeni bir çalışmada ARDS iyileşme sonrası hastanın kas biyopsileri incelenmiş ve tüm kas biyopsilerinin bozulduğu bulgular vardır (78).

2.2. SİTOKİNLER

Sepsiste, sitokinlerin neden olduğu doku ve organ hasarı yeni sitokinlerin salınmasını tetikler. Bu sitokin fırtınası veya sitokin kaskadı, enfeksiyonla ilişkili çeşitli belirtilerden sorumludur. Sonuçta, bu sitokinlerin değeri belli bir eşiği geçtiğinde ciddi bir klinik sendrom ya da sepsis gözlemlenebilir. Sitokinler, mortalite ve morbidite üzerinde dramatik bir etkiye sahiptir.

Sitokinler, hücrelerin haberleşmesi amacıyla geniş çapta üretilen küçük proteinlerdir (<40 kDa). ve birkaç farklı kategori altında incelenir: interlökinler, interferonlar, kemokin, büyüme faktörleri ve tümör nekroz faktörü.

En önemli sitokin grubu, enfeksiyöz süreçler sırasında salgılanan İnterlökinlerdir. Lökositler ve endotelial hücreler tarafından serbest bırakılırlar ve hücre sinyalizasyonuna, immün hücrelerin aktivasyonuna, proliferasyonuna ve ölümüne katkıda bulunurlar (79).

Sitokinlerin etkileri, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak başlar. Ardından, hücre içi kaskadların aktivasyonuna neden olan reseptör aktivasyonu, sonunda biyolojik bir etkiye yol açar. Sitokinlerin çoğu antijenlere yanıt olarak salgılanır ve sitokinlerin gen ekspresyonu, proteinlerin hızlı transkripsiyonu ve translasyonu ile kuvvetli bir şekilde düzenlenir (80). Sitokinler sepsis patogeneğinde önemli bir rol oynar ve pro-inflamatuvar sitokin ağı (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-17 dahil) tarafından düzenlenirler. Bu düzenlenmenin ardından IL-1 reseptör antagonisti dahil olmak üzere anti-inflamatuvar sitokinler ((IL1ra, IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β) salınır (81). Pro-inflamatuvar sitokinlerin yardımı, hücresel stresörler sırasında veya antijenlerin tespitinden sonra bağışıklık sistemini düzenler. Anti-inflamatuvar sitokinler antijenler

elimine edildikten sonra homeostaziye geri dönmek için bağışıklık yanıtını modüle ederler (80).

Uzun bir süredir iki sepsis fazı isimlendirilmiştir: birinci faz, sitokin fırtınasının ortaya çıktığı pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterize edilen sistemik inflamatuvar yanıt sendromu olarak adlandırılmıştır.

Daha sonra SIRS fazı, immünolojik dengeyi sağlayan anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimi ile kompensatuvar anti-inflamatuvar yanıt sendromu (CARS) denen ikincil bir fazı takip eder.

Pro-inflamatuvar ve immünsüpresif sitokinlerin sekresyonu, sepsisin başlangıcından hemen sonra başlarlar. Sonuç olarak, bu iki karşıt yanıtın net etkisi genellikle hiperinflamatuvar faza ve ikincil immünosüpresif faza yol açar (82).

2.2.1. Pro-inflamatuvar sitokinler

Pro-inflamatuvar sitokinler, inflamasyonu, travmayı ve enfeksiyona karşı bağışıklık cevabını düzenlemede temeldir. TNF- α ve IL-1 hedef hücrelere bağlanır daha fazla inflamatuvar mediatörlerin üretimini aktive eder bu nedenle inflamasyon cevabında önemli bir rol oynar. Pro-inflamatuvar sitokin üretimi, sepsis ile sonuçlanan bir dizi patojen-duyarlı hücrelerin uyarılması ile eş zamanlı oluşur (83).

Konakta endotoksin gibi bir uyarı sonucu TNF- α ve IL-1 β gibi erken veya proksimal sitokinlerin üretimine yol açan sitokin kaskadı başlatılır. Endotoksine ek olarak proksimal sitokinler de, IL-6 ve IL-8 dahil olmak üzere distal sitokinlerin üretimini aktive eder. TNF- α ve IL-1 β gibi erken salınan sitokinler, sepsisin neden olduğu patofizyolojik mekanizmanın çoğuna aracılık etmektedir (78,83). Spesifik olarak IL-1 β , amplifikasyon kaskadı uyarır ve IL-6, IL-8 gibi çeşitli inflamatuvar genlerin sentezini indükler (78). Sepsis sırasında proksimal sitokinler uyarılara maruz kaldıktan sonra 30-90 dakikalık bir süre içinde salınır. Bu sitokinler makrofajdan türetilir ve dikkate değer bir dizi biyolojik etkiyi tetikler. Ek olarak, lipid medyatörleri, geç-distal sitokinler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve hücre adezyon molekülleri aktivasyonundan sorumludurlar. Çok sayıda çalışma IL-1 β ve TNF- α 'nın sepsisin şiddetinin belirleyicileri olduğunu göstermiştir (78,82,83). Bununla birlikte, septik hastalarda mortaliteyi önlemek için anti-TNF- α ve anti-IL-1 β kullanımı, hastalığın geç evresinde sitokinleri bloke edebildiği için çok yararlıdır (84). TNF- α , esas olarak hedef hücreler üzerinde

pleiotrofik etkileri olan mononükleer fagositler tarafından salınan 17-kDa'luk proteinden oluşan pro-inflamatuvar sitokindir. TNF- α birçok enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan inflamatuvar hastalıkta rol oynar (83). Sitokin IL-1 ile sinerjistik olarak, ana inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu uyarmak için spesifik reseptörler yoluyla sinyal yollarını işaretleyerek inflamasyonda birincil fonksiyona sahiptir (79). TNF- α , doğuştan gelen bağışıklık yanıtında rol oynar, makrofajlar ve lenfositlerin farklılaşmasına yardımcı olur. TNF- α ve diğer sitokinler arasındaki etkileşim, pro-inflamatuvar efektör moleküllerin üretiminde rol oynar. Bu nedenle, TNF- α , inflamatuvar cevabı koordine etme ve sitokin kaskadını aktive etmede önemli bir role sahiptir (82).

İnsanlar üzerine yapılan çalışmalarda rekombinant TNF- α 'nın lökopeni ile birlikte SIRS, ateş, hemodinamik parametrelerde anormallikler, koagülopati ve karaciğer enzimlerinde yüksekliği sebep olabileceği gösterilmiştir (83). TNF- α , ciddi sepsiste görülen organ disfonksiyonuna neden olabilir. Bakteriyel endotoksin ile indüklenen deneysel insan ve hayvan sepsis modellerinin çoğu, infüzyondan 60-90 dakika sonra plazma içinde TNF- α 'nın hızla aktive olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sepsiste TNF- α konsantrasyonu sepsis şiddeti ile koreledir ve TNF- α yükselmesi kötü prognozudur (83).

İnterlökin 1 (IL-1), polimorfonükleer, mononükleer ve diğer hücre tipleri ile sentezlenir ve birkaç dokuya etki eder. IL-1, aynı IL-1 reseptörlerini aktive eden ve dolayısıyla aynı biyolojik aktivitelere sahip IL-1 α ve IL-1 β proteinleri ismiyle adlandırılır. Çalışmalar endotoksin infüzyonundan sonra insanlarda IL-1'in arttığını göstermiştir. TNF- α 'ya benzer şekilde, IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α dahil olmak üzere diğer sitokinlerin salınmasını uyarır (83).

IL-1 β , dört saatlik endotoksin enjeksiyonundan sonra zirveye ulaşır ve yirmi iki saat boyunca hastalar için yüksek kalır ve daha sonra hayatta kalanlarda normale döner. Sonuç olarak, sepsisli hastalarda plazmalarında IL-1 β artmıştır ve IL-1 konsantrasyonu ile sepsisin şiddeti arasında bir korelasyon vardır, ancak mortaliteyle bir ilişki görülememiştir (83).

Geç pro-inflamatuvar sitokinlerden olan IL-6 ve IL-8, erken pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β doruk noktasına ulaştıktan sonra, onlarda pik yaparlar. Daha ayrıntılı olarak, IL-6, esas olarak doku makrofajları, endotoksin ve TNF- α gibi erken sitokinlere yanıt olarak lenfositler, fibroblast ve endotelial hücreler dahil olmak

üzere birçok hücre tipi tarafından salınan 21-kDa glikoproteindir (84). Aslında, IL-6, akut faz protein indüksiyonu, B- ve T-lenfositlerin stimülasyonu, hematopoezis modülasyonu ve pirojen işlevi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (83). Ayrıca IL-6, hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar sitokin olarak sınıflandırılır ve bakteriyel sepsis ile bağlantılıdır (79).

Yapılan çalışmalarda, sağlıklı gönüllü kişilerde endotoksin enjeksiyonu ile aktivasyon sonrası, plazma IL-6 seviyelerinin 4 saatte pik yaptığı bildirilmiştir (83). Sepsiste, plazma IL-6'nın profilinin doğrudan TNF- α ve IL-1 β üretimi ile ilişkili olabileceği görülmektedir ve sepsiste IL-6'nın kesin rolü belirsizliğini korumaktadır (85). İnsanlarla yapılan çeşitli çalışmalarda, sepsiste IL-6'nın konsantrasyonu, sitokin kaskadı başlangıcında iyi bir gösterge gibi görünmektedir ve konakçı inflamatuvar yanıt ile sepsis şiddetinin ilişkisini yansıtabilir (83).

IL-8, endotoksin ve erken sitokinler dahil olmak üzere uyaranların çoğuna karşı endotelial, fagositik ve mononükleer hücrelerin yanıtı olarak bir çok hücre tarafından üretilen proteindir. IL-8'in birincil fonksiyonu kemoatraktan olarak kimyasal sinyaller yolu ile nötrofilleri iltihap alanlarına çekmesidir (82). Ayrıca, ARDS olan hastalarda bronkoalveolar lavaj sıvısında IL-8 olduğu ve çoklu organ disfonksiyon sendromlarında da rol oynadığı bildirilmiştir (83).

İnsan sepsisinde, IL-6 ile aynı IL-8 üretimi, TNF- α ile aktive edilir. Bununla birlikte, birçok çalışma, sepsisli hastalarda IL-8 seviyesinin yükseldiğini ve bu yükselmenin mortalite oranı ile korele olduğunu bildirilmiştir (86). Sepsiste IL-8'in ana rolünün, nötrofilleri aktive edip doku yaralanmasına neden olabilecek enfeksiyon bölgesine yönlendirmek olduğunu göstermektedir (86).

Sepsis sırasında, makrofajlar, dendritik hücreler ve lenfoblastoid hücreler IL-12 üretimi yaparlar. Bu sitokinin ana işlevi doğal öldürücü (NK) hücrelerini aktive etmek ve zayıf T hücrelerinin tip 1 yardımcı T hücrelerine (TH1) farklılaşmasını indüklemektir. Sonuç olarak, bu hücrelerden yüksek miktarda INF γ salgınır (87).

2.2.2. Anti-inflamatuvar sitokinler

En çok çalışılan anti-inflamatuvar sitokinler interlökinler, IL-1RA, IL-4 ve IL-10'dur. Bununla birlikte, anti-inflamatuvar sitokinler, kompansatuvar bir anti-

inflamatuvar yanıt sendromu yaratarak, nedensel ajanlara karşı tepkileri yavaşlatırlar (85).

IL-1RA bağışıklık hücreleri veya epitel hücreleri tarafından serbest bırakılır ve IL-1R'ye bağlanma kabiliyeti nedeniyle IL-1 α veya IL-1 β inflamatuvar sinyallerin etkisini bloke edebilir. IL-4, baskın olarak TH2 tarafından serbest bırakılır ve hem T ve B hücrelerinin çoğalmasını hem de T hücrelerinin TH2 ye dönüşmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca, IL-4, çözünebilir ve hücrel pro-inflamatuvar aktivitelerin çok güçlü bir down regülasyonuna katkıda bulunur. IL-4'ün sepsiste rolü açık değildir. Bununla birlikte, birçok çalışma sepsis patofizyolojisinde göstermektedir (88,89).

IL-10 merkezi anti-inflamatuvar sitokindir ve dendritik hücreler, makrofajlar, B-lenfositler, T-düzenleyici hücreler (TREGS) ve doğal öldürücü T hücreleri (NKT hücreleri) dahil olmak üzere birçok bağışıklık hücresi tarafından üretilir. Bu nedenle IL-10, sepsisin erken evrelerinde pro-inflamatuvar sitokin üretimini modüle etmeye yardımcı olur, böylece hedefler tekrarlayan pro-inflamatuvar uyaranlara daha toleranslı olur ve pro-inflamatuvar etkileri sınırlar. Son çalışmalar, IL-10'un sepsis hastaların plazmasında anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir (83). Bunun yanında çalışmaların çoğunda, sepsiste IL-10'un ana rolünün hastanın bağışıklık durumunu desteklediğini göstermektedir. Bu nedenle IL-10'un araştırmalara dahil edilmesi, sepsis patogeneğinde önemlidir (79). Septik şok nedeniyle gerçekleşen ölümlerde IL-10 salınımı yapılmadığı gözlemlenmiştir. IL-10 salınımının çeşitli endotoksik şok ve sepsis modellerinde mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (84).

2.3. SİNAPTİK İLETİ PROTEİNLERİ

Memelilerde ve mayalarda sinaptik veziküllerin endositoz- ekzositozunda ve iletiminde ortalama 60 kadar çeşitli sinaptik proteinin yer aldığı bilinmektedir. Bir çoğunun moleküler tanımlaması ve rolü henüz tam olarak yapılamamış olsa da önemli rolleri olan ve sinaptik marker olarak kullanılan belli proteinler aşağıda verilmiştir (90,91):

2.3.1. SNARE Proteinleri

SNARE= "SNAP (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein) REseptörü" proteinlerinin görevi ekzositoz sırasında veziküllerin membrana

füzyonuna aracılık etmektir. Fonksiyonu en iyi bilinen SNARE'ler sinaptik veziküllerin presinaptik membrana bağlanmasını sağlayanlardır. Bu nedenle SNARE proteinleri botulismus ve tetanus toksini gibi bakteriyel toksinlerin hedefidir (92,93).

1. SNAP-25
2. Sintaksin-I
3. Snaptobrevin/VAMP (R-SNARE)

Bu 3 protein membran füzyonunu oluşturan temel bileşenlerdir.

➤ Presinaptik uçtaki veziküler proteinler:

- *Sinaptotagmin: Kalsiyum sensörü olarak görev alır. Kalsiyumun bağlandığı proteindir.
- *Sinaptobrevin (VAMP-2): Depolarizasyon ve Ca^{++} girişi sırasında sintaksin ve SNAP25'e bağlanır.

➤ Presinaptik Membranda sinaptik proteinler:

- *Sintaksin: Vezikülün membran boyunca iletiminde rol alır.
- *SNAP- 25: Vezikülün membrana bağlanmasında rol alır.
- *Sinapsin: Vezikülün membrana bağlanmasında rol alır.

Vezikül ekzositozundan sonra füzyon deliğinin kapanmasında:

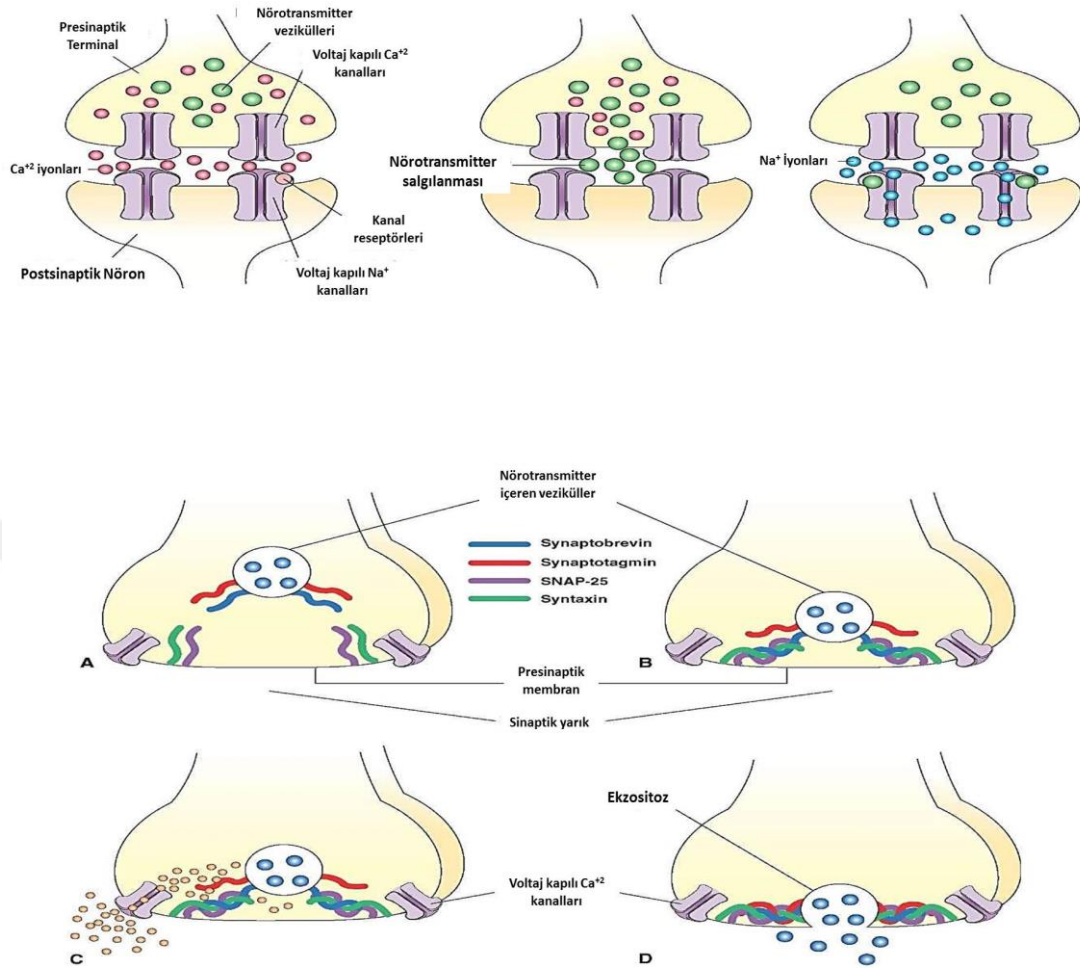
- *Kompleksin

Vezikülün taşınmasında rol alan proteinler;

- *Sinaptofizin
- *Sinaptogrin
- *RAB-3 a, b

Vezikülün geri alınmasında (Endositozda) görevli olan proteinler:

- Klatrin: Veziküler membranın boşluklarını kapatır.
- Dinein: Kaplanmış veziküler membranı sıkıştırır.
- Sinapsin: Kaplanmış veziküler membranı presinaptik terminalin sitoplazmasına taşır. Veziküle bağlanır ve vezikülü hücre iskeletindeki aktin filamanlarına bağlar (90-92).



Şekil 2-5: Sinapsın yapısı, nörotransmitter salınımı ve sinaptik proteinler

(Kaynak: <http://what-when-how.com/neuroscience/neurotransmitters-the-neuron-part>)

2.3.2. Sinaptofizin

Sinaptofizin (sip I), sinaptik veziküllere lokalize integral membran glikoproteinidir. Vezikülün presinaptik membranla birleştiği zaman oluşan kompleksin bir parçasını oluşturduğu bilinmektedir. Sinaptik terminaller için spesifik ve hassas bir işaretleyicidir. Sinaptik iletide veziküllerin taşınmasında majör rolü olan proteindir. Sinaptofizin konsantrasyonlarının Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda belirli beyin bölgelerinde azaldığı bildirilmiştir (93). Nöroendokrin tümörler için de geniş spektrumlu önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Güçlü sensivitesi olmasına rağmen, spesifikliği azdır (94).

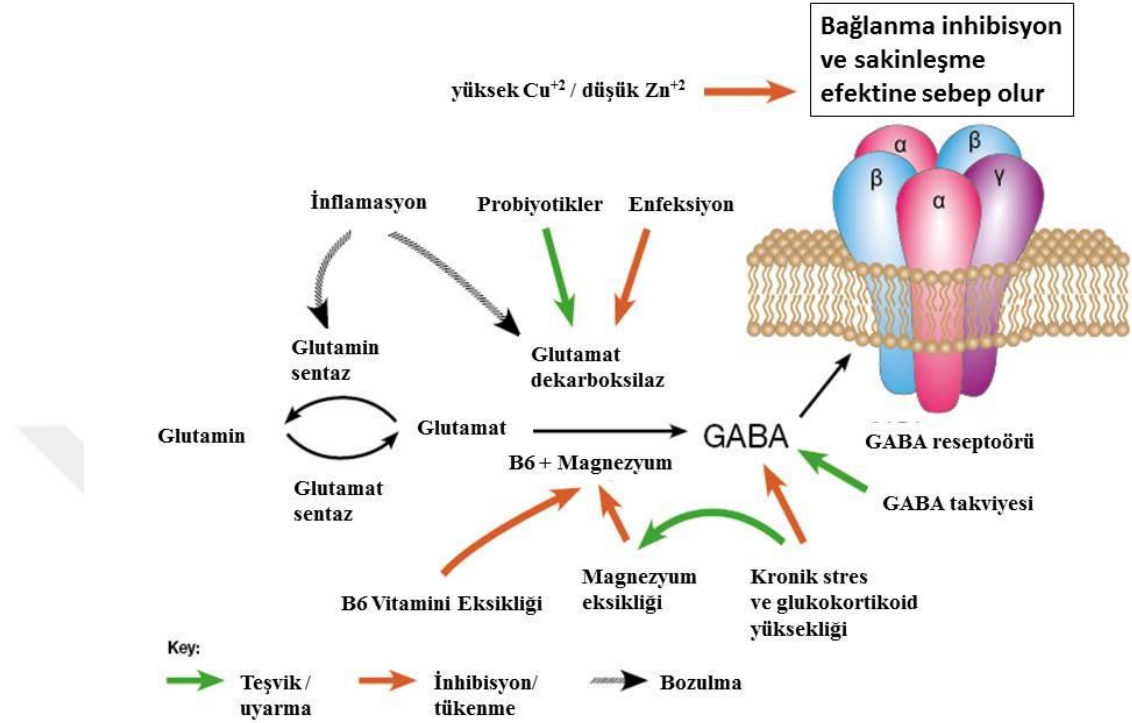
Sinaptofizin dört transmembran bölgesi içeren bol miktarda sinaptik vezikül membran proteini oluşturur. Sip I, en az dört sip I alt birimini içeren vezikül membranında yüksek moleküler ağırlıklı bir kompleks ve son zamanlarda synaptobrevin/VAMP olarak tanımlanmış düşük moleküler ağırlığı olan bir protein oluşturur. Sip I, sitoplazmik C-terminusunda hem serin / treonin hem de tirozin kinazlar tarafından fosforile edilir. Sinir terminalinde, fosfotirozin taşıyan başlıca proteinlerden birini temsil eder. Sip I'e ek olarak, sinaptik veziküller sinaptoporin veya sinaptofizin II (syp II) olarak adlandırılan oldukça homolog bir membran protein içerirler. Sip I ve sip II beyinde farklı dağılımlar gösterir: Sip I hemen hemen tüm sinapslarda bulunur ve bulunur, oysa sip II sadece seçilmiş nöronlarda yüksek seviyelerde ifade edilir, bu da sip II'nin daha özel bir işleve sahip olduğunu gösterir. Hipokampüste, yosunsu lif terminallerinde yüksek düzeyde sip II, daha düşük miktarlarda diğer sinapslar bulunur. Her ne kadar sip II sip I'e benzer bir heteromultimerik alt birim yapı sergilerse de, iki sinaptofizin farklı komplekslerde bulunur ve heteromultimer oluşturmaz (95).

Literatürde sinaptofizinin kalsiyum için voltaj duyarlı bir kanal özelliği gösterdiği de bildirilmiştir (96).

2.4. GAMMA AMİNO BÜTİRİK ASİT (GABA)

Beyin ve retinada presinaptik inhibitor olarak en iyi bilinen nörotansmitter olan GABA 1883 yılında bulunmuştur. Tüm sinapsların % 30-40'ında oluşur. GABA; glutamatin, glutamik asit dekarboksilaz (GAD) ile alfa-dekarboksilasyonundan oluşur ve GABA-transaminaz (GABA-T) ve süksinik semialdehid dehidrojenazın (SSADH) ardışık etkileri ile süksinat haline metabolize edilir. GAD aktivitesinin, GABA'nın stabil-durum konsantrasyonunun, aktif (holo-GAD) ve inaktif formların (apo-GAD) piridoksal-5'-fosfat-bağımlı ara formlarına dönüşümüyle in vivo düzenlenmesinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır. GAD hücre gövdesinde sentezlenir ve aksonal transport ile nöronun terminaline ulaşır. Akson terminallerinde glutamatin α - karboksil grubunu çıkarır ve sonuçta GABA'yı oluşturur. GAD'ın formlarından apo-GAD beyinde bulunan toplam GAD'ın en az % 50'sini oluşturur. GAD aktivasyonu inorganik fosfat tarafından uyarılır ve ATP tarafından inhibe edilir. GABA ve aspartat ATP, apo-GAD oluşumunu sağlar ve stabilize eder ATP olmaksızın, apo-GAD, 37° C' de birkaç

dakikalık bir yarı ömre sahiptir. Apo-GAD Pridoksal fosfat ile iki aşamada holo-GAD'a aktive olur (92,97).



Şekil 2-6: GABA üretimi ve ilişkileri (Is Your Brain Making Enough GABA? – Dr. Jocker)

2.4.1. GABA Reseptörleri:

GABA etkisini 3 reseptör üzerinde gösterir.

- GABA_A Reseptörü
- GABA_B Reseptörü
- GABA_C Reseptörü

GABA_A ve GABA_B reseptörleri MSS'de yaygın olarak bulunurken GABA_C reseptörlerinin hemen hemen tamamı erişkin omurgalılarda retinada yer almaktadır. GABA_A ve GABA_C reseptörleri iyonotropik reseptörlerdir ve integral anyon kanalları ile ilişkilidir. GABA_B reseptörleri ise metabotropiktir ve G proteinleri üzerinden etkisini gösterir (92,97).

2.4.1.1. GABA_A Reseptörü:

GABA_A reseptörleri, aynı zamanda nikotik asetilkolin reseptörlerini ve glisin reseptörlerini de içeren “Cys loop ligand-kapılı iyon kanalı” süperfamilyasının üyesidir. GABA_A karmaşık yapıda olup 6 α , 3 β , 3 γ , 1 δ , 1 ϵ , 1 θ , 1 π alt birimlerinden oluşmaktadır. İki adet HABA bağlanma bölgesi bulunur. GABA_A reseptör kanallarının amino ucunda büyük bir ekstraselüler domaine sahiptirler. Ligand bağlama bölgesi burada yer almaktadır. Ekstraselüler kısmını 4 hidrofobik transmembran bölgesi izler (M1, M2, M3, ve M4). İkinci transmembran parçasının (M2) kanal boşluğunu oluşturan kısım olduğu düşünülmektedir. Reseptör kanalında nötral veya pozitif yüklü bazik rezidüler bulunmakta ve anyonlara afinite göstermektedirler. Bu kanalların ekstrasellüler kısmı GABA bağlanmasının gerçekleştiği kısımdır. GABA, benzodiazepinler, barbitüratlar ve alkol GABA_A reseptörünün farklı yerlerine bağlanırlar ve Cl⁻ kanalını açarlar; böylece hücre içine Cl⁻ geçişini artırarak inhibitör sinaptik iletiyi oluşturur. Benzodiazepin ve barbitüratın etkisi GABA reseptörüne bağlandığında bu etki daha güçlü olur. Deoksikortikosteron ve steroid yapıda bir hormon olan progesteron anestezik ve yüksek dozlarda uyku getirici özelliklerini GABA_A reseptörleri üzerinden gösterirler (92,97).

Bazı epileptojen maddeler MSS’de GABA’nın etkinliğini azaltırlar. Örneğin: B6 vitamin eksikliği oluşturan maddeler (INH) ve spesifik GABA antagonistleri (Bicuculline türevleri, α -aminovalerik asit) GABA sentezini inhibe ederek epileptojen etki oluşturabilmektedir. Deney hayvanlarında da epileptik aktivite oluşturmak için pentetrazol kullanılmaktadır. Bilinen en iyi antagonisti Bicuculline’dir (92,97,98).

2.4.1.2. GABA_B Reseptörü:

GABA_B reseptörleri GABA_A antagonisti bicuculline ve bazı GABA_A’ya özgü agonistlere karşı duyarsızlığı ile tanımlanmıştır. GABA analogu (-) baklofen (β - (4-kloro-fenil) - γ -aminobütirik asit) güçlü ve seçici bir GABA_B agonisti olarak bulunmuştur (93).

GABA_B reseptörleri dolaylı olarak K⁺ kanallarına bağlanır. Aktive edildiğinde, bu reseptörler Ca⁺² iletkenliğini azaltabilir ve G proteinlerinin aracılık ettiği hücre içi mekanizmalar yoluyla cAMP üretimini inhibe edebilir. GABA_B reseptörleri, postsinaptik ve presinaptik inhibisyona aracılık edebilir. Presinaptik inhibisyon, sinir

terminalleri üzerindeki GABA_B reseptörleri üzerinden, Ca⁺² 'nın girişinde azalmaya neden olur ve nörotransmitterlerin salınmasını durdurur. GABA_B reseptörünün klonlanması ve metabotropik glutamat reseptörlerine yapısal benzerliği, reseptör alt tiplerinin farmakolojik yapılanmasında yeni ilaçların geliştirilmesini sağlar. Bu yanıtların bazıları olmasa da hepsi GABA_A reseptörleri olan ρ alt-birimi yapısal analogu ile açıklanabilir (92,97,98).

2.4.1.3. GABA_C Reseptörü:

GABA'ya hem Bicuculline hem de baklofene karşı duyarsız olan farmakolojik cevaplar GABA_C reseptörleri olarak adlandırılmıştır (92,97,98). GABA_A reseptörlerinden daha basit yapıda olup üç r biriminin değişik bileşimlerde yaptığı pentamerlerdir. Retinal bipolar hücrelerde bulunurlar. Cl⁻ kanallarıyla etkisini gösterir. Bikukulin ile bloklanmaz, pikrotoksin ile bloke olur, cisaminokrotonik asid (CACA) ile aktive olur

Vücut sıvılarında γ -aminobütirat olarak bulunur. Beynin her bölgesinde bulunan nöronlar, GABA'yı nörotransmisyonu regüle etmek için kullanabilir. Nöronal sinapsta artan GABA, nöronun aksiyon potansiyelinin oluşturmasını engeller, uyarılmasını zorlaştırır. Bir tek nöron binlerce nöronla sinaps yapabilir. Bunlardan bazıları uyarıcı (veya depolarize edici) nörotransmitterler; diğerleri ise inhibitör (veya hiperpolarize edici) nörotransmitterleri serbest bırakır. GABA birincil inhibitör nörotransmitterdir, yani nöronun aksiyon potansiyelini azaltır. Aksiyon potansiyeli, belli bir seviyenin altına düştüğünde, eşik potansiyeli olarak bilinen nöron, aksiyon potansiyelleri üretmeyecek ve böylece yakındaki nöronları uyarmayacaktır (92,97,98).

2.5. BICUCULLINE

Bicuculline ve onun suda çözünebilen nitrojen türevi olan dört formu, çeşitli dokuların inhibitör nörotransmitteri olan, γ -aminobütirik asit (GABA)'ın postsinaptik yanıtlarının güçlü ve spesifik antagonistleri olarak tanımlanmıştır. Bu bileşikler ayrıca güçlü konvülzan özelliklere sahiptir. Bicuculline'in biyolojik aktivitesi için alternatif açıklamalar önerilmiştir (99-101).

Bicuculline'in, hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda inhibitör nörotransmitter GABA'ya postsinaptik yanıtlar üzerinde güçlü ve spesifik antagonistik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. İnhibisyonu, GABA'nın salınımı veya metabolizması üzerindeki etkilerle ilişkili değildir (99-101).

GABA inhibisyonu dışında, Bicuculline'in, asetilkolinesterazların inhibisyonu ve asetilkolin etkisinin kuvvetlenmesi, aksonların veya kasların membran iletkenliği üzerindeki doğrudan etkileri gibi GABA reseptörlerinden bağımsız etkileri olduğu gözlenmiştir ancak sinaptozomlardan GABA salınımına herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (103).

Bicuculline, farmakolojik olarak daha az aktif madde olan Bicucine oluşturmak için fizyolojik pH ve sıcaklık koşulları altında hidroliz edilir. Çalışmadan önce pH 7'ye nötralize edilmiş çözeltiler kullanılarak yapılan deneylerde Bicuculline aktivitesi üzerindeki negatif sonuçlar dikkatle yorumlanmalıdır. Uygun koşullar altında, klorür iletkenliğini içeren tüm GABA sinapsları bicuculline duyarlı olabilir (103,104).

Bicuculline'in korunmadığı sürece in vivo olarak Bicucine'e dönüşecek olması nedeniyle Bicucine aktivitesinin daha fazla çalışılması gerektiği düşünülmüştür. Bu dönüşümün ayrıca, daha stabil olan metoklorürün daha çok konvülzan aktivite göstermesini açıklayabileceği ileri sürülmüş ve eğer Bicuculline aktif yapı ise, biyolojik aktivitesi birçok analizde göz ardı edilebileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, çalışmalarda; Bicucine, metoklorür ve Bicucine metil esterini analiz edilmiş ve sonuçlarda bu ilaçların Bicuculline'den daha çok aktif olmadıkları görülmüştür (101).

Bicuculline ve metoklorürde bildirildiği üzere 4 Bicuculline türevi de asetilkolinesterazı inhibe eder. Ancak bunları konvülzan olduğu anlamına gelmemektedir. Bicuculline ve türevleri ile indüklenen asetilkolinesterazın inhibisyonunun özellikle Bicuculline Methiodide olmak üzere konvülzyonlara neden olmadığı bildirilmektedir (101). Bicuculline benzeri ilaçlar ayrıca yüksek konsantrasyonlarda (Bicucine ve Bicuculline methiodide) zayıf bir şekilde, GABA'nın fare beyin homojenatlarında membrana bağlı parçacıklara Na^+ -bağımlı tutulumunu inhibe eder. Bunun yanında Bicucine metil ester beyin homojenatlarında GABA transportunu inhibe eder. Svenneby ve Roberts hem GABA'nın hem de glisin alımının $0^\circ C$ 'de beyin homojenatları ile Bicuculline tarafından inhibisyonunu gözlemlemiştir (101). Bununla birlikte, 20-200 μM 'daki Bicuculline bileşiklerinin, GABA

reseptörlerinin antagonizminden başka çeşitli etkilere sahip olduğuna dikkat etmek gerektiği vurgulanmaktadır (101,105).

Sonuç olarak Bicuculline'in GABAerjik sinapslarda post sinaptik yanıtta etkili olduğu bunu da nörotransmitterin tanındığı bölgeleri ve iyon kanallarınının geçirgenliğe sahip kısımlarını etkileyerek yaptığı ileri sürülmektedir (99-105).

2.6. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Pro-ve anti-inflamatuvar yolların aktivasyonu sıkı bir şekilde kontrol edilir ve düzenlenir. Bu yollar koagülasyon / fibrinolitik sistem, lipid mediyatörleri, akut faz ve ısı şok proteinleri, nötrofil-endotelyal hücre aktivasyonu, hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenin aktivasyonu, immün ve immün olmayan hücre apoptozu, artan nitrik oksit üretimi ve oksidan / antioksidan yol dahil olmak üzere diğer homeostatik yollarla yakından bağlantılıdır (106). Ciddi sepsis ve septik şokun, bu sıkı entegre homeostatik mekanizmaların düzensizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu karmaşık konakçı-patojen etkileşimleri, inflamatuvar araçların yanı sıra reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) de açığa çıkmasına yol açmaktadır. Nötrofiller ve monosit / makrofajlar, lökositler tarafından üretilen mikrobik patojenleri doğrudan yok edebilecek antimikrobiyal maddelerden olan patojenik RNS'nin tahrip edilmesinden sorumludurlar. Sepsis sırasında ROS'un aşırı üretimi çoklu organ yetmezliğine sebep olabilir. IL-1, IL-6, TNF ve ROS da dahil olmak üzere inflamatuvar mediatörler, çoklu organ hasarlarına yol açan sitotoksositeye neden olur. ROS ve RNS'nin organlara doğrudan sitotoksosite indüklediği bilinmektedir ve ayrıca hücre sinyal yollarını da değiştirebilirler. İlginç bir şekilde, ROS kaynağı sepsis sırasında ortaya çıkan hücrel sitotoksosite derecesinin bir anahtarı olabilir ve ROS'un LPS uygulamasının neden olduğu in vivo NADPH oksidaz sınırlı akut inflamatuvar yanıtlardan türetildiği, bu enzim kaynağından türetilen ROS'un sitotoksosite ve azaltılmış glutatyon (GSH) seviyesindeki değişiklikler gibi çeşitli indirgeme reaksiyonlarını sınırladığını düşündürmektedir (107). İnflamatuvar konakçı savunması ve enerji metabolizması gibi birçok hücrel süreç, basit elektron transfer reaksiyonları, radikal süreçler ve tiyol / disülfid değişimleri içeren tüm hücre üzerinde gerçekleşen redoks işlemlerini içerir. Doğru işlevi sağlamak için, canlı hücre hücre içi redoks dengesini izlemek, kontrol etmek ve korumak zorundadır. Bununla birlikte, septik

şokta, ROS ve antioksidan savunma mekanizmaları arasında bir dengesizlik meydana gelir ve oksidatif strese neden olur. (Şekil 2.8). Bu dengesizliğin nedeni aşırı ROS üretimi ve / veya antioksidan sistemlerde bir eksikliktir (108).

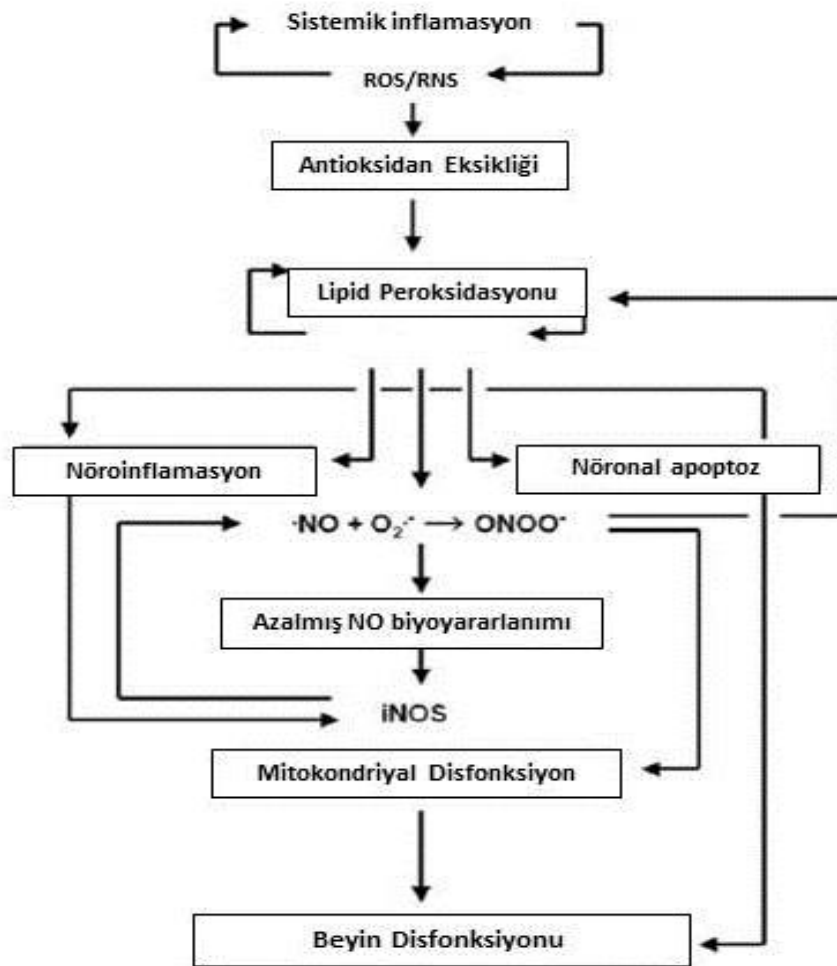
2.6.1. Lipid Peroksidasyonu

Antioksidan yanıtın yetersizliği, beyni sepsiste oksidasyona duyarlı hale getirir. Oksidatif stres başlangıçta, enfeksiyöz bir hareket üzerine aşırı miktarda ROS / RNS üreten nötrofiller gibi fagositik hücreler tarafından teşvik edilir; bu mekanizma muhtemelen istilacı patojenleri yok etmede görevlidir (109). Ayrıca, istila eden patojen, hücresel hasara neden olan H_2O_2 gibi proksidantlar dahil olmak üzere, endotoksin ve ekzotoksinler salabilir. ROS / RNS, çoklu doymamış yağ asidi yan zincirleri içindeki hidrojen grubunun (LH) nispeten düşük E10'una bağlı olarak beyin damarlarında ve beyin parankimi boyunca hücre zarı hasarına neden olacak şekilde termodinamik olarak dengelenir (110). L-H'den daha yüksek bir E10'a sahip olan herhangi bir oksitleyici tür, lipid peroksidasyonunu başlatabilir. .OH bu örnekte bir başlatıcı olarak kullanılır:

“ $L-H + \cdot OH = L + H_2O$ ” L daha sonra daha fazla L-LOOK oluşturabilir; bunun sonucunda da membran lipitlerinin oksitlendiği bir lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu ortaya çıkar. Bu durum membran akışkanlığını artırır ve membrana bağlı proteinlerin inaktivasyonunu tetikler, böylece membran bütünlüğünü ve işlevini bozar (111). Bu mekanizmalar aracılığıyla, sepsis deneysel çalışmalarında serbest radikaller ortaya konulan yaygın kan-beyin bariyeri hasarına katkıda bulunabilir (112). Buna göre, β -glukan ile yapılan tedavinin, deneysel olarak septik sıçanların beyinlerinde (örneğin, kan-beyin bariyerinin bozulmasını önleyerek) vazojenik ödem ve hemorajiyi azalttığı bulunmuştur (110-114). β -glukan, mantarların ve bazı tahıl bitkilerinin hücre duvarlarından türetilen antioksidanlardır. Antioksidan etkilerini nasıl kullandığı bilinmemektedir, ancak plazma membranı lipid çift tabakasına bağlandığı ve α -tokoferolünkine benzer bir şekilde lipid peroksidasyonunu spesifik olarak inhibe ettiği düşünülmektedir (111). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonunun sepsiste serebrovasküler endotelyum ve beyin parankimi üzerine etkileri direkt olarak çalışılmamıştır. Bununla birlikte, lipid peroksitler, malondialdehid gibi reaktif aldehit ürünlerine dönüştüğünden, varlığının bazı dolaylı kanıtları vardır. Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) grubuna aittir, yani tiyobarbitürik asitle reaksiyona girerek, ex

vivo olarak tespit edilebilen bir flüoresan ürün verir. Sepsisli hastalar ve septik hayvanların beyin homojenatlarında beyin omurilik sıvısında TBARS konsantrasyonu artar (113,115).

Yükselmiş TBARS seviyeleri, spesifik beyin bölgelerinde, yani hipokampus, serebral korteks ve serebellumda, sıçanlarda deneysel sepsisin indüklenmesinden 6 saat sonra ortaya çıkmıştır (115). Beyindeki sepsis ilişkili lipit peroksidasyonu hakkındaki mevcut çalışmaların neredeyse tamamı sadece TBARS ölçümlerine dayanmaktadır. TBARS analizleri nispeten nonspesifiktir, çünkü malondialdehit dışındaki aldehidler vücut sıvılarında bulunur, bunların çoğu yanlış pozitif okumalar üretebilen kromojenler oluşturur. Ayrıca, TBARS analizleri sonucu lipit peroksidlerin ayrışması nedeniyle kendi başlarına TBARS üretebildiği bildirilmiştir (110,111).



Şekil 2-7: Sistemik İnflamasyondan – Beyin disfonksiyonuna giden mekanizmada ROS/RNS’lerin Rolü

2.7. ELEKTROFİZYOLOJİK KAYIT YÖNTEMLERİ

2.7.1. Elektroensefalogram (EEG)

Elektroensefalografi (EEG), yaklaşık 140 yıl önce doktor olan Richard Caton tarafından keşfedilmesinden bu yana uzun bir yol kat etti. 1875'te, maymunlar ve tavşanların açık beyinlerinden ilk EEG kaydı alındı. 1924'te, Hans Berger beyin elektriksel aktivitesini arttırmak için basit radyo ekipmanı kullanarak insan kafa derisi üzerinden ilk EEG kaydını yaptı ve kağıda yazılı bir çıktı elde etti. EEG kullanımı ile izlenen beyin aktivitesinin, hastanın rahatlaması, uyku-uyanıklık, oksijen eksikliği gibi hasta durumu değiştiğinde tutarlı, güvenilir ve fark edilebilir bir şekilde değişebileceği iddia edilmiştir (116). Bu buluş önümüzdeki yıllarda yapılacak araştırmaların ve bugün EEG kullanımının çeşitli uygulamalarının ortaya çıkmasına neden oldu.

Ortalama insan beyni yaklaşık 86 milyar nörona sahiptir ve aralarındaki iletişimin anahtarı beyin aktivitesidir (117). Bunlar kendiliğinden elektriksel özellikleri olan uyarılabilir hücrelerdir ve aktiviteleri manyetik alanların yanı sıra elektrik alanlarına da yol açar ve elektrotlarının kullanımıyla kaydedilebilir. EEG, kafa derisi üzerine yerleştirilen elektrotların kullanımıyla ölçülen ve zaman içinde grafiklenen, piramidal hücreler olarak adlandırılan nöronların popülasyonlarının elektriksel aktivitesinin kaydıdır.

İki ana nöronal aktivite türü vardır: aksiyon potansiyeli ve postsinaptik potansiyeller. Aksiyon potansiyeli, esas olarak membranın sodyum ve potasyum iyonlarına geçirgenliğinde meydana gelen değişikliklerin aracılık ettiği bir nöronun çok hızlı depolarizasyonunun sonucudur. Hücre, negatif istirahat durum potansiyelinden belli bir dereceye kadar depolarize olduğunda ortaya çıkar. Bu eşiğe ulaşıldığında, aksonun başlangıcından akson terminaline kadar aksiyon potansiyelinin (yaklaşık 1 ms) hızlı bir şekilde ateşlenmesi söz konusudur. Postsinaptik potansiyellere birçok nörotransmitter sistemi aracılık eder ve sinaptik aktivasyonun bir sonucu olarak, genellikle membran potansiyellerinde daha yavaş değişiklikler meydana getirir (118).

EEG, güvenilir olarak, sadece postsinaptik potansiyelleri kaydedebilir. Postsinaptik potansiyeller, membran dışındaki elektriksel yükteki değişimi temsil eder ve bu, 200 ms'ye kadar hücre dışı alanda sürer. Pozitif veya negatif olan ekstra hücrel elektriksel yük, kafa derisine yerleştirilen elektrotlarla ölçülen değerdir. Piramit şekilli hücreler kutupları olması bakımından küçük piller gibidir - eğer dendritin bir ucu pozitif

ise diğeri negatiftir. Bir piramidal hücrenin tepesindeki dendrit dışındaki yükün pozitif veya negatif olması iki faktöre bağlıdır; birincisi, bir inhibitör veya uyarıcı uyarının başka bir hücrenin aksonundan sinaptik birleşme noktasına gelip gelmediği ve ikincisi, sinapsın hücre gövdesi için proksimal veya distal olup olmadığı. Örneğin, dendritin distal ucuna yakın bir uyarıcı uyarının (korteksin yüzeyine yakın) gelmesi durumunda, zarın geçirgenliğindeki değişim, Na^+ 'nın hücre içine akmasını sağlar (piramidal hücre bir pil gibi davrandığından, dendritin proksimal ucundaki hücre dışı boşluk pozitif olacaktır). Kafa derisi üzerindeki EEG elektrotu, aynı şeyler aynı zamanda, elektrotun altında bulunan hücrelerin aynı makro-kolonundaki çok sayıda piramidal hücrelerde aynı anda gerçekleşiyorsa, negatif bir hücre dışı potansiyel kaydedecektir. Böylece EEG, uyarıcı ve inhibitör postsinaptik potansiyellerin cebirsel toplamını temsil eder.

EEG, bugünün araştırmalarında birçok yönüyle önemli bir rol oynar. Beyin aktivitesinin (veya eksikliğinin) izlenmesi, beyin felci, kafa travması, epileptik aktivite, ensefalopati, uyku bozukluklarını belirlemede yararlı olarak tıpta kullanılır. Hafıza ya da dikkat gibi çeşitli bilişsel işlevlerin araştırılmasında yararlıdır; dil ve klinik araştırmalarda da kullanılır (116,117). EEG aktivitesi, EEG cihazının ekranında, voltajda (özellikle mikrovoltaj) ölçülen değişen frekans ve genlik dalga formları olarak görünür. EEG dalgaları; frekanslarına, genliklerine, dalga şekline ve ayrıca kaydedildikleri kafa derisi bölgelerine göre sınıflandırılır. En bilinen EEG dalga sınıflandırması frekansı kullanır (ör. Alfa, beta, teta ve delta).(118)

Dalga formu sıklığı ve şekli hakkındaki bilgi, hastanın yaş, uyanıklık veya uyku durumu ve kafa derisi üzerindeki konumu ile önem düzeyini belirlemek için birleştirilmiştir. Normal EEG dalga formları, birçok dalga şekli gibi, frekansları, genlikleri ve konumları ile tanımlanır. Frekans (Hertz, Hz) normal veya anormal EEG ritimlerini tanımlamak için kullanılan önemli bir özelliktir. 8 Hz ve daha yüksek frekanslardaki çoğu EEG dalgası, uyanık bir yetişkinin EEG'sindeki normal bulgulardır. 7 Hz veya daha az sıklıkta olan dalgalar, normalde çocuklarda veya uykuda olan yetişkinlerde görünse de, uyanık erişkinlerde anormal olarak sınıflandırılır.

Bir dalganın morfolojisi, evre 2 uykusunda kafa derisinin üzerinde görülen verteks (V) dalgaları gibi belirli şekillere benzeyebilir veya çeşitli ensefalopatilerin varlığında meydana gelen trifazik dalgalar olarak gözlemlenebilir.

Çoğu beyin dalgası arasında değişen frekanslar 0.5-500 Hz'dir. Bununla birlikte, aşağıdaki frekans kategorileri klinik olarak en çok ilişkili olanlardır (116-118).

Alfa dalgaları - 8-13 Hz

Beta dalgaları - 13 Hz'den büyük

Teta dalgaları - 3.5-7.5 Hz

Delta dalgaları - 3 Hz veya daha az

Alfa dalgaları:

Alfa dalgaları, yetişkinlerde daha sık görülür. Başın her iki tarafında ritmik olarak ortaya çıkarlar, fakat özellikle sağ elini kullanan bireylerde nondominant taraftaki amplitüdde biraz daha yüksektir. Posterior kafa bölgelerinde alfa frekansı bir harmonik oluşturduğunda normal bir alfa varyantı kaydedilir. Anteriordan daha çok posterior olma eğilimindedirler ve özellikle gözler kapalı iken, gevşeme durumunda öne çıkarlar. Alfa aktivitesi dikka durumunda normal olarak kaybolur (örneğin, zihinsel aritmetik, stres, gözlerin açılması). Çoğu durumda, normal bir dalga formu olarak kabul edilir. İstisna olarak, çoğu zaman ponsta (örn., Intraserebral hemoraji) hipoksik-iskemik ensefalopati gibi yıkıcı süreçlerden kaynaklanan alfa komadır. Alfa komada, alfa dalgaları uyarılara yanıt vermeyen hastalarda hem anterior hem de posteriorda eşit olarak dağılır (116-118).

Beta dalgaları

Beta dalgaları tüm yaş gruplarında görülmektedir. Genlikleri küçük olma eğilimi gösterirler ve genellikle simetrik ve anterior olarak daha belirgindirler. Barbitüratlar ve benzodiazepinler gibi ilaçlar, artmış beta dalgası aktivitesi gösterirler (116-118).

Teta dalgaları

Teta dalgaları normalde her yaşta uykuda görülür. Uyanık yetişkinlerde, aşırı dalgalanmalar halinde bu dalgalar anormaldir. Teta ve delta dalgaları yavaş dalgalar olarak bilinir (116-118).

Delta dalgaları

Bu yavaş dalgaların frekansı 3 Hz veya daha azdır. Normalde yetişkinlerde ve ayrıca bebeklerde ve çocuklarda derin uykuda görülürler. Uyanık yetişkinlerde delta dalgaları anormaldir. Çoğu zaman, tüm dalgalar içinde en büyük genliğine sahiptirler. Delta dalgaları fokal (lokal patoloji) veya diffüz (genel disfonksiyon) olabilir.

Morfoloji

Bu bölüm, K kompleksi, V dalgaları, lambda dalgaları, uykuda pozitif oksipital keskin geçişler, iğ, ritim, sivri uçlar, keskin dalgalar ve belirli delta dalgaları (polifazik ve monofazik şekiller) dahil olmak üzere bazı normal dalga formlarını tanımlar. Bu dalgalar şekilleri ve formları ve ikincil olarak frekansları ile tanınırlar. Bazı ortamlarda normal olabilen ve diğerlerinde anormal olan dalgalar (örneğin sivri uçlar, keskin dalgalar) içerirler (116-118).

2.8. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER

2.8.1. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)

Nöron spesifik enolaz (NSE), glikolitik enzim enolazın hücre spesifik bir izoenzimi olduğu bilinmektedir. Omurgalı organizmalarda, farklı genler tarafından ifade edilen, enolazın üç izozimi mevcuttur: Enolaz α , MSS ve tüm dokularda bulunur; Enolaz- β , kas spesifik ve Enolaz γ , nöron spesifiktir. Nöral farklılaşmanın geç evresinde ortaya çıkan $\gamma\gamma$ - ve $\alpha\gamma$ -dimerleri nöral olgunlaşma için uygun bir göstergedir. NSE nöronlar ve periferik nöroendokrin hücreler için oldukça spesifik bir belirteçtir. Normal koşullar altında spesifik dokularda NSE bulgularının bir sonucu olarak, malign proliferasyon ile NSE'nin vücut sıvılarında artmış seviyeleri ortaya çıkabilir ve bu nedenle ilgili nöroendokrin tümörlerin (NETs) tanı, evreleme ve tedavisinde önemlidir. NSE seviyelerindeki artış, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) bildirilmiştir. Küçük hücreli akciğer kanserinin (SCLC) tanı, prognozu ve takibinde en güvenilir tümör belirleyicidir. NSE düzeyi tümör boyutu, metastatik alan sayısı ve tedaviye yanıt ile ilişkilidir. Yüksek konsantrasyon insidansı yaygın ve metastatik hastalıkta daha fazla olmasına rağmen, nöroblastomun tüm aşamalarında NSE'nin yükselmiş serum seviyeleri bulunmuştur. Ayrıca, kordon kanında NSE tayini, yenidoğanda nöroblastom tanısını doğrulamak için bir olasılık sunmaktadır. NSE'nin beyin hasarı için kantitatif ölçümler sağladığı ve / veya kardiyak arrest ve travmatik beyin hasarı için kardiyopulmoner resüsitasyon sonrası iskemik inme, intraserebral hemoraji, septik şok, nöbetler, komadaki hastalarda tanı ve sonuç değerlendirmesinin geliştirilmesi gösterilmiştir. Artmış NSE serum seviyeleri melanom, seminom, renal

hücreli karsinom, Merkel hücre tümörü, karsinoid tümörler, disgerminomlar ve immatür teratomlar, malignan femoromositoma, Guillain-Barré sendromu ve Creutzfeldt-Jakob hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (119-121).

2.8.2. S100- β

S100- β dahil S100 proteinleri kalsiyum bağlayıcı protein ailesinin üyeleridir. S100- β , astrositlerde ve Schwann hücrelerinde baskın olarak tespit edilir. Nöroektodermaldir ve mezodermal orijinlidir dolayısıyla kondrositler, adipositler ve melanositler gibi başka hücreler tarafından eksprese edilebilir (121,122). S100- β hücre içi enzim aktivitesini düzenleyebilir, sitoskeletal elementlerle etkileşir ve kalsiyum homeostazında rol oynar. Ek olarak, gelişmiş glikasyon son ürünleri (RAGE) için reseptörlerle bağlanmasına bağlı olarak nöronal hasarı uyarır. Bununla birlikte, S100- β 'nin nanomolar düzeylerinin belirtilen etkilerinin aksine, hücre dışı S100- β 'nin mikromolar düzeylerinin nöronlarda apoptozu indüklemek gibi zararlı etkileri olabilir. Daha önce yapılmış bazı çalışmalarda S100- β 'nin beyin travması, serebral inme, hipoksik iskemik ensefalopatide değeri doğrulanmıştır (121,134). Sepsisli çalışmalarda da değerlerinin yüksek bulunduğu bildirilmiş ancak yeterli çalışma bulunmamıştır. S100- β salgılanması ile ilgili kesin mekanizma hala bilinmemektedir, ancak nöral dokuya saldırıldığında oluşan oksidatif stres ile ilişkili görünmektedir (123,124).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamız için T.C. İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2017/12 numaralı etik kurul izni alındı. Çalışmamızda erişkin, ortalama 230 gr. ağırlığında erkek *Sprague dawley* sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar T.C. İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Araştırma ve Beceri Geliştirme Merkezi'nden temin edildi. Beslenme şekli için standart sıçan yemi ve su kullanılmış olup herhangi bir kısıtlama yapılmamıştır.

3.1. Deney Grupları:

Kontrol Grubu (n=6): Bu gruba herhangi bir madde uygulanmadı ve sıçanlar *ad libitum* beslendi.

LPS Grubu (n = 8): Bu gruptaki sıçanlara, 10 mg/kg dozunda i.p. LPS (LPS, *E.coli* serotip, 055: B5, Sigma / Aldrich), 1 ml'lik hacimdeki % 0,9'luk NaCl çözeltisinde çözülerek uygulandı. İlk enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar dekapite edildi.

Bicuculline Grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara, 1,5 mg/kg s.c. Bicuculline Methiodide (Sigma / Aldrich), 1 ml'lik hacimdeki % 0.9'luk NaCl çözeltisinde çözülerek uygulandı. İlk enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar dekapite edildi.

LPS+Bicuculline Grubu (n=8): Bu gruptaki sıçanlara 10 mg/kg i.p. LPS uygulamasının hemen ardından 1.5 mg/kg s.c. Bicuculline Methiodide uygulandı. İlk enjeksiyondan 24 saat sonra sıçanlar dekapite edildi.

Bicuculline Methiodide, LPS ile eş zamanlı olarak 1,5 mg/kg i.p. olarak uygulandı*. Hayvanlar LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra, ketamine (90 mg/kg) (i.p.) + xylazine (10 mg/kg) (i.p.) ile anesteziye alındı. Anestezi altında öncelikle elektrofizyolojik kayıt olarak elektroensefalografi (EEG) noninvaziv olarak mikro elektrodlar aracılığıyla kaydedildi. Kayıtların tamamlanmasının ardından anestezi altındaki sıçanların kalbinden Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)'li, kuru ve Heparin'li tüplere kan örnekleri alınarak sıçanlar kurban edildi. Her iki bacadan Gastrocnemius kası, total beyin dokuları alındı. Kas ve beyin dokuları histopatolojik

değerlendirmeler için % 10'luk formaldehit içinde diğer prosedürler için ise ise – 80 °C'de saklandı.

Kuru tüplere alınan kanlar 3000 rpm' de 10 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı. EDTA'lı ve Heparin'li tüpe alınan kanlarla beraber aynı gün biyokimyasal incelemeleri gerçekleştirildi.

3.2. Sepsis Modelinin oluşturulması:

Deneyisel olarak sepsis modeli oluşturmak için bakteri hücre duvarı makro molekülü olan Lipopolisakkarit, hormonal farklılıkları ekarte etmek için seçilen erkek *Sprague dawley* sıçanlara 10 mg/ kg i.p. olarak tek doz uygulandı. Enjeksiyon öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları ve solunum sayıları takibe alındı. İlk enjeksiyondan 24 saat sonra hayvanlar dekapite edildi.

3.3. Bicuculline Uygulaması:

GABA-A Reseptör antagonisti olan Bicuculline Methiodide (Sigma) 1,5 mg/kg s.c. olarak tek doz uygulandı. Enjeksiyon öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları ve solunum sayıları takibe alındı. İlk enjeksiyondan 24 saat sonra hayvanlar dekapite edildi.

3.4. Anestezi:

Sıçanlara ketamine (90 mg/kg) (i.p.) + xylazine (10 mg/kg) (i.p.) ile anestezi uygulandı. Anestezi derinliği göz kapağı ve ayak refleksi parametrelerinin değerlendirilmesi ile saptandı.

3.5. Vücut Sıcaklıklarının Ölçülmesi:

Kontrol grubu hayvanlarında anesteziye alınmadan hemen önce, Bicuculline Methiodide ve LPS enjeksiyonu yapılan; LPS, Bicuculline, LPS+ Bicuculline gruplarında enjeksiyonun hemen öncesinde ve anestezinin hemen öncesinde olmak üzere 2' şer kere rektal olarak dijital termometre aracılığıyla vücut sıcaklıkları ölçüldü.

3.6. Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması:

Tüm deney gruplarındaki hayvanlar sakrifiye edilmeden önce hafif anestezi altında non-invaziv olarak yapıştırıcı yardımı ile traşlanmış kafa derisine tutturulmuş mikro elektrod kullanılarak (MLA4103 – AD Instruments, Avustralya) Power Lab Analiz sistemi ile (LabChart - Life Science Data Acquisition and Analysis Software –

AD Instruments, Avustralya) kaydedilmiş, dalga analizleri yapılmış ve görüntüler elde edilmiştir.

3.7. Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi:

Deneye alınan anestezi altındaki sıçanlarda kalpten yaklaşık 2 cc kan lökosit sayısı ölçümü için EDTA'lı tüpe; 5cc kan Nöron Spesifik Enolaz (NSE) parametresi için kuru tüpe kan alındı. Kuru tüpe alınan kanlar 10 dk. 3000 rpm hız ile santrifüj edilerek serum fazı ependorflara ayrılarak değerlendirilmek üzere EDTA'lı tüplerdeki kanlarla birlikte İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya AD' na götürüldü. Serum ve kan örnekleri Biyokimya AD' da otoanalizatörler (Roche Cobass Integra Systems, Roche Diagnostic / Mannheim, Germany) ile çalışıldı.

3.8. Doku Homojenizasyonu:

TNF- α , IL-10, GABA, ELISA analizleri ve MDA seviyelerinin ölçümü için beyin ve kas dokuları tartıldı 0,15 M KCl çözeltisi ilave edildi ve Janke & Kunkel marka doku homojenizatörü ile homojenize edilerek % 10' luk doku homojenatları hazırlandı. Daha sonra 3000 rpm'de 5 dk santrifüjleme işlemi ile süpernatantları çalışma için ayrıldı.

3.9. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) Çalışmaları:

Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir.

Pro-inflamatuvar sitokin olan TNF- α kas ve beyin dokusunda sıçan için spesifik ELISA kiti (Yh-biosearch, Shanghai, China) ile çalışıldı.

Anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 kas ve beyin dokusunda sıçanlar için spesifik ELISA kiti (Yh-biosearch, Shanghai, China) ile çalışıldı.

GABA kas ve beyin dokusunda sıçanlar için spesifik ELISA kiti (Yh-biosearch, Shanghai, China) ile çalışıldı.

3.10. Bouge Metodu ile TBARS Düzeylerinin Ölçülmesi:

Beyin ve kas dokusunda dokusunda lipid peroksit seviyeleri, TBARS düzeyleri ölçerek hesaplandı. Bu yöntemde, beyin ve doku homojenatları trikloroasetik asit (TCA, Sigma), konsantre hidroklorik asit (HCl, Merck) ve 15 dakika kaynatılmış butillenmiş hidroksitoluen (Sigma) içeren tiyobarbitürik asit tepkin maddesi (TBA,

Sigma, Aldrich) ile reaksiyona sokuldu ve daha sonra soğutulup santrifüjlendi. TBARS seviyeleri, 532 nm'de spektrofotometri (Shimadzu, JAPAN) kullanılarak süpernatant fraksiyonundan ölçüldü. TBARS konsantrasyonları nmol / g doku olarak ifade edildi.

3.11. İmmünfloresan Boyama:

3.12.1. Preparat hazırlama:

Beyin dokusu %10'luk formaldehit içinde 1 gece tutularak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Doku takibi işlemlerinde dokudan fiksatifin çıkarılması için akarsudan ve ardından 24 saat sürecektir artan alkol serilerinden geçirilmiştir. Dokudan alkolün uzaklaştırılıp daha sonra dokunun gömüleceği parafinin dokuya iyi işlemesi için ksilen ile 1 saat muamele edilmiştir. Etüvde 58 °C'lik saf parafin içinde dokular 2 saat bekletilmiştir. Dokular bloklayma işlemi için hazır hale geldiğinde parafin içine gömülüp küp bloklar elde edilmiştir.

Boyama yapmak için mikrotom kullanılarak bloklardan 10 µm kalınlıkta kesitler alınıp poly-l-lizin kaplı lamlara aktarılmıştır.

*Nöronlardaki dejenerasyonu saptayabilmek için: S100B antibody (orb388636) biorbyt, Unipoert ID: P04271, Entrez: 6285, Mouse, (sekonder antibody Dylight 649, goat anti-mouse IgG (H&L) Abbkine # A23610)

*Canlı nöronları saptayabilmek için: NeuN antibody (orb48522) biorbyt, Unipoert ID: A6NFN3, Entrez: 146713, Rabbit (sekonder antibody yeşil-FITC),

*Sinaptofizinin saptayabilmek için: SYP (orb69251) biorbyt, Entrez: 6855, Mouse (sekonder antibody Dylight 649, goat anti-mouse IgG (H&L) Abbkine # A23610)

kullanılarak kesitlerde çoklu floresan boyama yapılmıştır.

3.12.2. Çoklu Floresan Boyama:

Kesitler parafinden ksilen ile arındırıldıktan sonra kesitler beyazlayana kadar ksilen uçurulmuştur. Ardından -20°C'de soğuk metanolde 10dk bekletilmiştir. Rehidratasyon işlemi için son olarak kesitler 2 dakika distile suda tutulmuştur. Ardından epitoplara açılması için 5 dakika %0,2 lik tween20 ile inkübe edilerek distile su ile yıkanmıştır. 1 x sitrat tamponu (Citate Buffer, pH 6,0) ile mikrodalga fırında 20 dakika kaynatılmıştır. Oda sıcaklığına gelen kesitler iki kez 10 dk, PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,6) ile yıkanmıştır.

Sulandırma oranı optimize edilen primer antikorlardan önce NEUN (%2 serum içeren PBS ile dilüe) kesitlere damlatılmış ve üzerleri cover slip ile kapatılıp bir gece +4°C’de tutulmuştur. Ertesi gün NEUN sekonder antikorunu 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilip PBS ile yıkanmış ve ardından SYN (%10 keçi serumu içeren PBS ile dilüe) veya S100 (%0,3 TritonX-100, %1 serum içeren PBS ile dilüe) kesitlere damlatılmış ve üzerleri cover slip ile kapatılıp bir gece +4°C’de tutulmuştur. Ertesi gün primer antikorların sekonder antikorları 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilip PBS ile yıkanmıştır. Çekirdek boyası Dapi ile inkübe edilip preparatlar solmayı engelleyici ve mounting medium ile kapatılmıştır. Histolojik değişiklikler FITC, H&L ve DAPI uyumlu filtreleri olan floresan mikroskopunda değerlendirilip fotoğraflanmıştır.

Primer antikorlar:

S100B (orb388636) biorbyt, Unipoert ID: P04271, Entrez: 6285, Mouse

Dilution range: 1-2µg/ml

Size: 100 µg

SYP (orb69251) biorbyt, Entrez: 6855, Mouse

Dilution range:1:200- 1:1000

Size: 100 µl

NeuN (orb48522) biorbyt, Unipoert ID: A6NFN3, Entrez: 146713, Rabbit

Dilution range:1:50- 1:200

Size: 100 µl

Sekonder antikorlar:

Dylight 649, goat anti-mouse IgG (H&L) Abbkine # A23610

Amax:652nm Emax.670nm

Dilution range: 1:50-1:1000

Size: 100 µl

Dylight 488, goat anti-rabbit IgG Abbkine # A23220

Amax:493nm Emax.518nm

Dilution range: 1:50-1:1000

Size: 100 µl

3.12.3. Protokol Basamakları:

- 1) Kesitler 1 gece taze ksilende etüvde inkübe
- 2) Beyazlayana kadar oda ısısı kurutma
- 3) -20°C’de soğuk metanolde 10dk inkübe
- 4) Rehidratasyon: 2 dakika distile suda
- 5) 5 dakika %0,2 lik tween20 ile inkübe edilerek distile su ile yıkama
- 6) 1 x sitrat tamponu (Citate Buffer, pH 6,0) ile mikrodalga 4x5 dk 700 watt
- 7) 20 dk kadar bekleme oda sıcaklığına soğuma
- 8) Distile su ile yıkama
- 9) 2x5 dk PBS (pH 7,6)
- 10) Primer antikor 1 gece +4
- Synaptophysin 1:200 (%10 serumda) Sekonder dy649; 1:200 (2 saat oda sıcaklığı)
 - *P 100µl goat serum + 5µl Synaptophysin + 895 PBS = 1000 µl
 - *S 5µl dy649 + 995 PBS =1000 µl
- S100 1:100 (%0,3 TritonX-100, %1 serumda) Sekonder dy649; 1:500 (2 saat oda sıcaklığı)
 - *P 10µl goat serum + 10µl S100 + 3µl TritonX-100 + 977 PBS = 1000 µl
 - *S 2µl dy649 + 998 PBS =1000 µl
- 11) 2x5dk PBS
- 12) Primer (2.) antikor 1 gece +4
 - Neun 1:100 (%2 serumda) Sekonder dy488; 1:200 (2 saat oda sıcaklığı)
 - *P 20µl goat serum + 10µl Neun + 970 PBS = 1000 µl
 - *S 5µl dy488 + 995 PBS =1000 µl
- 13) 2x5dk PBS
- 14) Üzerini kaplayacak kadar Dapi çalışma solüsyonu eklenir. 5 dk folyaya sarılı karanlıkta bekletilir.

- 15) Dapi uzaklaştırılır
- 16) 3 kez 3 dk PBS ile yıkanır.
- 17) 1dk distile su
- 18) Kapatma

3.12. İstatistiksel İncelemeler:

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Statistical Package for Social Sciences)

22.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA)

ile yapılmıştır. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla ise post-hoc Tukey HSD testi kullanılmış olup, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

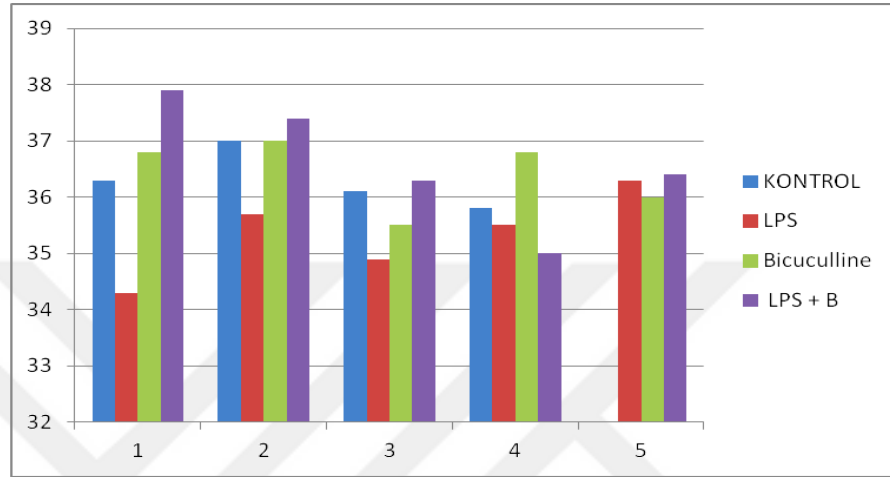
3.13. Kullanılan Cihazlar

- POWER LAB- (BADABEM- LabChart - Life Science Data Acquisition and Analysis Software – AD Instruments)
- HOMOJENİZATÖR (Janke & Kunkel)
- SPEKTROFOTOMETRE (SHIMADZU, JAPAN)
- OTO-ANALİZÖR (Roche Cobass Integra Systems, Roche Diagnostic / Mannheim, Germany)
- MİKROTOM
- FLORESAN MİKROSKOBU (İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi- Yaşam Bilimleri Laboratuvarı- Olympos)
- ETÜV
- SOĞUTMALI MİKROFÜJ (ROCHE)
- SANTRİFÜJ
- pH METRE (Hanna)
- ELİSA READER
- KANALLI OTOMATİK PİPET
- OTOMATİK PİPET
- SOĞUTUCU +4, -20, -80 (BEKO)
- HASSAS TARTI
- KARIŞTIRICI

4. BULGULAR

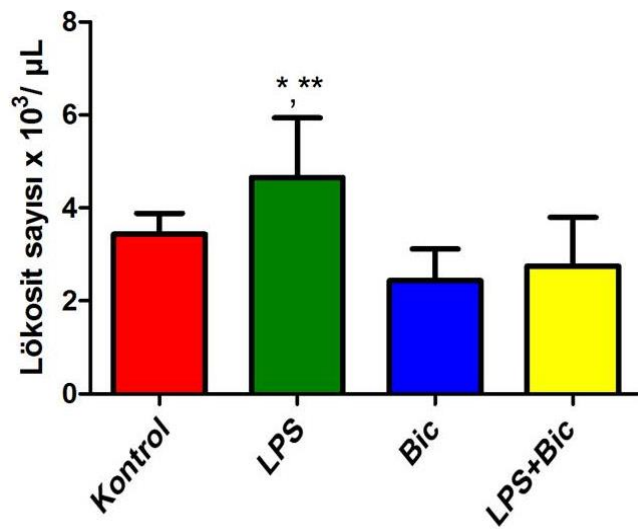
4.1. Sepsis Bulguları

- LPS ile sepsis oluşturulan grupta sıçanların metabolik eğilimlerine göre hiptermi ya da hipermiye girdiği gözlemlendi. (Şekil: 4-1)



Şekil 4-1: Deney Öncesi Ölçülen Vücut Sıcaklıkları (°C)

- Lökosit sayısı LPS grubunda Kontrol ve LPS gruplarına göre anlamlı ($p < 0,05$), Bicuculline grubuna göre ileri derece anlamlı bulundu ($p < 0,01$). (Şekil: 4-2)

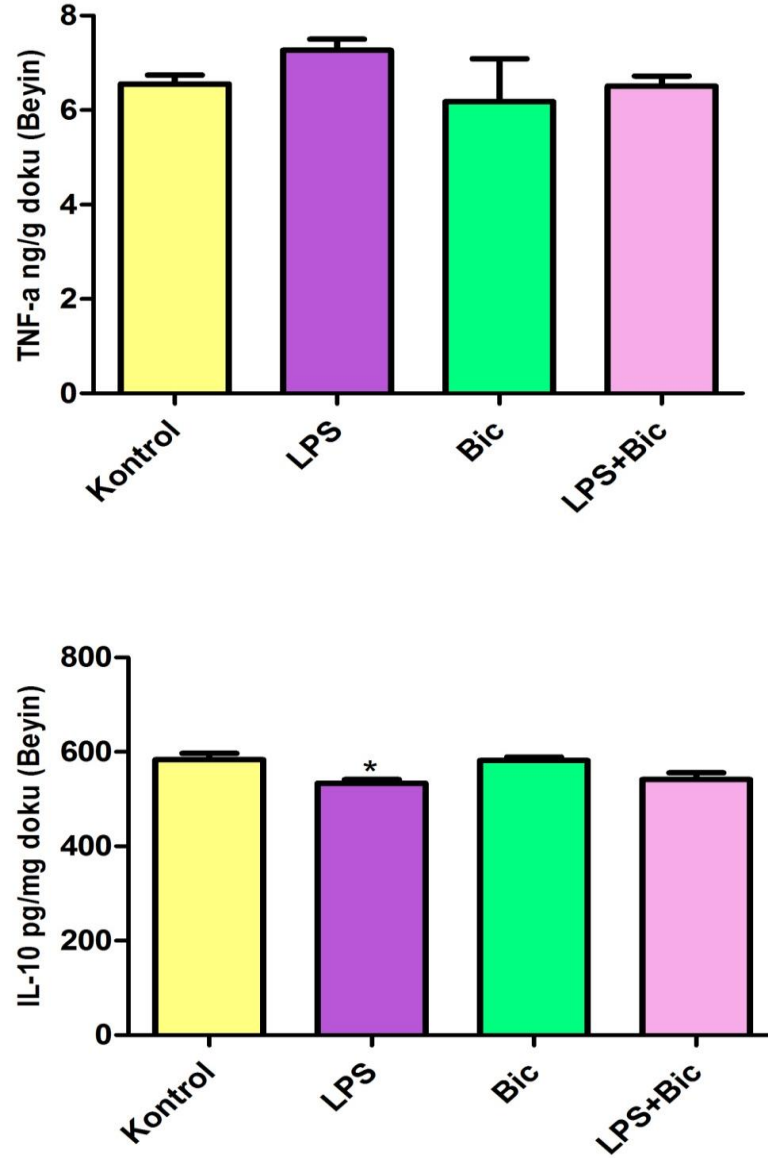


Şekil 4-2: Gruplar arası lökosit sayılarının karşılaştırılması

*: $p < 0,5$ **: $p < 0,01$

4.2. Deneysel Bulgular

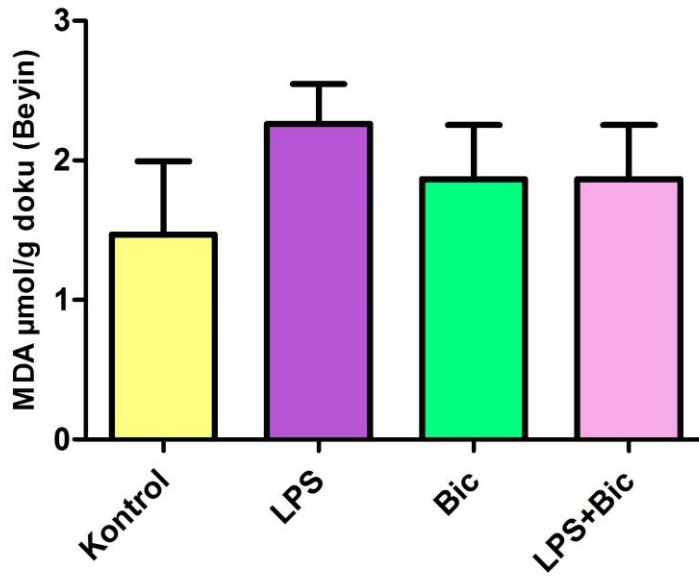
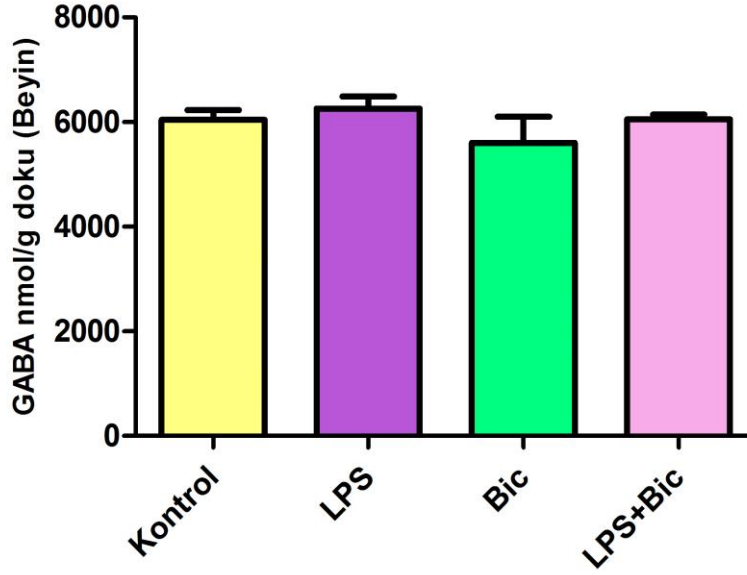
- TNF- α seviyeleri beyin dokusunda LPS grubunda diğer gruplara göre artış göstermiştir. Ancak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$).
- IL-10 seviyeleri beyin dokusunda LPS grubunda diğer deney gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). (Şekil: 4-3)



Şekil 4-3: Gruplara göre beyin dokusunda TNF- α ve IL-10 seviyeleri

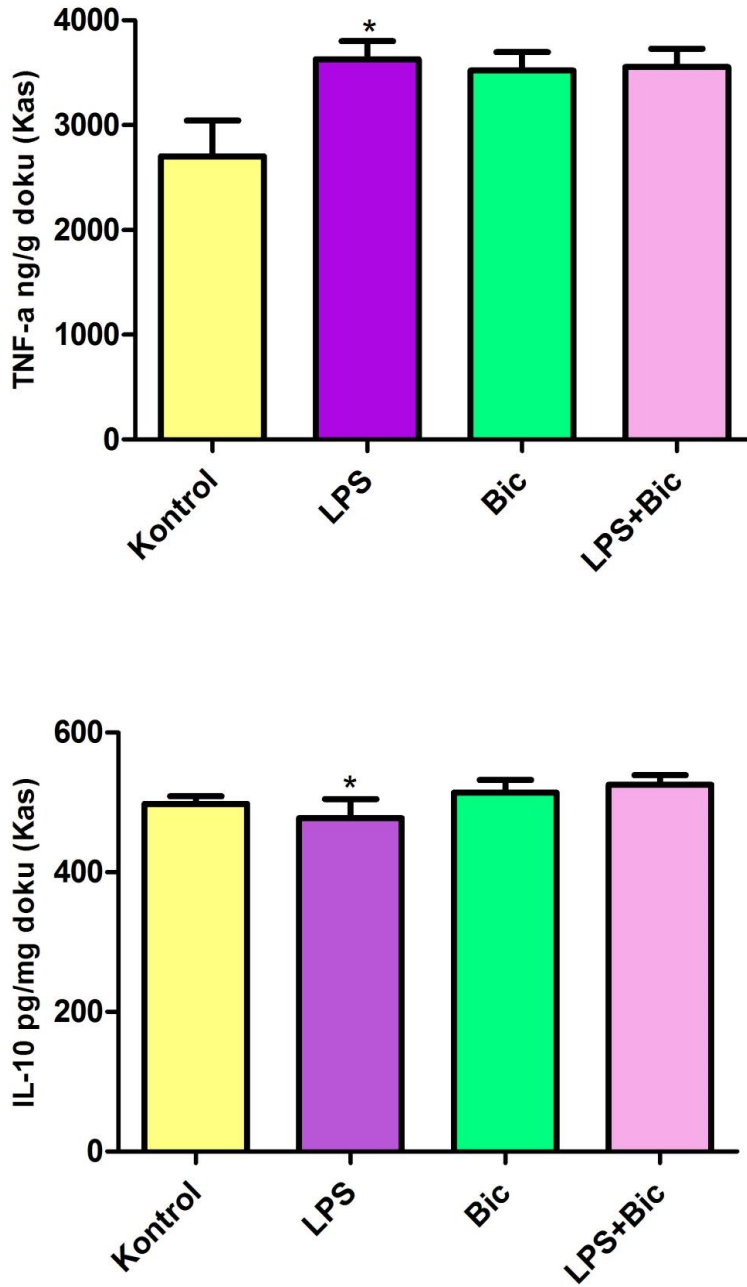
*: $p<0,5$, **: $p<0,01$ ***: $p<0,001$

- GABA ve MDA seviyeleri beyin dokusunda LPS grubunda diğer gruplara göre artış göstermiştir. Ancak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$). (Şekil: 4-4)



Şekil 4-4: Gruplara göre beyin dokusunda GABA ve MDA seviyeleri

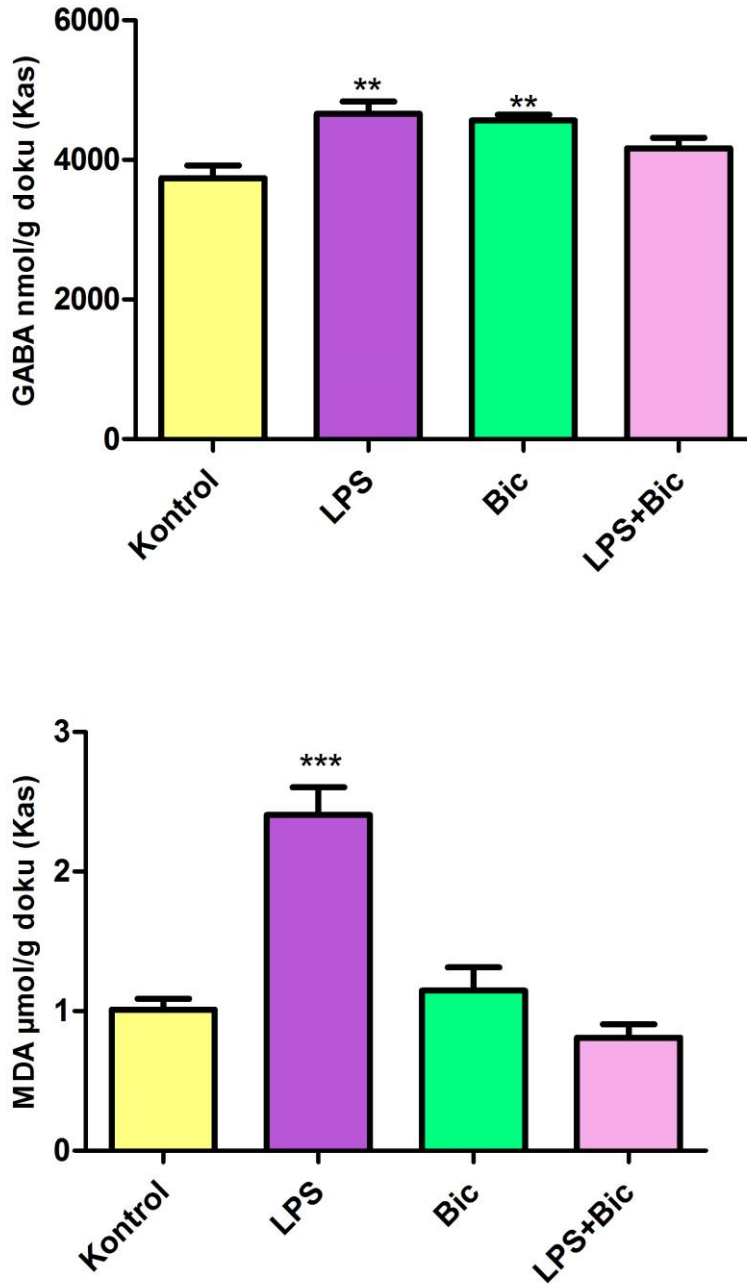
- TNF- α seviyeleri kas dokusunda LPS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,05$).
- IL-10 seviyeleri kas dokusunda LPS grubunda diğer deney gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). (Şekil: 4-5)



Şekil 4-5: Gruplara göre kas dokusunda TNF- α ve IL-10 seviyeleri

*: $p<0,5$

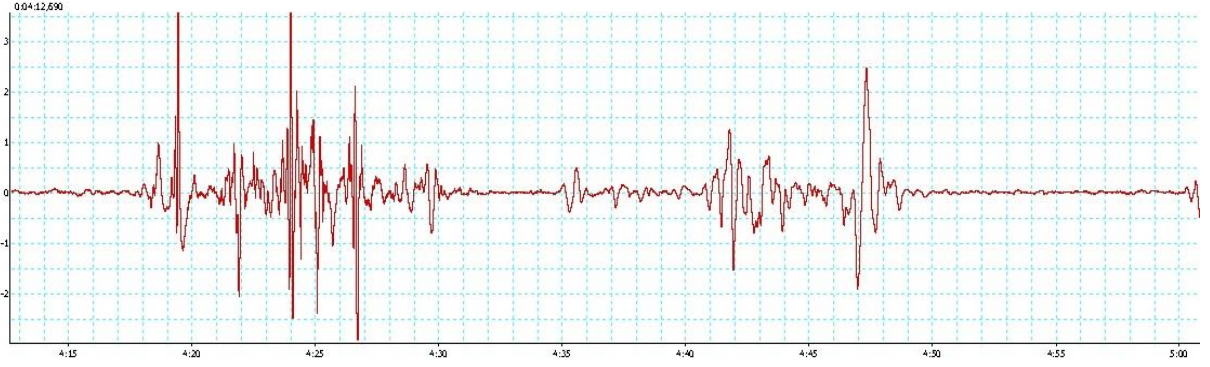
- GABA seviyeleri kas dokusunda LPS ve Bicuculline gruplarında diğer gruplara göre ileri derecede anlamlı artış göstermiştir ($p<0,01$).
- MDA seviyeleri kas dokusunda LPS grubunda diğer deney gruplarına göre ileri derecede anlamlı olarak artmıştır ($p<0,001$). (Şekil: 4-6)



Şekil 4-6: Gruplara göre kas dokusunda GABA ve MDA seviyeleri

** : $p<0,01$ *** : $p<0,001$

- EEG dalga analizleri sonuçlarında LPS grubunda dalga genliklerinde min.-maks. oranı LPS grubunda diğer deney gruplarına göre ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Kontrol, Bicuculline ve LPS+Bicuculline gruplarındaki aktivite istirahat ile uyumlu gözlemlenmiştir. (Şekil: 4-7)



Şekil 4-7: Sepsisli Sıçandan alınan non-invaziv EEG kaydı

Tablo 1: Gruplar arası EEG analizi

Gruplar	Min.-Maks.	$\pm Sd$
Kontrol	1.143	0,05
LPS	10.240*	0,989
Bicuculline	0.833	0,13
LPS+Bic	1.255	0,20

* $P<0,001$

Tablo 2: Gruplara göre beyin dokusunda TNF- α değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	$\pm$ Sd	P
Kontrol	6	6.557	0,37	
LPS	8	7.270	0,62	
Bic	8	6.181	2,03	
LPS+Bic	8	6.509	0,57	
Total	30	6.678	1,07	

Tablo 3: Gruplara göre beyin dokusunda IL-10 değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	$\pm$ Sd	P
Kontrol	6	583.628	30,639	
LPS	8	5033.701	22,0312	0.018
Bic	8	581.863	16,634	0.023 vs. LPS
LPS+Bic	8	541.667	34,495	
Total	30	556.126	33,995	

Tablo 4: Gruplara göre beyin dokusunda GABA değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	$\pm$ Sd	P
Kontrol	6	6041.026	380,32	
LPS	8	6259.829	563,88	
Bic	8	5605.470	1111,59	
LPS+Bic	8	6049.003	224,53	
Total	30	6002.116	648,95	

Tablo 5: Gruplara göre beyin dokusunda MDA değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	± Sd	P
Kontrol	6	1,84253875	0,024	
LPS	8	2,3928775	0,07	
Bic	8	1,5021825	0,04	
LPS+Bic	8	1,719549	0,08	
Total	30	1,80310819	0,06	

Tablo 6: Gruplara göre kas dokusunda TNF- α değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	± Sd	P
Kontrol	6	2700.129	840,83	0.05
LPS	8	3627.576	350,573	
Bic	8	3523.057	305,367	
LPS+Bic	8	3554.454	350,143	
Total	30	3264.592	681,597	

Tablo 7: Gruplara göre kas dokusunda IL-10 değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	± Sd	P
Kontrol	6	497.672	22,50	0.05
LPS	8	477.370	66,61	
Bic	8	513.603	37,64	
LPS+Bic	8	525.280	37,20	
Total	30	504.108	47,02	

Tablo 8: Gruplara göre kas dokusunda GABA değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	± Sd	P
Kontrol	6	3736.156	371,53	
LPS	8	4660.586	393,49	0,007
Bic	8	4566.775	156,62	0,021
LPS+Bic	8	4169.381	391,93	
Total	30	4285.016	478,49	

Tablo 9: Gruplara göre kas dokusunda MDA değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	N	Mean	± Sd	P
Kontrol	6	1,098	0,04	0,000
LPS	8	2,068	0,01	
Bic	8	0,997	0,02	0,000
LPS+Bic	8	0,812	0,02	0,000
Total	30	1,209	0,06	

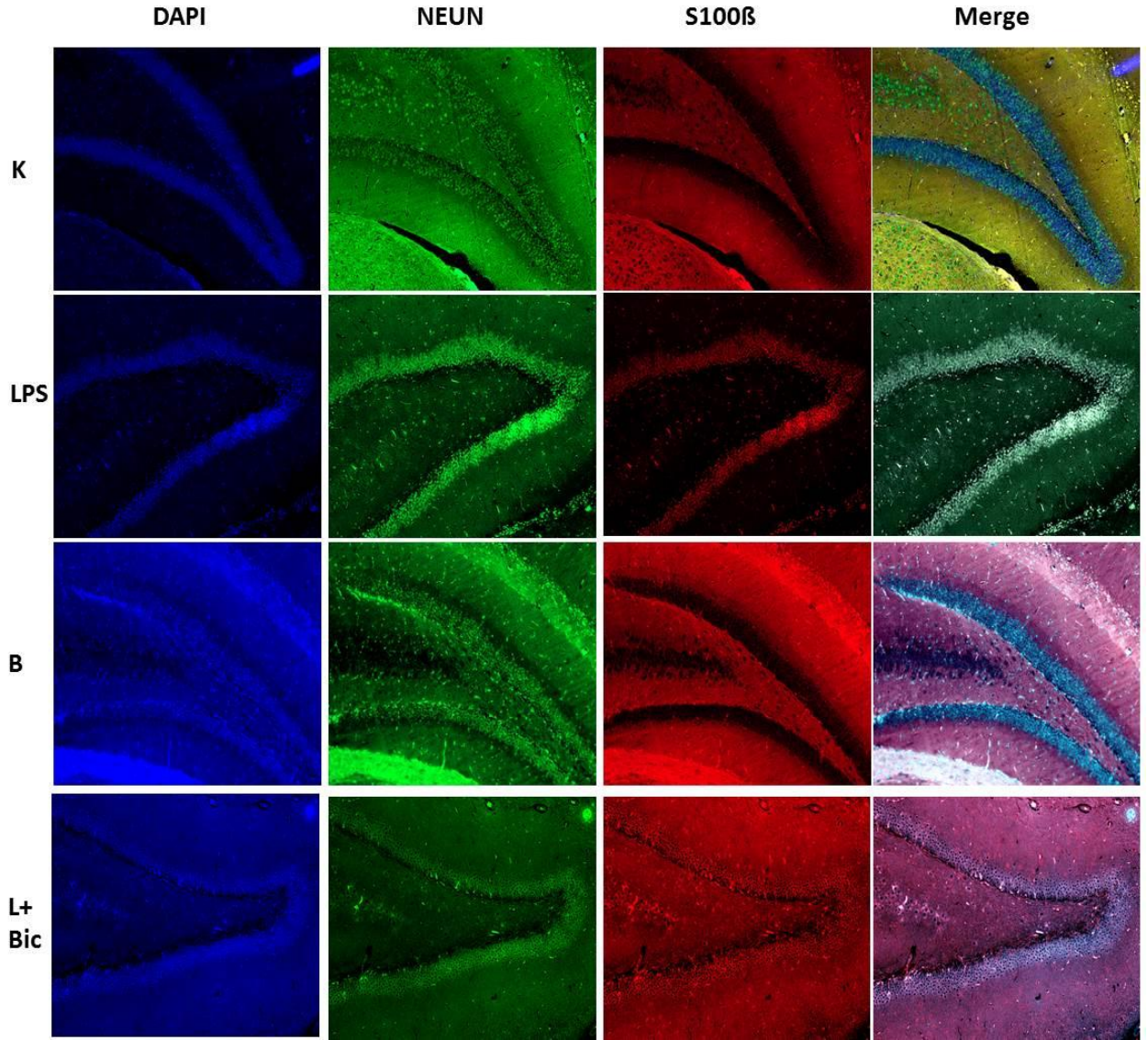
Tablo 10: Gruplar arası serum NSE değerleri

	Kontrol	LPS	Bicuculline	LPS+Bic
NSE (µg/L)	0,23±0,398	3,5675±1,325 ^{*,**}	0±0	0,206±0,221

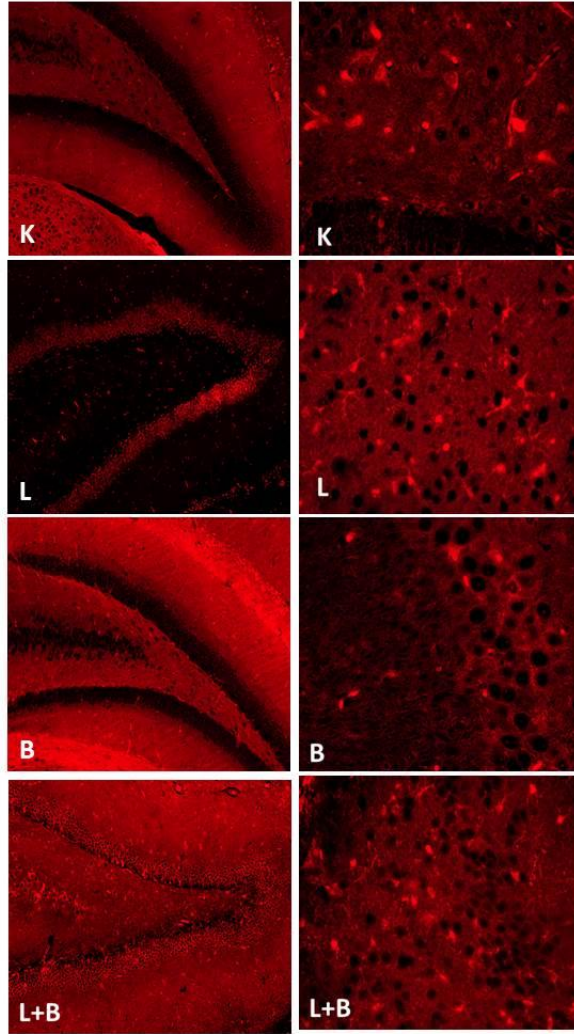
*LPS – Kontrol ve LPS+Bic: p<0,05

**LPS – Bicuculline: p<0,01

- Beyin dokusunda S100- β antikoru LPS grubunda diğer deney gruplarına göre yoğun tutulum göstermiştir.
- NeuN antikoru Kontrol, Bicuculline ve LPS+Bicuculline gruplarında yoğun tutulum göstermiştir.

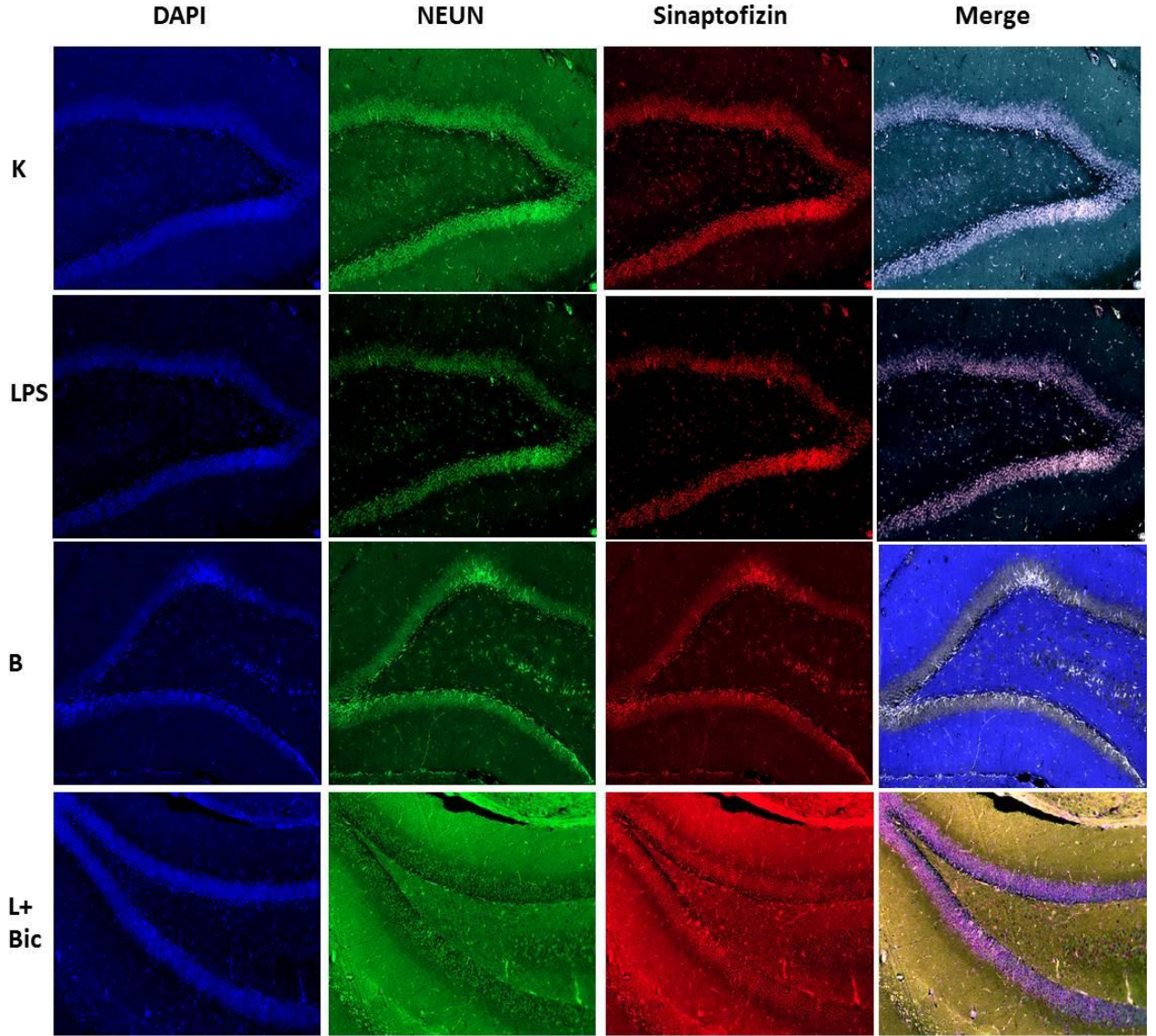


Şekil 4-8: Gruplar arasında beyin dokusunda DAPI, NEUN, S100- β boyamaları x 10

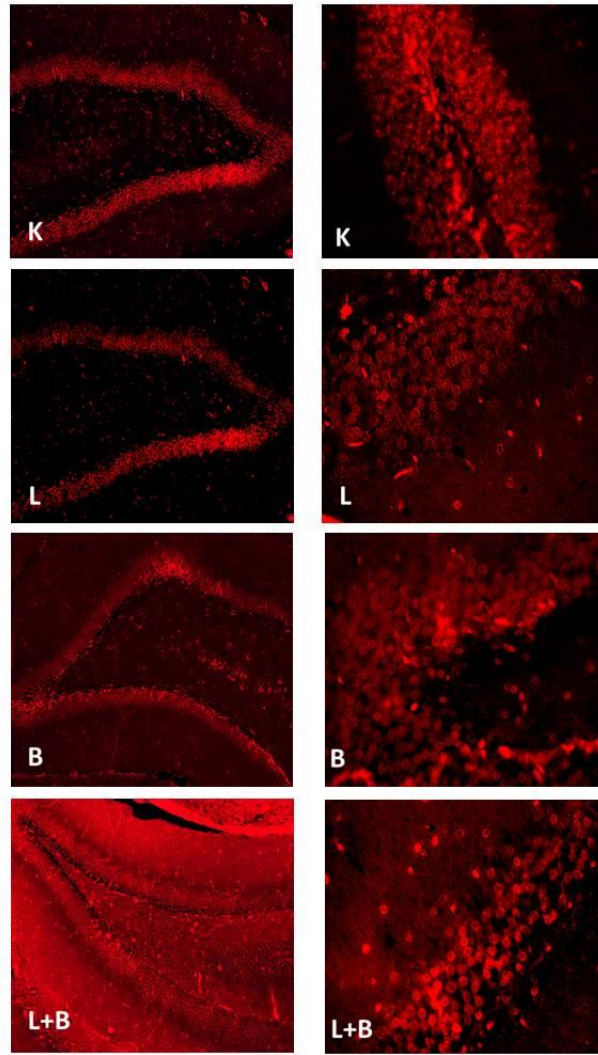


Şekil 4-9: Gruplar arasında beyin dokusunda S100- β boyamaları x 10, x 40

- Beyin dokusunda Sinaptofizin antikoruna LPS grubunda diğer deney gruplarına göre çok az tutulum göstermiştir.
- NeuN antikoruna Kontrol, Bicuculline ve LPS+Bicuculline gruplarında yoğun tutulum göstermiştir.

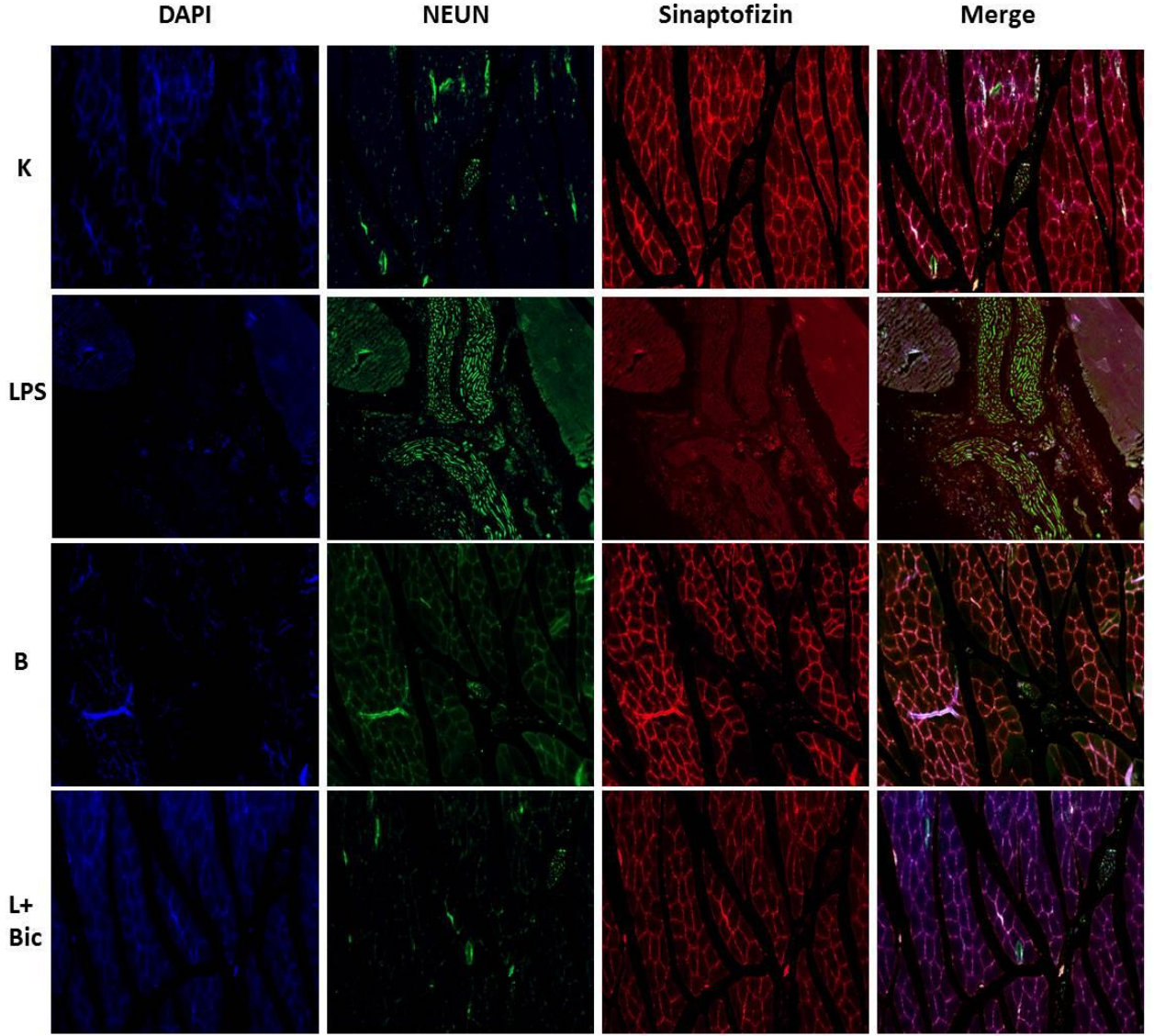


Şekil 4-10: Gruplar arasında beyin dokusunda DAPI, NEUN, Sinaptofizin boyamaları x 10

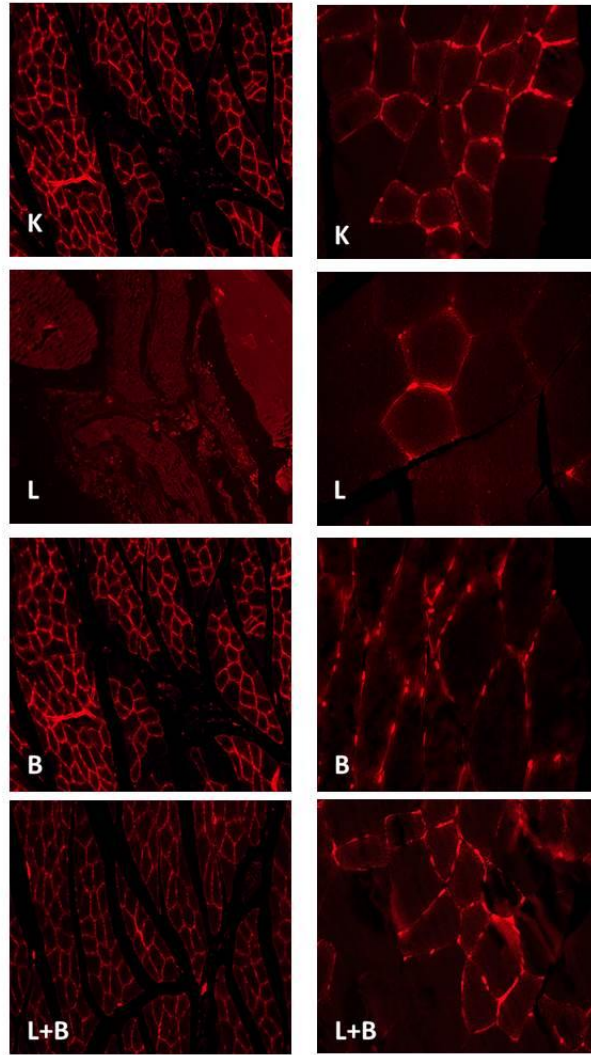


Şekil 4-11: Gruplar arasında beyin dokusunda Sinaptofizin boyamaları x 10, x 40

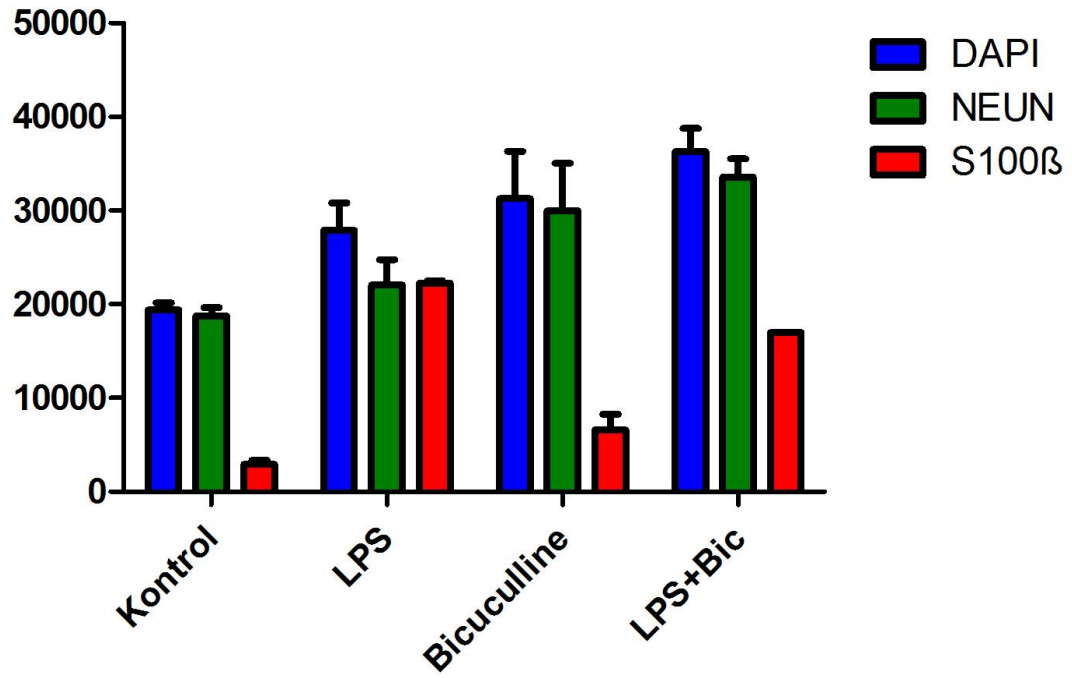
- Kas dokusunda Sinaptofizin antikoru LPS grubunda diğer deney gruplarına göre çok az tutulum göstermiştir.



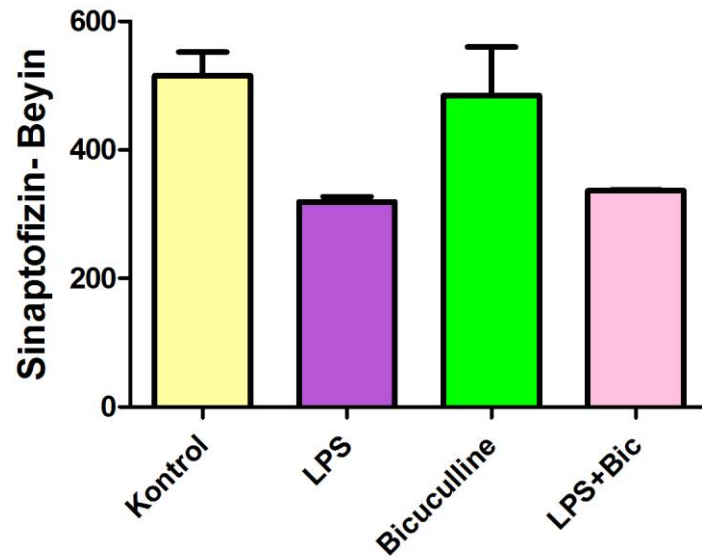
Şekil 4-12: Gruplar arasında kas dokusunda DAPI, NEUN, S100- β boyamaları x 10



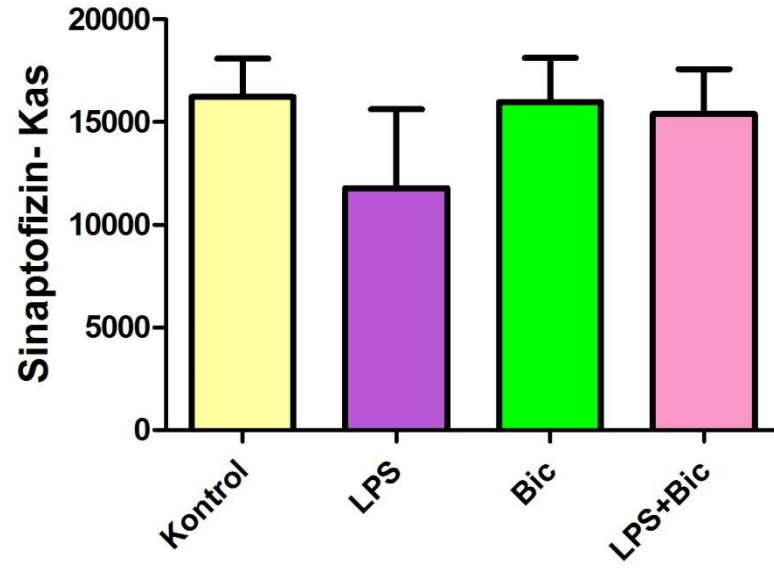
Şekil 4-13: Gruplar arasında kas dokusunda Sinaptofizin boyamaları- x 10, x 40



Şekil 4-14: Gruplar arasında immünofloresan boyama skorlaması (S100-β)



Şekil 4-15: Gruplar arası immonofloresan boyama skorlaması (Sinaptofizin-Beyin)



Şekil 4-16: Gruplar arası immünofloresan boyama skorlaması (Sinaptofizin-Kas)

5. TARTIŞMA

Sepsis, patofizyolojisi kısmen aydınlatılmış, bağışıklık sisteminin, koagülasyon yolunun, parankimal hücrelerin, endokrin ve metabolik yolların bileşenlerini içeren dinamik bir süreçtir. Bakterilerden salınan ve hasarlı hücrelerden elde edilen ürünler de dahil olmak üzere sepsisi tetikleyen birçok faktör olduğu öne sürülmüştür (54).

Sepsis gelişimi sırasında oluşan beyin hasarını açıklamak için önerilen mekanizmalar arasında kan-beyin bariyerinde değişiklikler, pro-ve anti-inflamatuvar sitokinlerin lokal jenerasyonu, enerji ve aminoasit metabolizmasının bozulması, beyin iskemisi ve nörotransmitter düzeylerindeki dengesizlik yer alır (125). Septik ensefalopati ile beyin arasındaki etkileşim ve sistemik inflamasyonun beyin fonksiyonunu nasıl etkilediğini açıklayan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Septik ensefalopati semptomlarını tetikleyen ortak son yolun asetilkolin başta olmak üzere nörotransmitterlerin deregülasyonu olduğu ileri sürülmektedir (54).

Çalışmamızda, LPS uygulaması ile sepsis modeli oluşturduğumuz sıçanlarda inflamasyonun beyin ve kas dokusundaki etkilerini ve bu etkilerin iyonotropik GABA_A reseptörü antagonisti olan Bicuculline Methiodide tarafından nasıl değiştirilebileceğini incelemeyi amaçladık.

LPS uygulaması ile sepsis oluşumunu incelemek ve Bicuculline uygulamasının sepsisteki hemodinamik etkilerini takip etmek amacıyla vücut sıcaklıklarını ölçtüğümüz sıçanlarda LPS verilen grupta hipotermi ya da hipertermi olmak üzere iki farklı vücut sıcaklığı değişikliğini kaydettik. Diğer deney gruplarındaki sıçanların ise vücut sıcaklığının stabil kaldığını gözlemledik. Yapılan uluslararası konsensuslarda alınan ortak sepsis tanımlama kriterlerinden biri olan vücut sıcaklığındaki değişiklikler sepsis tanımımızın ilk basamağını oluşturdu. Enjeksiyonlardan 24 saat sonra kalpten alınan kanda incelediğimiz lökosit sayıları ise LPS verilen grupta anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemlerinin bir parçası olan immun sistem hücrelerinin sepsise karşı konak yanıtında kritik rol aldığı çalışmalarda bildirilmiştir (126,6).

Sepsis ile ilişkilendirilmiş olan ensefalopatide görülen nörolojik komplikasyon mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Septik ensefalopati modeli oluşturulan deneysel çalışmalarda beyin GABA reseptör yoğunluğu ve serum GABA düzeylerinde arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (127-133). Bunun yanında, GABA analogu olan benzodiazepinin antagonistlerinin septik ensefalopatiyi iyileştirdiği yönünde çalışmalar mevcuttur (127,128). Bakterilerin büyük miktarda GABA üretebileceği ve bakteriyel sepsisin hepatik ensefalopatinin bir nedeni olması sonucu GABAerjik yolların septik ensefalopatiyle ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (134,135).

GABA_A reseptörlerinin, Merkezi Sinir Sisteminin supra-spinal çekirdeklerinde önemli rol oynadığı ve nöronal eksitabilite üzerine etkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (136-142).

Literatürlerde merkezi GABAerjik aktivitenin periferik bölgelerdeki endotoksik inflamatuvar cevabı modüle etme şekli ve bu etkileşimin klinik etkilerin yorumlanmasında önemli olduğu belirtilmiştir (127,129,137).

LPS ile uyarılmış sepsiste akut beyin fonksiyon bozukluğu, özellikle hipokampüste GABA seviyelerinde artış ile birlikte bilinç düzeyi ve nöronal aktivitede azalma olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (138-142).

Rossi ve ark., yaptıkları çalışmalarda, otoimmün ensefalomiyelit sırasında salınan proinflamatuvar moleküllerin merkezi GABA aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir (143).

Sugiura ve ark., yaptıkları deneysel çalışmalarda makrofaj GABA reseptörleri, NF κ B ve MAPKERK yolağı üzerine etki ederek farelerin endotoksemiye duyarlılığının arttırdığını göstermişlerdir (144).

Sallam ve ark., GABA_A reseptör blokeri Bicuculline ve GABA_B reseptör blokeri Saclofen kullanarak Gabaerjik aktiviteyi gösterdikleri çalışmada Bicuculline uygulanan grupta, kardiyak ve hemodinamik bulgular ile inflamatuvar bulguların Saclofen uygulanan gruba göre iyileştiğini ve iyonotropik GABA_A reseptörünün inflamatuvar süreçte etkili olduğunu bildirmişlerdir (137).

Sepsiste değişen nörotransmitter seviyeleri bilişsel değişikliklerle birlikte nöronal mekanizmalarda bozulmalara ve beyin hasarına yol açmaktadır (145).

Enfeksiyon, hipoksi veya strese neden olan faktörler GABA_A reseptör alt birimlerinin ekspresyonunu modüle ederek inflamatuvar medyatörlerin, GABA_A reseptörlerine bağlanarak reseptör aktivitesinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (146). Çalışmamızda sepsis oluşturduğumuz grupta, total beyin dokusunda GABA seviyelerinin arttığını ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemledik ($p>0.05$). Bicuculline ve LPS+Bicuculline gruplarında ise GABA seviyelerinin kontrol grubuyla benzer olduğunu saptadık.

Winder ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sepsis modeli oluşturdukları sıçanların beyin dokusunda GABA seviyelerinin yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Özellikle alt beyinde GABA seviyelerinin arttığını ancak total olarak beyin dokusunda bu artışın bizim çalışmamızda da olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (147). Beyin dokusundaki GABA düzeylerine ait bulgularımız literatürde yer alan diğer çalışmalarla benzer bulunmaktadır.

Kas dokusunda da incelediğimiz GABA seviyeleri sepsis oluşturduğumuz grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.01$). Bununla birlikte GABA_A reseptör antagonisti olan Bicuculline Methiodide uyguladığımız grubumuzda ise, yine kontrol grubuna göre anlamlı derecede GABA seviyelerinde artış gözlemledik ($p<0.01$). Bicuculline'in farmakolojik özelliklerinin anlatıldığı çalışmalarda, Bicuculline'in GABA'nın iyonotropik GABA_A reseptörüne GABA ile yarışmalı şekilde bağlanarak GABA'nın reseptöre bağlanmasını engellediği ve GABA blokajını gerçekleştirdiği bildirilmiştir (148). Bicuculline, GABA_A reseptörünün iyi bilinen bir blokeridir ve asetilkolinesteraz üzerinde inhibe edici etkiye sahiptir. Çalışmamızda kullanılan ve literatürde bildirilen Bicuculline Methiodide (BMI), Bicuculline'in diğer suda çözünen bileşiklerine göre konvülzan etki göstermemesi nedeniyle de GABA_A reseptörü antagonizması için en uygun antagonist olduğu rapor edilmiştir (148). Bicuculline uyguladığımız grupta, kas GABA seviyesindeki artışın kontrol grubuna göre yüksek seviyelerde bulunmasının nedeninin, BMI'nın kas dokusunda GABA'nın iyonotropik reseptörüne bağlanması ve bu nedenle dokuda serbest GABA seviyesini arttırdığını düşünmekteyiz.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, asetilkolinin ve BMI'nın nikotinik asetilkolin reseptörlerini aktive edebileceğini göstermektedir (149). Wang ve ark., yaptıkları çalışmada, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonunun, TNF- α sentezini inhibe edip, IL-10 salınımını artırarak inflamatuvar cevabı azalttığını göstermektedir (150). Bunun yanında, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonunun, NO ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde bir azalma ile ilişkili olduğu da bildirilmektedir (151,152). Bicuculline methiodide ile sitokinlerin değişimini inceleyen bir çalışmada, Bicuculline methiodide'in çekal ligasyon ve perforasyondan sonra koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür. TNF- α 'nın neonatal sıçan hepatositlerinde serbest radikallerin üretimini tetikleyip, oksidatif hasarı arttırdığı bildirilmektedir (153). Bu aktivite, TNF- α ve IL-1 β dahil olmak üzere birçok up-regülatör uyaran tarafından pozitif olarak ve IL-10 gibi pro-inflamatuvar sitokinler tarafından negatif olarak kontrol edilir (154,155).

Çalışmamızda, Bicuculline methiodide'in LPS ile sepsis oluşturulan grupta beyin ve kas dokusunda proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10'un düzeylerini inceledik. Bicuculline ve LPS+Bicuculline gruplarının TNF- α seviyeleri kontrol grubu ile yakınlık göstermektedir. Sepsisli grupta ise TNF- α seviyelerinin total beyin dokusunda arttığını ancak, istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemledik ($p>0.05$). TNF- α 'nın 90. dk'da pik yaptığı ve yarılanma ömrünün kısa olduğu bilinmektedir. Bunun yanında uzun süreli sepsis modellerinde anti-inflamatuvar yolaklar gibi çok sayıda yolağı uyarak TNF- α konsantrasyonunun azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (156). Bu durum bizim bulgularımızdaki artışın anlamlı olmamasını açıklamaktadır. IL-10 seviyesinin ise sepsisli grupta diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak azaldığını bulduk ($p<0.05$). Diğer deney gruplarımız kontrol grubumuzla benzerlik göstermektedir. IL-10 seviyesindeki azalmanın TNF- α 'nın başlattığı inflamatuvar yolağın bir göstergesi olarak literatürlerde de raporlanmıştır (157).

NF- κ B yolu, sitokin üretiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynasa da, BMI'nın, NF- κ B yolunu kullanmak yerine nikotinik asetilkolin reseptörünün aktivasyonunu indükleyerek proinflamatuvar sitokin üretimini azaltabileceği görüşü yapılan çalışmalarda desteklenmiştir (158). Bununla birlikte, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin sepsiste BMI'nın antiinflamatuvar etkisi ile ilişkili olabileceği

bildirilmektedir (150). Başka bir çalışma da ise BMI'nın nikotinik α -7 reseptörleri üzerinden pro-inflamatuvar sitokin salınımı inhibe ettiği ileri sürülmektedir (137,149).

İskelet kas dokusu, vücut kütlesinin % 50-60'ını oluşturur ve sistemik inflamasyondan yüksek oranda etkilenir. Kas hasarı ve yıkımı, sepsisin ciddi bir komplikasyonudur. İskelet kasında sepsis sonucu gelişen fonksiyon bozukluğundan sorumlu mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Pro-inflamatuvar sitokinlerin, reaktif oksijen türleri ve siklooksijenazlar, ubiquitin-proteazom sistemini aktive ederek iskelet kası proteolizine neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (159,160). Sepsis sonucu oluşan kas hasarı sitokinlerin bölgesel aktivasyonu, serbest radikal oluşumu, kaspazları artırarak düzenlemesi ve protein sentezindeki azalmayla birlikte, artmış proteolitik yanıtı içerir (159). Shindoh ve ark. yaptığı çalışmada, endotoksinin in vivo uygulamasından sonra diyafragma kasında TNF- α ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir (161). Farklı bir çalışmada da diyafragmada TNF- α 'nın artışı ile lipopolisakkaride yanıt olarak hem diyafragma hem de bacak kasları için in vivo ve in vitro pro-inflamatuvar sitokin mRNA'larının ve protein düzeylerinin artırarak düzenlediğini rapor etmişlerdir, Bu da solunum kaslarının proinflamatuvar yanıtlara yatkın olabileceğini düşündürmektedir. Bu veriler, sepsiste sistemik sitokin cevabının kasta pro-inflamatuvar sitokinlerin lokal amplifikasyonu ile sonuçlandığını kanıtlar. Bu verilere ek olarak, pro-inflamatuvar sitokinlerin iskelet kası zayıflığına neden olduğunu bildiren in vivo ve in vitro pek çok deneysel çalışma bulunmaktadır. TNF-a üreten tümörlerin implantasyonu, bacak kas sisteminde atrofiyi indükler (162).

Çalışmamızda kas dokusu pro-inflamatuvar sitokin değerlerinden TNF- α 'da anlamlı bir artış görülürken ($p<0.05$), anti-inflamatuvar IL-10 seviyelerinde ise anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0.05$). Bu bulgular beyin dokusundan elde ettiğimiz bulgularla benzer yöndedir. Ancak TNF- α 'nın kas dokusundaki anlamlı artışının miyofibriler proteinlerin sepsise daha duyarlı olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. LPS+Bicuculline grubunda TNF- α , IL-10 sitokin değerlerinin sepsisli grupta azaldığını gözlemledik. Bu durum, Bicuculline'in GABA_A iyonotropik reseptörlerini bloklaması ve asetilkolinesterazı inhibe ederek inflamatuvar süreci bloke etmesi ile açıklanabilir. Endotoksinle tedavi edilen gönüllülerde yapılan çalışmalarda, alfa-7 nikotinik ACh reseptörü agonisti GTS-21, sitokin seviyelerini azalttığı bildirilmiştir. Kolinerjik nöronların sistemik inflamasyona özellikle duyarlı olduğunu

bildiren çalışmalar bulunmaktadır (54,163). Bu bulgular çalışmalarımızla paralellik göstermektedir. Asetilkolinesteraz inhibisyonuna sahip olduğu bilinen Bicuculline methiodide'in kolinerjik yolakları uyarması sonucu iyi bir antiinflamatuvar ajan olabileceği fikri ileri sürülmüş ve çalışmalarla desteklenmiştir (137,149,164-166).

Sepsiste artan ROS üretimi beyin ve kas dokusunda yıkıma yol açmakta nöropati ve miyopatiye neden olmaktadır. Sepsiste lipid peroksidasyonu ile yapılan çalışmalarda tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri analiz edilmiştir ve artan MDA seviyelerinin kan beyin bariyerinin bozulması gibi etkiler gösterdiği raporlanmıştır (167). Çalışmamızda septik grupta beyin dokusunda MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını gözlemledik ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bunun yanında diğer deney gruplarındaki değerler kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda sepsis oluşturulmuş sıçanlarda MDA değerlerinin 6. saatten itibaren korteks, hipokampus ve serebellumda düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Ancak bu artış total beyin dokusuna yansımamıştır (113-115). Bulgularımız literatürdeki bilgilerle paralellik göstermektedir. Kas dokusunda ise MDA seviyelerinde sepsis oluşturulan grupta kontrol, Bicuculline ve LPS+Bicuculline gruplarına göre ileri derecede arttığı görülmektedir ($p<0.01$). MDA seviyelerinin sepsis oluşturduğumuz grupta kas dokusunda anlamlı artışın beyin dokularında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışı ve Bicuculline uygulanan grupların kas ve beyinde farklı cevaplar oluşturması, beyin dokusunun kas dokusuna göre kendi immünitesini de kullanarak lipid peroksidasyonunu daha çok tolere etme yönünde olabilir.

Beyin hasarının kantitatif ölçümünde kullanılan nöron spesifik enolaz (NSE) seviyelerinin klinikte kardiyak arrest, septik şok, beyin travması, nöroendokrin tümörler, malignite gibi olgularda yüksek serum seviyeleri bildirilmiştir (119-121). Yapılan çalışmalarda, yoğun bakım ünitelerindeki sepsisli hastalarda NSE düzeylerinin klinik gidişi ön görmede kullanılabileceği ve yüksek hassasiyet ve spesifite gösterdiği bildirilmiştir (168). Yao ve ark., sepsisli olup beraberinde ensefalopati bulgusu olan hastalar ile sepsisli olup ensefalopatinin gelişmediği hastalar arasında yaptığı çalışmada, NSE ve S-100 β düzeylerinin septik ensefalopatisi olan hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir (169). Çalışmamızda, sepsis oluşturduğumuz grupta NSE seviyelerinin diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak arttığını gözlemledik ($p<0.01$) Çalışmamızdaki bulgular literatürü destekler özelliktedir.

Non-invaziv olarak total beyinde elektriksel aktivite kayıtlarına baktığımızda, septik sıçanlarımızdan hafif antestezi altında non-fokal epileptik dalga benzeri kayıtları elde ettik. Gruplar arası dalga amplitüdlerinin minimum-maksimum oranlarına baktığımızda, LPS grubunda diğer gruplara göre ileri derecede anlamlılık saptadık. Diğer deney grupları ise kontrol grupları ile benzer dalga özelliği ve minimum-maksimum oranı izlenmiştir. Bicuculline methiodide uyguladığımız grubumuzda ise herhangi bir konvülzan dalga kaydetmemiş olmamız literatürle uyumlu olarak diğer GABA antagonistleri ve Bicuculline türevlerine göre GABA blokajında uygun bir ajan olabileceğini desteklemektedir.

Nörotransmitterin sinaptik aralığa salınması ve taşınmasında, sinaptik terminaller için spesifik bir glikoprotein olan sinaptofizin antikoru aracılığıyla yaptığımız immunofloresan boyamada, beyin dokusunda sepsisli grupta diğer gruplardaki beyin dokularına göre az miktarda tutulum gözlemledik. Bu durum sepsisli grupta nörotransmitter regülasyonunun bozulduğunu göstermektedir. Kas dokusunda ise sinaptofizin antikorunun sepsisli grupta beyin dokusuyla benzer olarak tutulumun az olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar sepsisli sıçanlarda sinirden kasa iletinin de etkilendiğini göstermektedir. Bicuculline ve LPS+Bicuculline gruplarında sonuçların kontrol grubuyla benzer olduğunu gözlemledik. Bu durum Bicuculline'in sepsiste bozulan nörotransmitter regülasyonunda olumlu yönde etkili olduğunu göstermektedir.

S100- β hücre içi enzim aktivitesini düzenleyebilir ve beyinde nöronal hasarı göstermek için kullanılan belirteçlerden biridir. Yapılan çalışmalarda, sepsis, beyin travması, serebral inme, hipoksik iskemi ve ensefalopatide S100- β 'nın serum değerlerinde artış bildirilmiştir (120-124). S100- β salgılanması ile ilgili kesin mekanizma tam olarak açıklanmamıştır, ancak nöral doku hasarına neden olabileceği ve oluşan oksidatif stres ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (123,124).

Çalışmamızda, sepsisli grupta S100 β antikoru ile boyanan hasarlı hücre sayısının, canlı nöronları boyayan NeuN antikoru ile boyanan hücre sayısına oranladığımızda, bu oranın arttığını gözlemledik. Bulgularımız LPS'nin nöronal hasara neden olduğunu ve Bicuculline'in ise bu hasarı azalttığını göstermektedir (120, 123, 169).

Sonuç olarak, GABA_A antagonisti olan ve Asetilkolinesteraz inhibisyonuna neden olduğu bilinen Bicuculline Methiodide'in, lipopolisakkarid uygulaması ile sepsis oluşturulmuş deney hayvanlarında gözlemlenen nörotransmitter dengesinin bozulması, pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinde artış, anti-inflamatuvar sitokin seviyelerinde azalma, lipid peroksidasyon seviyelerindeki artış gibi inflamatuvar süreci iyileştirici yönde bir ajan olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak mekanizmayı açıklamak için detaylı çalışmalar gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Geroulanos S and Douka ET. Historical perspective of the word sepsis. *Intensive Care Med* 2006; **32**(12): 2077.
2. Botero JSH, Pérez MCF. An Ongoing and Significant Challenge. İçinde Luciano Azevedo, editor. *The History of Sepsis from Ancient Egypt to the XIX Century, Sepsis*. InTech, DOI: 10.5772/51484.
3. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; **315**(8): 762-774.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. 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**: 1644–1655.
5. Berry M, Patel BV, Brett SJ. New Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock: Implications for Treatment Strategies and Drug Development? *Drugs* 2017; **77**(4): 353-361.
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. SCCM/ESCIM/ACCP/ATP/SIS. 2001 SCCM/ESCIM/ACCP/ATP/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003; **31**(4): 1250–1256.
7. Brunn GJ, Platt JL. The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends Mol Med* 2006; **12**(1): 10-6.
8. Singh S, Evans TW. Organ dysfunction during sepsis. *Intensive Care Med* 2006; **32**(3): 349-60. Epub 2006 Feb 11. PubMed PMID: 16474954.
9. Orsini J, Mainardi C, Muzylo E, Karki N, Cohen N, Sakoulas G. Microbiological profile of organisms causing bloodstream infection in critically ill patients. *J Clin Med Res* 2012; **4**(6): 371-377.

10. Shehab El-Din EM, El-Sokkary MM, Bassiouny MR, Hassan R. Epidemiology of Neonatal Sepsis and Implicated Pathogens: A Study from Egypt. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 509484.
11. National Center For Health Statistics. DOI: <http://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db62.htm>
12. Reinhart K, Daniels R, Machado FR. World Sepsis Day Steering Committee and the Global Sepsis Alliance Executive Board. The burden of sepsis: a call to action in support of World Sepsis Day 2013. *Rev Bras Ter Intensiva* 2013; 25(1): 3-5.
13. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; **29**: 1303–10.
14. Elixhauser A, Friedman B, Stranges E. Septicaemia in US Hospitals. Agency for Healthcare Research and Quality. *Statistical Brief* 2016; **122**.
15. Torio CM, Andrews RM. National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) *Statistical Briefs* 2013; **160**.
16. 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**(16): 1546-54.
17. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Milwaukee Initiative in Critical Care Outcomes Research Group of Investigators. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest* 2011; **140**(5): 1223-1231.
18. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**(12): 862–874.
19. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 2014; **5**(1): 66–72.
20. Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Clin* 2009; **25**(4): 677-702.
21. Andrades ME, Morina A, Spasic S, Spasojević I. Bench-to-bedside review: sepsis—from the redox point of view. *Crit Care* 2011; **15**(230): 1–12.

22. Jay K. Oxidative stress in sepsis: a redox redux. Kolls Children's Hospital of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. *J Clin Invest* 2006; **116**: 860–863.
23. Zaph C, Troy AE, Taylor BC, et al. Epithelial cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 2007; **446**: 552–556.
24. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, et al. Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J Leukoc Biol* 2008; **83**: 1009–1018.
25. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; **348**: 138–150.
26. Corrigan JJ, Ray WL, May N. Changes in the blood coagulation system associated with septicemia. *N Engl J Med* 1968; **279**: 851–856.
27. Beller FK. The role of endotoxin in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Diath Haemorrh Suppl* 1969; **36**: 125–149.
28. Corrigan JJ, Jordan CM. Heparin therapy in septicemia with disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med Shock* 1970; **283**: 778–782.
29. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* 2002; **195**: 781–788.
30. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; **405**: 458–462.
31. Altavilla D, Guarini S, Bitto A, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kappaB activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Shock* 2006; **25**: 500–506.
32. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2006; **203**: 1623–1628.
33. Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; **421**: 384–348.
34. Wang H, Liao H, Ochani M, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 2004; **10**: 1216–1221.
35. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007; **449**: 721–725.

36. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 1987; **38**: 417-432.
37. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 635-700.
38. Guan Z, Breazeale SD, Raetz CR. Extraction and identification by mass spectrometry of undecaprenyl diphosphate-MurNAc-pentapeptide-GlcNAc from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 2005; **345**: 336-339.
39. Girard R, Pedron T, Uematsu S, Balloy V, Chignard M, Akira S, Chaby R. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci* 2003; **116**: 293-302.
40. Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* 1988; **57**: 505-518.
41. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 36-46.
42. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**: 8-14.
43. Ernst RK, Guina T, Miller SI. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* 2001; **3**: 1327-34.
44. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, Miller SI. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 1999; **286**: 1561-1565.
45. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; **229**: 869-871.
46. Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 1988; **263**: 13479-81.
47. Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, Adams J, Griffith OW, Levi R, Lodato RF. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 3629-3632.

48. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, et al.; ACCESS Study Group. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013; **309**: 1154-1162.
49. Mendez MF: Delirium. İçinde Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, et al., editors. *Neurology in Clinical Practice*. Boston, Butterworth-Heinemann, Volume 1. Second Edition. (Eds). 1996, pp 29–38.
50. Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, et al: Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1990; **18**: 801–806.
51. Tran DD, Groeneveld AAJB, van der Meulen J, et al: Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 1990; **18**: 474–479.
52. Pine RW, Wertz MJ, Lennard ES, et al: Determinants of organ malfunction or death in patients with intra-abdominal sepsis. *Arch Surg* 1983; **118**: 242–249.
53. Young GB, Bolton CF, Austin TW, et al: The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med* 1990; **13**: 297–304.
54. Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy? *Braz J Psychiatr* 2014; **36**(3): 251-258.
55. Bleck TP, Smith MC, Pierre-Louis SJ-C, et al. Neurologic complications of critical medical illnesses. *Crit Care Med* 1993; **21**: 98–103.
56. Pendlebury WW, Perl DP, Munoz DG: Multiple microabscesses in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1989; **48**: 290–300.
57. Estrada RV, Moreno J, Martinez E, et al: Pancreatic encephalopathy. *Acta Neurol Scand* 1979; **59**: 135–139.
58. Goris RJA: Mediators of multiple organ failure. *Intensive Care Med* 1990; **16**: 192–196.
59. Perry VH, Andersson PB, Gordon S: Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci* 1993; **16**: 268–273.
60. Andersson PB, Perry VH, Gordon S: Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *J Exp Med* 1992; **176**: 255–259.

61. Papadopoulos MC, Moss RF, Lamb FJ, et al. Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex. *Clin Sci* 1999; **96**: 461–466.
62. Jeppsson B, Freund HR, Gimmon Z, et al. Blood-brain barrier derangement in sepsis: Cause of septic encephalopathy? *Am J Surg* 1981; 141:136–14.
63. Corday E, Williams JH Jr. Effect of shock and of vasopressor drugs on the regional circulation of the brain, heart, kidney, and liver. *Am J Med* 1960; **29**: 228–241.
64. Maekawa T, Fujii Y, Sadamitsu D, et al: Cerebral circulation and metabolism in patients with septic encephalopathy. *Am J Emerg Med* 1991; **9**: 139–143.
65. Fink M: Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesth Scand* 1997; **110**: 87–95.
Tsacopoulos M, Magistretti PJ: Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 1996; **16**: 877–885.
66. Janzer RC, Raff MC: Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987; **325**: 253–257.
67. Chao CC, Hu S, Molitor TW, et al. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 1992; **149**: 2736–2274.
68. 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. *Arch Surg* 1986; **121**: 209–216.
69. Evans OB, Parker C, Haas R, et al. Inborn errors of metabolism of the nervous system: Disorders of phenylalanine metabolism. İçinde Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, et al (Eds). *Neurology in Clinical Practice*. Volume 2. Second Edition. Boston: Butterworth-Heinemann;1996, pp 1495–1498.
70. Freund HR, Ryan JA, Fischer JE: Amino acid derangements in patients with sepsis: Treatment with branched chain amino acid infusions. *Ann Surg* 1978; **118**: 423–430.
71. Hossmann KA: Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; **36**: 557–565.
72. Jones EA, Weissenborn K: Neurology and the liver. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; **63**: 279–293.
73. Coyle JT, Puttfarcken P: Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; **262**: 689–695.

74. Butterworth RF: Hepatic encephalopathy and brain edema in acute hepatic failure: Does glutamate play a role? *Hepatology* 1997; **25**: 1032–1033.
75. Khan J, Harrison TB, Rich MM. Mechanisms of neuromuscular dysfunction in critical illness. *Crit Care Clin* 2008; **24**: 165–177.
76. Latronico N, Guarneri B. Critical illness myopathy and neuropathy. *Minerva Anesthesiol* 2008; **74**: 319–323.
77. Bolton CF. The discovery of critical illness polyneuropathy. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 2008; **42**: 66–67.
78. Angel MJ, Bril V, Shannon P, et al. Neuromuscular function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *Can J Neurol Sci* 2007; **34**: 427–432.
79. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 2017; **39**(5): 517-528.
80. Burkovskiy I, Sardinha J, Zhou J, Lehmann C. Cytokine release in sepsis. *Adv Biosci Biotechnol* 2013; **4**: 860-865.
81. Raina Devi Ramnath, Siaw Weing, Min He, Jia Sun, Huili Zhang, Manmish Singh Bawa, Madhav Bhatia. Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases. *Journal of Organ Dysfunction* 2009; **2**(2): 80-92.
82. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet infectious diseases*. 2013; **13**(3): 260-268.
83. Gomes AP, Miguel PSB, Alves DLS, Inoue VH, de Paiva Oliveira A, et al. Pro-Inflammatory Cytokines in Sepsis: Biological Studies and Prospects From In Silico Research. *Biol Syst Open Access* 2016; **5**: 158.
84. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; **77**(1): 110-117.
85. Hamburger T, Broecker-Preuss M, Hartmann M, Schade FU, Groot H, Petrat F. Effects of glycine, pyruvate, resveratrol, and nitrite on tissue injury and cytokine response in endotoxemic rats. *Journal of Surgical Research* 2013; **183**: 7-21.
86. Riedemann NC, Guo RF, Hollmann TJ, Gao H, Neff TA, Reuben JS, Speyer CL, Sarma JV, Wetsel RA, Zetoune FS, Ward PA. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J* 2004; **18**(2): 370-372.

87. Gentile LF, Cuenca AG, Vanzant EL, Efron PA, McKinley B, Moore F, Moldawer LL. Is there value in plasma cytokine measurements in patients with severe trauma and sepsis? *Methods* 2013; **61**(1): 3-9.
88. William E, Paul Robert A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994; 76: 241-251.
89. Olz RW, Fisher SK. Synaptic Transmission. İçinde Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
90. Vito Di Maio. Regulation of information passing by synaptic transmission: A short review. *Brain Research* 2008; **1225**: 26-38.
91. Wynn TA. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**(5): 271-282.
92. Petroff OA. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 2002; **8**(6): 562-573.
93. Olney JW, Collins RC, Sloviter RS. Excitotoxic mechanisms of epileptic braindamage. *Adv Neurol* 1986; **44**: 857-77.
94. Bhargava R, Dabbs DJ. *Immunohistology of Metastatic Carcinomas of Unknown in Diagnostic Immunohistochemistry* (Third Edition), 2011.
95. McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(10): 4760-4764.
96. Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J* 1986; **5**(3): 535-541.
97. Olsen RW, DeLorey TM. GABA Receptor Physiology and Pharmacology. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
98. Adriana Pétriz, Daniel Reyes-Haro, María Alejandra González-González, Ricardo Miledi, and Ataúlfo Martínez-Torres. GABA ρ subunits confer a bicuculline-insensitive component to GFAP $^{+}$ cells of cerebellum. *PNAS* 2014; **111** (49): 17522-17527.

99. Curtis DR, Johnston GAR, Game GJA, Mc Culloch RM. Central action of bicuculline. *J Neurochem* 1974; **23**: 605-606.
100. Shank RP, Pong SF, Freeman, AR, Graham, LT. Bicuculline And Picrotoxin As Antagonists Of γ -Aminobutyrate And neuromuscular inhibition in the lobster, *Brain Research* 1974; **72**: 71-78.
101. Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 2008; **56**(1): 141-148.
102. Takeuchi A, Onodera K. Effect of bicuculline on the GABA receptor of the crayfish neuromuscular junction, *Nature New Biol* 1972; **236**: 55-56.
103. Svenneby G, Roberts E. Bicuculline and N-methylbicuculline-competitive inhibitors of brain acetylcholinesterase. *J Neurochem* 1973; **21**: 1025-1026.
104. Curtis, DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GAR. Bicuculline and central GABA receptors. *Nature* 1970; **228**: 676-677.
105. Johnston GAR, Mitchell JF. The effect of bicuculline, metrazol, picrotoxin, and strychnine on the release of [3 H]GABA from rat brain slices. *J Neurochem* 1971; **18**: 2441-2446.
106. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao. Upregulation of reactive oxygenspecies generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003; **20**: 208–212.
107. Boueiz A, Hassoun PM. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res* 2009; **77**: 26–34.
108. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; **97**: 1634–1658.
109. Esen F, Erdem T, Aktan D, Orhan M, Kaya M, Eraksoy H, Cakar N, Telci L. Effect of magnesium sulfate administration on blood-brain barrier in a rat model of intraperitoneal sepsis: a randomized controlled experimental study. *Crit Care* 2005; **9**: R18–23.
110. Sener G, Toklu H, Ercan F, Erkanli G. Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol* 2005; **5**: 1387–1396.

111. Babincova M, Bacova Z, Machova E, Kogan G. Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: comparative analysis. *J Med Food* 2002; **5**: 79–83.
112. Takeda K, Shimada Y, Okada T, Amano M, Sakai T, Yoshiya I. Lipid peroxidation in experimental septic rats. *Crit Care Med* 1986; **14**: 719–23.
113. Takezawa J, Taenaka N, Nishijima MK, Hirata T, Okada T, Shimada Y, Yoshiya I. Amino acids and thiobarbituric acid reactive substances in cerebrospinal fluid and plasma of patients with septic encephalopathy. *Crit Care Med* 1983; **11**:876–879.
114. Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kacmaz A, Tilki M, Yegen BC. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* 2005; **35**: 52–59.
115. Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med* 2006; **34**: 886–889.
116. Bronzino, J. D. Principles of electroencephalography. İçinde Bonzino JD, editors. *The biomedical engineering handbook*. Florida: CRC Press; 1995. pp. 201–212.
117. Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience* 2009; **3**(31): 1–11.
118. Lopes da Silva, Fernando. EEG: Origin and measurement. EEG-fMRI: Physiological Basis, Technique, and Applications. 2010; 19-38.
119. Zhou J, Lei L, Shi Y, Wang J, Jiang H, Shen L, et al. Serum concentrations of NSE and S100B in spinocerebellar ataxia type 3/ Machado-Joseph disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2011; **36**(6): 504-10.
120. Isgrò MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol* 2015; **867**: 125-43.
121. Shinozaki K, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Abe R, et al. S-100B and neuron-specific enolase as predictors of neurological outcome in patients after cardiac arrest and return of spontaneous circulation: a systematic review. *Crit Care* 2009; **13**(4): R121.

122. Kruijff S, Bastiaannet E, Kobold AC, van Ginkel RJ, Suurmeijer AJ, Hoekstra HJ. S-100B concentrations predict disease-free survival in stage III melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(12):3455-3462.
123. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010; 14(1): R15.
124. Hamed SA, Hamed EA, Zakary MM. Oxidative stress and S-100B protein in children with bacterial meningitis. *BMC Neurol* 2009; 9: 51.
125. Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med* 2000; 28: 3019-3024.
126. Rimmelé T, Payen D, Cantaluppi V, Marshall J, Gomez H, Gomez, et al. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock* 2016; 45(3): 282-291.
127. Jones EA, Schafer DF, Ferenci et al. The neurobiology of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1984; 4: 1235-1242.
128. Baraldi M, Zeneroli ML. Experimental hepatic encephalopathy: Changes in the binding of - γ -aminobutyric acid. *Science* 1982; 216: 427-428.
129. Zeneroli ML, Baraldi M, Pinelli G, et al. Brain receptor changes in portal-systemic encephalopathy in dogs. *Hepatology* 1985; 5: 953.
130. Ferenci P, Schafer DF, Kleinberger G, et al. Serum levels of gamma-aminobutyric acid-like activity in acute and chronic hepatocellular disease. *Lancet* 1983; 2: 811-814.
131. Minuk GY, Winder A, Burges D, Sarjeant EJ. Serum gammaaminobutyric acid (GABA) levels in patients with hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 1985; 37: 171-174.
132. Minuk GY, Sarjeant E, Buchan K. Elevated serum gammaaminobutyric acid (GABA) levels in children with Reye's syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; 4: 528-531.
133. Sweeney VP, Perry TL, Price JDE, et al. Brain - γ -aminobutyric acid deficiency in dialysis encephalopathy. *Neurology* 1985; 35: 180-184.
134. Bassett ML, Mullen KD, Skolnick P, et al. GABA and benzodiazepinereceptor antagonists ameliorate hepatic encephalopathy in arabbit model of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1985; 5: 1032.

135. Banský G, Meier PJ, Ziegler WH, et al. Reversal of hepatic coma by benzodiazepine antagonist (Ro 15-1788). *Lancet* 1985; 1(8441): 1324-1325.
136. Włodarczyk AI, Xu C, Song I, Doronin M, Wu YW, Walker MC, Semyanov A. Tonic GABAA conductance decreases membrane time constant and increases EPSP-spike precision in hippocampal pyramidal neurons. *Front Neural Circuit* 2013; **25**(7): 205.
137. Sallam MY, El-Gowilly SM, Abdel-Galil AG, El-Mas MM. Central GABAA receptors are involved in inflammatory and cardiovascular consequences of endotoxemia in conscious rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2016; **389**(3): 279-288.
138. Jacob A, Brorson JR, Alexander JJ. Septic encephalopathy: inflammation in man and mouse. *Neurochem Int* 2011; **58**(4): 472-476.
139. Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol* 2007; **204**(2): 733-740.
140. Kadoi Y, Saito S. An alteration in the gamma-aminobutyric acid receptor system in experimentally induced septic shock in rats. *Crit Care Med* 1996; **24**(2): 298-305.
141. Serantes R, Arnalich F, Figueroa M, Salinas M, Andres-Mateos E, Codoceo R, et al. Interleukin-1 β enhances GABAA receptor cell-surface expression by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: relevance to sepsis-associated encephalopathy. *J. Biol Chem* 2006; **281**: 14632–14643.
142. Hellstrom IC, Danik M, Luheshi GN, Williams S. Chronic LPS exposure produces changes in intrinsic membrane properties and a sustained IL- β -dependent increase in GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 2005; **15**: 656–664.
143. Rossi S, Muzio L, De Chiara V, Grasselli G, Musella A, Musumeci G, et al. Impaired striatal GABA transmission in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2011; **25**(5): 947-956.
144. Sugiura S, Ishihara Y, Komatsu T, Hagiwara M, Tanigawa N, Kato Y, et al. Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of high-mobility group box 1. *Shock* 2011; **36**: 494–500.

145. Ramírez-Jarquín UN, Tapia R. Chronic GABAergic blockade in the spinal cord in vivo induces motor alterations and neurodegeneration. *Neuropharmacology* 2017; **117**: 85-92.
146. Wang DS, Zurek AA, Lecker I, Yu J, Abramian AM, Avramescu S, et al. Memory deficits induced by inflammation are regulated by $\alpha 5$ -subunit-containing GABAA receptors. *Cell Rep* 2012; **2**: 488-96.
147. Winder TR, Minuk GY, Sargeant EJ, Seland TP. gamma-Aminobutyric acid (GABA) and sepsis-related encephalopathy. *Can J Neurol Sci* 1988; **15**(1): 23-25.
148. Olsen RW, Ban M, Miller T. Studies on the neuropharmacological activity of bicuculline and related compounds. *Brain Res* 1976; **102**: 283–299.
149. Hsu DZ, Liu MY. Bicuculline methiodide attenuates hepatic injury and decreases mortality in septic rats: role of cytokines. *Shock* 2004; **22**(4): 347-50.
150. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; **421**:384–388.
151. Shimohama S, Akaike A, Kimura J: Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation. *Ann NY Acad Sci* 1996; **777**: 356–361.
152. Li Y, King MA, Meyer EM. $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated protection against ethanol-induced oxidative stress and cytotoxicity in PC12 cells. *Brain Res* 2000; **861**:165–167.
153. New KJ, Eaton S, Elliott KRF, Spitz L, Quant PA. Effect of lipopolysaccharide and cytokines on oxidative metabolism in neonatal rat hepatocytes. *J Pediatr Surg* 2001; **36**: 338–340.
154. Szabo C, Wu CC, Gross SS, Thiernemann C, Vane JR. Interleukin-1 contributes to the induction of nitric oxide synthase by endotoxin in vivo. *Eur J Pharmacol* 1993; **250**:157–160.
155. Thiernemann C, Wu CC, Szabo C, Perretti M, Vane JR: Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1993; **110**:177–182.

156. Munford RS. Sepsis, severe sepsis and septic shock. İçinde Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005: 906-26.
157. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 2017; **39**(5): 517-528.
158. Loop T, Humar M, Pischke S, Hoetzel A, Schmidt R, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BHJ: Thiopental inhibits tumor necrosis factor α -induced activation of nuclear factor κ B through suppression of IKK kinase activity. *Anesthesiology* 2003; **99**: 360–367.
159. Holecek M, Skopec F, Sprongl L, Pecka M. Protein metabolism in specific tissues of endotoxin-treated rats: effect of nutritional status. *Physiol Res* 1995; **44**: 399-406.
160. Wu L, Tang C, Liu Ms. Altered phosphorylation and calcium sensitivity of cardiac myofibrillar proteins during sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **281**: R408-R416.
161. Shindoh C, Hida W, Ohkawara Y, et al. TNF- α mRNA expression in diaphragm muscle after endotoxin administration. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**:1690–1696.
162. Callahan LA, Supinski GS. Sepsis-induced myopathy. *Critical care medicine* 2009; **37**(100): S354-S367.
163. Kox M, Pompe JC, Gordinou de Gouberville MC, van der Hoeven JG, Hoedemaekers CW, Pickkers P. Effects of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist gts-21 on the innate immune response in humans. *Shock* 2011; **36**: 5-11.
164. Thomsen MS, Mikkelsen JD. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ligands methyllycaconitine, NS6740 and GTS-21 reduce lipopolysaccharide-induced TNF- α release from microglia. *J Neuroimmunol* 2012; **251**: 65-72.
165. Terry AV Jr, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**: 821-827.

166. Streit WJ, Sparks DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. *J Mol Med (Berl)* 1997; **75**:130-138.
167. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygenspecies generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003; **20**: 208–212.
168. Weigand MA, Volkmann M, Schmidt H, Martin E, Bohrer H, Bardenheuer HJ. Neuron-specific enolase as a marker of fatal outcome in patients with severe sepsis or septic shock. *Anesthesiology* 2000; **92**(3): 905-907.
169. Yao B, Zhang LN, Ai YH, Liu ZY, Huang L. Serum S100beta is a better biomarker than neuron-specific enolase for sepsis-associated encephalopathy and determining its prognosis: a prospective and observational study. *Neurochem Res* 2014; **39**(7): 1263-1269.
170. Kruijff S, Bastiaannet E, Kobold AC, van Ginkel RJ, Suurmeijer AJ, Hoekstra HJ. S-100B concentrations predict disease-free survival in stage III melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2009; **16**(12): 3455-3462. Erratum in *Ann Surg Oncol*. 2011;18 Suppl 3:S331.

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
İstanbul Bağıcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 2017/63
Konu : HADYEK/2017-12 nolu Proje
67. Kurul toplantısı

Tarih : 25.04.2017

Sayın, Prof. Dr. Ayşe Şule TAMER
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.

Yürütücüsü olduğunuz “ Sepsis Oluşturulmuş Sıçanlarda Beyin ve Kas Dokusunda İyonotropik GABA Reseptör Blokajının Etkileri ” isimli proje ile ilgili Hastanemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca istenilen düzeltmelere istinaden vermiş olduğunuz 2017-40 sayılı dilekçe incelendi. Alınan karar gereğince projenin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Ayşin SELÇUK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SEPSİS OLUŞTULMUŞ SIÇANLARDA BEYİN VE KAS DOKUSUNDA İYONOTROPİK GABA RESEPTÖR BLOKAJININ ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**3**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

mustafaaltinisik.org.uk

İnternet Kaynağı

%**1**

2

xa.yimg.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

3

www.jneurosci.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

Dur-Zong Hsu. "BICUCULLINE METHIODIDE ATTENUATES HEPATIC INJURY AND DECREASES MORTALITY IN SEPTIC RATS: ROLE OF CYTOKINES", Shock, 10/2004

Yayın

<%**1**

5

pt.scribd.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.mikrobik.net

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	GÜLTEN	Soyadı	ATEŞ ULUÇAY
Doğ.Yeri	BAKIRKÖY	Doğ.Tar.	24/12/1989
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	56803291824
Email	gultenates89@gmail.com	Tel	0535 961 52 99

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi- İstanbul Tıp Fakültesi	-
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi- İstanbul Tıp Fakültesi	2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi- Fen Fakültesi- Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi- Tıp Fakültesi- Fizyoloji AD	2015-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	68,75	
Fransızca	İyi	Orta	Orta	-	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yayınlar:

1. Ozkok E, Yorulmaz H, **Ates G**, Serdaroglu-Ofłazer P, Tamer AS. Effects of prior treatment with simvastatin on skeletal muscle structure and mitochondrial enzyme activities during early phases of sepsis. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Dec 1;7(12):8356-65.
2. Yorulmaz H, Ozkok E, Erguven M, **Ates G**, Aydın I, Tamer S. Effect of simvastatin on mitochondrial enzyme activities, ghrelin, hypoxia-inducible factor 1 α in hepatic tissue during early phase of sepsis. Int J Clin Exp Med. 2015 Mar 15;8(3):3640-50.
3. Ozkok E, Yorulmaz H, **Ates G**, Aksu A, Balkis N, Şahin Ö, Tamer S. Amelioration of energy metabolism by melatonin in skeletal muscle of rats with LPS induced endotoxemia. Physiol Res. 2016 Nov 23;65(5):833-842.

4. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Goksel Demir, İbrahim Ertuğrul Yalçın, **Gulten Ates**, and Sule Tamer, 2016. Investigation of Simvastatin on Micro and Macro Element Levels in Intestinal Tissue for During Early Phase of Sepsis. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11: 452-460.
5. **Gulten Ates**, Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Irfan Aydin and Sule Tamer, 2017. Effects of ghrelin on inflammation and oxidative stress parameters in sepsis-induced liver tissue of rat. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 12: 17-23.
6. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, **Gulten Ates**, Abdullah Aksu, Nuray Balkıs, Sule Tamer. Role of Simvastatin in Endotoxemia-induced Muscle Injury. *Int J Clin Exp Med* 2017;10(4):6883-6889.
7. Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, **Gulten Ates**, Irfan Aydin, Mine Erguven, Sule Tamer. The Impact of Pretreatment with Simvastatin on Kidney Tissue of Rats with Acute Sepsis. *Physiol Int.* 2017 Jun 1;104(2):158-170.
8. Yorulmaz H, Ozkok E, **Ates G**, Tamer S. Investigation of the effectiveness of ghrelin treatment in lung tissue of rats with sepsis. *Bratisl Lek Listy.* 2017;118(10):585-590. doi: 10.4149/BLL_2017_112.
9. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, **Gulten Ates**, Sule Tamer. Ghrelin: Impact on Muscle Energy Metabolism in Sepsis. *Int J Pept Res Ther.* 2018, 24 (2), 259-264.
10. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Engin Kaptan, **Gulten Ates**, Sule Tamer. Therapeutic Effects of Simvastatin on Galectin-3, and Oxidative Stress parameters in Lung Tissue in Endotoxemia. *Bioscience Reports.* 2018, 38:3. doi: 10.1042/BSR20180308.
11. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Goksel Demir, İbrahim Ertugrul Yalcin, **Gulten Ates**, Vakur Olgac, Sule Tamer. Pretreatment of simvastatin on liver trace element levels during endotoxemia. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 2018. doi: 10.1080/13813455.2018.1508234.
12. Hatice Yorulmaz, **Gulten Ates**, Elif Ozkok, Isil Albeniz, Sule Tamer. Effect of Simvastatin on Erythrocyte Membrane Proteins in Endotoxemic Rats. *Archives of Physiology and Biochemistry.* İncelemede.

Uluslar arası Tebliğler:

1. Ates G, Ozkok E, Aydın I, Yorulmaz H, Tamer S. ” Impact of simvastatin on hepatic tissue in lipopolysaccharides treated rats.” 37th International Congress of Physiological Sciences, Birmingham, UK, Vol.37, 765-766.(2013)
2. Yorulmaz H., Ates G., Ozkok E., Albeniz I., Tamer S. “Effect of Simvastatin on erythrocyte membrane proteins in endotoxemic rats.” 37th International Congress of Physiological Sciences, Birmingham, UK, Vol.37, 749-750.(2013)

3. Ozkok E., Yorulmaz H., Ates G., Oflazer P., Tamer S. "Effects of lipopolysaccharide on mitochondrial functions of skeletal muscle in rats." 37th International Congress of Physiological Sciences, Birmingham, UK, Vol.37, 620.(2013)
4. A S. Tamer, E. Ozkok, H. Yorulmaz, G. Ates, P. Oflazer. The effects of Simvastatin on skeletal muscle treated with LPS in rats. Abstracts of the Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society, 27-30 August 2014, Budapest, Hungary. August 2014; 211(697):1–184. (Oral presentation)
5. E. Ozkok, H. Yorulmaz, G. Demir, İ.E. Yalcın, G. Ates, AS. Tamer. The effects of treatment with Simvastatin on liver ghrelin, HIF-1 alpha and trace elements in endotoxemic rats. Abstracts of the Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society, 27-30 August 2014, Budapest, Hungary. August 2014; 211(697):1–184. (Oral Presentation)
6. Elif Ozkok¹, Hatice Yorulmaz², Gulden Ates³, A. Sule Tamer³. Investigation of the Effectiveness of Ghrelin Treatment on Oxidative Parameters in Lung Tissue of Septic Rats 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress (09-12 september 2014-ISPARTA) .
7. Hatice Yorulmaz¹, Elif Ozkok², Gulden Ates ³, A.Sule Tamer³. Evaluation of Ghrelin Levels in Lung Tissue of Septic Rats with Ghrelin Treatment. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress (09-12 september 2014-ISPARTA)
8. Gulden Ates Ulucay, Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Irfan Aydin, Sule Tamer. Ghrelin: as an anti-inflammatory therapeutic agent in septic rats. 8. International Sepsis Symposium. Sepsis 2014 Paris, France. 3-5 December 2014. Critical Care 2014; 18(2):1-28.
9. Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Gulden Ates, Irfan Aydin, Sule Tamer. In Early Phases of Sepsis: The Effects of Simvastatin on Mitochondrial Enzyme Activities in Kidney Tissue in Rats. 8. International Sepsis Symposium. Sepsis 2014 Paris, France. 3-5 December 2014. Critical Care 2014; 18(2):37.
10. Gulden Ates, Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Sule Tamer. The Effects of Ghrelin on oxidative stress parameters in Lipopolysaccharide induced sepsis of Rats. FEPS 26-29 August 2015-Lithuania- Kaunas, Acta Physiologica –supplement.
11. Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Gulden Ates, Abdullah Aksu, Nuray Balkis, Sule Tamer. Evaluation of the effects of simvastatin on energy metabolism in muscle tissue during early phase of sepsis. FEPS 26-29 August 2015-Lithuania- Kaunas, Acta Physiologica supplement.
12. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Göksel Demir, İ. Ertugrul Yalcin, Gulden Ates, Sule Tamer. Protective effect of Simvastatin on Trace Minerals in Intestinal Tissue

during Early Phase of Sepsis. Congress of Endothelium Damage in Healt and Disaese. Kopenhag- Denmark 2015. Acta Pysiologica-Supplement.

13. Gulten Ates Ulucay, Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Goksel Demir, Ibrahim Ertugrul Yalcin, Sule Tamer. The Effects of Ghrelin on oxidative stress parameters in Lipopolysaccharide induced sepsis of Rats. FEPS 28 June-01 July 2016- Paris-France- Acta Physiologica –Supplement.
14. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Gulten Ates Ulucay, Abdullah Aksu, Nuray Balkis, Sule Tamer. Effects of Melatonin on Neuromuscular Degeneration in Early-phase Sepsis. FEPS 28 June-01 July 2016- Paris- France- Acta Physiologica –Supplement.
15. Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Gulten Ates, Onder Sahin, Sule Tamer. Melatonin's role in skeletal muscle of rats with LPS induced endotoxemia. Physiology 2016- Dublin/Ireland.
16. Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Gulten Ates, Sule Tamer. Influence of Simvastatin on Apoptotic and Inflammatory Process in Septic Rats 19. APCCM, Bangkok, 2016.
17. Hatice Yorulmaz, Gulten Ates Ulucay, Elif Ozkok, Sule Tamer. Melatonin's Impact on Lung Tissue of Rats With LPS Induced Endoxemia. VI. International Congress of Molecular Medicine 22-25 May 2017 Istanbul University Congress and Cultural Center.
18. Hatice YORULMAZ, Gulten ATES ULUCAY, Engin KAPTAN, Elif OZKOK, Sule TAMER. The effects of Simvastatin on Galectin-3 and TBARS in Lung Tissue during Endotoxemia. Federation of Physiological Society (FEPS) 13-15 September 2017- Vienna/ Austria.
19. Gulten ATES ULUCAY, Hatice YORULMAZ, Gokcen UNVERENGIL, Elif OZKOK, Sule TAMER. Ghrelin Prevents Skeletal Muscle Damage in Septic Rats. Federation of Physiological Society (FEPS) 13-15 September 2017- Vienna/ Austria.
20. Gulten Ates Ulucay, Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Vakur Olgac, Sule Tamer. Ghrelin's effects on Levels of Metalloproteinases and Inflammatory parameters in septic intestinal tissue. Europhysiology, 14-16 September 2018. London, England.
21. Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Gulten Ates Ulucay, Vakur Olgac, Sule Tamer. Anti-oxidant and Anti-inflammatory effects of Melatonin on TBARS, GSH-Px, SOD, and YKL-40 in Endotoxemic Lung Tissue of Wistar albino Rats. Europhysiology, 14-16 September 2018. London, England.

Ulusal Tebliğler:

1. Yorulmaz H., Özkök E., Ates G., Demir G., Yalçın İ.E., Tamer Ş. "Simvastatinin endotoksemik sıçanlarda farklı dokulardaki element düzeylerine etkileri." 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, Cilt:1, 113. (2013)

2. Tamer Ş, Yorulmaz H, Özkök E., Ateş G., Aydın İ. “Simvastatinin Lipopolisakkarid verilen sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokuları üzerine etkileri.” 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, Cilt:1, 41. (2013). (Sözlü Bildiri)
3. Hatice Yorulmaz, Elif Özkök, Gülten Ateş, A. Şule Tamer. Hayvanlarda Ghrelin ve Hif-1 A' nın Farklı Dokulardaki Düzeyleri. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, Cilt:1 (2014).
4. Gülten Ateş Uluçay, Elif Özkök, Hatice Yorulmaz, Ayşe Şule Tamer. Sepsis Oluşturulan Sıçanlarda Simvastatinin Hemoreolojik Etkileri. 6. DETAE GÜNLERİ (23-24 KASIM 2014-İSTANBUL).
5. Elif Özkök, Gülten Ateş Uluçay, Hatice Yorulmaz, Şule Tamer' Sepsis sırasında ekzojen olarak uygulanan ghrelinin akciğer dokusunda apoptozis ve inflamasyon üzerine etkisi.41. Ulusal Fizyoloji Kongresi 9-13 Eylül 2015 Çanakkale Acta Pysiologica-Supplement.
6. Elif Özkök, Gülten Ateş Uluçay, Hatice Yorulmaz, Şule Tamer. Septik Sıçanlarda Oluşan Akut Akciğer Hasarı Üzerine Ghrelin'in Etkileri. 7. DETAE Günleri (9-10 KASIM 2015-İSTANBUL). (Sözlü Bildiri)
7. Gulten Ates Ulucay, Hatice Yorulmaz, Elif Ozkok, Goksel Demir, I. Ertuğrul Yalcin, Sule Tamer. Simvastatinin Endotoksemik Sıçanlarda Histolojik Ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri. 8 ASDETAE Günleri- 2016, İstanbul.
8. Elif Özkök, Hatice Yorulmaz, Gülten Ateş Uluçay, Abdullah Aksu, Nuray Balkıs, Şule Tamer. Melatonin'in Septik Akciğer Dokusunda Enerji Metabolizmasına Yararlı Etkileri. 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Pamukkale, Denizli. 7-10 Eylül 2017.
9. Hatice Yorulmaz, Elif Özkök, Yeşim Bulut, Ökkeş Yılmaz, Gülten Ateş Uluçay, Şule Tamer. Sepsis' li Sıçanlarda Ghrelin'in Yağ Dokusundaki Yağ Asidi Profiline Etkisi. 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Pamukkale, Denizli. 7-10 Eylül 2017.
10. Elif Ozkok, Hatice Yorulmaz, Gulten Ates Ulucay, Vakur Olgac, Sule Tamer. Sepsis oluşturulan Sıçanlarda Melatonin'in Matriks Metalloproteinazlar (MMP), Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri ve İnflamatuvar Parametreler Üzerine Etkileri. 44. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Antalya. 1-4 Kasım 2018.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Müzik, Rock'n roll kültürü, Konser, Enstrümanlar, Felsefe, Kitap, Film, Meditasyon, Resim, Astrobilim.