



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA SEPSİSE BAĞLI ENSEFALOPATİDE ERKEN VE
GEÇ DÖNEMDE RİLUZOLÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Ecz. HALE ZERRİN TOKLU
DOKTORA TEZİ

FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR
Prof. Dr. MERAL KEYER UYSAL
Doç. Dr. LEVENT KABASAKAL

İSTANBUL – 2006

D) TEŞEKKÜR

*Tezimin hazırlanması ve çalışmalarımındaki katkılarından dolayı tez hocam **Prof. Meral Keyer Uysal'a**, ikinci danışmanım **Doç. Dr. Levent Kabasakal'a**, lisansüstü eğitimim boyunca ve tezim sırasında her konuda büyük ilgi ve desteğini gördüğüm İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürü ve İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof. Dr. Mehmet Kaya'ya**, **Dr. Rivaze Kalaycı'ya**, İstanbul Tıp Fakültesi Nöroşiruji Anabilim Dalı'ndan **Uzm. Dr. Tülin Erdem'e**, tez çalışmalarımnda değerli tecrübelerinden yararlandığım Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan **Prof. Dr. Gül Ayanoğlu Dülger'e**, birçok konuda fikirleriyle bana ışık tutan **Doç. Doç. Dr. Sena Sezen'e**, tezimin çeşitli aşamalarında yardımını gördüğüm, M.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan **Doç. Dr. Feriha Ercan**, **Dr. Serap Şirvancı** ve **Araş. Gör. Gözde Erkanlı'ya**, tez çalışmalarım sırasında bana her türlü desteği veren Eczacılık Fakültesi Farmakoloji, Biyokimya ve F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanları ile elemanlarına, **M.Ü. Araştırma Projeleri Başkanlığı'na** ve **aileme** sonsuz teşekkürler...*

II) İÇİNDEKİLER

I) TEŞEKKÜR	ii
II) İÇİNDEKİLER	iii
III) KISALTMALAR	vi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Sepsis	6
4.1.1. Sepsis Patogenezi	9
4.1.2. Septik Ensefalopati	10
4.1.3. Sepsisin Nörolojik Komplikasyonları	11
4.2. Kan-Beyin Bariyeri	12
4.2.1. Genel Özellikleri	12
4.2.2. Sepsis ve Kan-Beyin Bariyeri	13
4.3. Beyin Ödemi	16
4.3.1. Ödemin Sınıflandırılması	16
4.3.2. Sepsis ve Beyin Ödemi	18
4.4. Oksidan Hasar ve Savunma Mekanizmaları	18
4.4.1. Serbest Radikaller ve Oksidan Hasar	18
4.4.2. Serbest Radikallerin Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	21
4.4.2.1. Sepsis ve Oksidan Hasar	21
4.4.3. Endojen Antioksidan Sistem	22
4.4.3.1. Glutasyonun Fizyolojik Olaylardaki Rolü	23
4.4.3.2. Sepsis ve Glutasyon	24
4.5. Glutamat	24
4.5.1. Glutamatın, Sentezi, Salınımı ve Metabolizması	24
4.5.2. Beyin ve Omurilikte Glutamaterjik Aksonların Oluşturduğu Yolaklar	28
4.5.3. Glutamat Reseptörleri	29

4.5.4.	Glutamat Ve Eksitotoksisite	29
4.5.5.	Glutamat Ve Oksidan Hasar	32
4.6.	Riluzol	34
4.6.1.	Farmakokinetik Özellikleri	34
4.6.2.	Riluzolün Etki Mekanizması	35
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	39
5.1.	Deney Hayvanları	39
5.2.	Deney Grupları	39
5.3.	Deneyisel Sepsis Oluşturulması ve İlaçların Uygulanması	40
5.4.	Ölçülen Parametreler	40
5.4.1.	Kilo Takibi	40
5.4.2.	Rektal Ateş	41
5.4.3.	Nörolojik Muayene	41
5.4.4.	Lökosit Sayımı	43
5.4.5.	Beyin Ödemi	43
5.4.6.	Oksidan Hasar ve Savunma	43
5.4.6.1.	MDA	43
5.4.6.2.	GSH	43
5.4.7.	Kan-Beyin Engeli Geçirgenliği	46
5.4.8.	Histolojik İncelemeler	47
5.5.	İstatistiksel Değerlendirme	47
6.	BULGULAR	48
6.1.	Sağkalım	48
6.2.	Kilo	48
6.3.	Rektal Ateş	49
6.4.	Nörolojik Muayene	49
6.5.	Lökosit Sayımı	50
6.6.	Beyin Ödemi	50
6.7.	MDA ve GSH	51

6.7.1.	Erken Dönem	51
6.7.2.	Geç Dönem	52
6.8.	Kan-Beyin Engeli Geçirgenliği	52
6.8.1.	Erken Dönem	52
6.8.2.	Geç Dönem	53
6.9.	Histolojik İncelemeler	54
6.9.1.	Inflamasyon Ve Hücre Hasarı	54
6.9.1.1.	Erken Dönem	54
6.9.1.2.	Geç Dönem	54
6.9.2.	Morfolojik İnceleme	55
7.	TARTIŞMA VE SONUÇ	59
8.	KAYNAKLAR	65
9.	ÖZGEÇMİŞ	78
10.	ETİK KURUL RAPORU	81

III) KISALTMALAR

ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPA	: alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit
ANOVA	: analysis of variance, varyans analizi testi
AQP4	: akuaporin-4
Asp	: aspartat
AT1	: anjiyotensin-1
ATP	: adenzin trifosfat
BDNF	: beyinden türeyen nörotrofik faktör
CM	: kalsiyum kalmodulin
COX	: siklooksijenaz
DNA	: deoksiribonükleik asit
EB	: Evans mavisi
EC	: <i>Escherichia coli</i>
EPSP	: eksitator postsinaptik potansiyel
G6PD	: glukoz-6 fosfat dehidrojenez
GABA	: gama-amino bütirik asit
GABA-T	: GABA transaminaz
GAD	: glutamik asit dekarboksilaz
GCS	: γ -glutamilsistein sentaz
GDNF	: glial hücre kaynaklı nörotrofik factor
Glu	: glutamat
GM- CSF	: granülosit monosit koloni stimüle edici factor
GSH	: glutatyon
GSH-Px	: glutatyon peroksidaz
GSSG	: indirgenmiş glutatyon
İL	: interlökin
ip	: intraperitoneal
IP₃	: inositol trifosfat
iv	: intravenöz
KBB	: kan-beyin bariyeri
L-AP4	: 2-amino-4-fosfopropiyonik asit
L-NAME	: N ^(G) –nitro-L-arjinin metil esteri
LPS	: lipopolisakkarit
LT	: lökotrien
LTP	: uzun süreli potensiyasyon
MDA	: malondialdehid
MODS	: multiorgan disfonksiyonu sendromu
n.	: nükleus
NADPH	: nikotinamid adenin dinükleotid
NGF	: sinir büyüme faktörü
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: nitrik oksit
NOS	: nitrik oksit sentaz
NTS	: nucleus tractus solitarius
PAF	: trombosit aktive edici factor
PARP-1	: poli(ADP-riboz) polimeraz
PARS	: poli(ADP-riboz) sentaz

PGE₂	: prostaglandin E ₂
PGI₂	: prostasiklin
PKC	: protein kinaz C
PLA₂	: fosfolipaz A ₂
PMNL	: polimorf nüveli lökositler
ROM	: reaktif oksijen metabolitleri
RVLM	: rostroventrolateral medulla
s	: saniye
sc	: subkutan
SIRS	: sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOD	: süperoksit dismutaz
SP	: P maddesi
SSS	: santral sinir sistemi
Tau	: taurin
TNF-α	: tümör nekroz faktör-alfa
VEGF	: vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. ÖZET

Sepsis, enfeksiyon odağından uzaktaki organları da etkileyen ve yaygın inflamatuvar cevaba yol açan bir durumdur. Sepsisin altında yatan mekanizmalardan birinin de serbest radikallerin oluşumuna bağlı olarak ortaya çıkan oksidan hasar olduğu düşünülmektedir. Son yıllardaki çalışmalar sepsisin çoklu organ yetmezliği oluşturmalarının reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumundaki artış ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Beyindeki temel eksitatör (uyarıcı) aminoasit olan glutamatın patolojik durumlarda, kan-beyin engeli geçirgenliğindeki artışta ve oksidan hasarın ortaya çıkmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda, glutamat antagonistlerinin, iskemi, sepsis, travma gibi durumlarda yararlı olabileceği gösterilmiştir. Psikotropik, antikonvülsan, hipnotik, anestezik ve nöron koruyucu etkileri olduğu gösterilen, glutamat salınım inhibitörü riluzol, Amyotropik Lateral Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Riluzolün bu etkilerini glutamat salınımını ve striatal sinaptozomlarda γ -amino bütirik asit (GABA) geri alınımını inhibe etmesinin yanısıra, voltaj bağımlı sodyum (Na^+) kanallarını bloke ederek oluşturduğu ileri sürülmektedir. Çalışmamızın amacı nöron koruyucu etkili bir ilaç olan riluzolün sepsise bağlı ensefalopatide olası koruyucu rolünün araştırılmasıdır.

Bu çalışmada sepsis modeli çekal ligasyon ve perforasyon yöntemiyle Sprague Dowley sıçanlarda oluşturulmuştur. Kontrol ve sepsis gruplarına cerrahi işlemten 30 dakika sonra ve idame tedavisi olarak 12 saatte bir serum fizyolojik veya riluzol 6 mg/kg dozunda cilt altı (sc) uygulanmıştır. Riluzolün sepsisin erken (6 saat) ve geç döneminde (48 saat) sağkalım, kilo kaybı, ateş, lökosit sayısı, beyin ödemi, kan-beyin engeli geçirgenliği, oksidan hasar üzerindeki etkileri biyokimyasal ve histolojik olarak araştırılmıştır.

Riluzol 6 mg/kg dozunda sc uygulandığında sepsise bağlı olarak görülen kilo kaybını, ateş artışını, beyin ödemini, kan-beyin engeli geçirgenliğindeki artışı, oksidan hasarı ve beyin hasarını azaltmıştır. Riluzol, sepsiste sağkalım oranını artırmasının yanısıra nörolojik muayene skorunu ve hastalığın seyrini iyileştirmektedir.

Bu alışmanın sonuçları riluzolün sepsise bağlı ensefalopatide beyinde koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: riluzol, glutamat, sepsis, ensefalopati, kan beyin engeli

2. SUMMARY

The Effects Of Riluzole In Early And Late Phase Of Sepsis-Induced Encephalopathy In Rats

Sepsis is a generalized inflammatory response, which involves organ systems remote from the locus of the initial infectious insult. One of the underlying mechanisms of sepsis is thought to be the oxidative damage due to the generation of free radicals. Recent studies have shown that sepsis is associated with enhanced generation of reactive oxygen metabolites, which lead to multiple organ dysfunction.

Glutamate, the major excitatory amino acid in the brain, is known to play an important role in blood brain permeability, brain edema and oxidative damage in pathological conditions. It has previously been shown that glutamate antagonists have beneficial effects in sepsis, ischemia and trauma. Riluzole-a glutamate release inhibitor, has been shown to have psychotropic, anticonvulsant, hypnotic, anesthetic and neuroprotective effects and is used against neurodegenerative diseases such as Amyotrophic Lateral Sclerosis. It has been suggested that riluzol exhibits these effects via the inhibition of glutamate release and GABA uptake in the striatal synaptosomes and blockade of voltage-dependent sodium channels. The aim of our study is to investigate the putative protective effect of riluzole, which is a neuroprotective drug, against sepsis-induced encephalopathy.

In this study sepsis was induced by caecal ligation and puncture in Sprague Dowley rats. Sham operated (control) and sepsis groups received saline or riluzole (6 mg/kg, sc) 30 minutes after the surgical procedure, and every 12 h as continuing treatment. The effect of riluzole on the survival rate, weight loss, fever, leukocyte count, brain edema, blood-brain barrier permeability, oxidative damage and histological observations were evaluated for early (6 hours) and late (48 hours) phase of sepsis.

Riluzol when administered as a sc dose 6 mg/kg, diminishes the sepsis-induced augmentation in weight loss, body temperature, brain edema, increase in blood-brain barrier permeability, oxidative damage and brain injury which is observed

histologically. Besides increasing the survival rate in sepsis, it has also improved neurological examination scores and the prognosis of the disease.

According to the results of this study, riluzole appears to have protective effect of against sepsis-induced encephalopathy.

Keywords: riluzole, glutamate, sepsis, encephalopathy, blood brain barrier

3. GİRİŞ VE AMAÇ

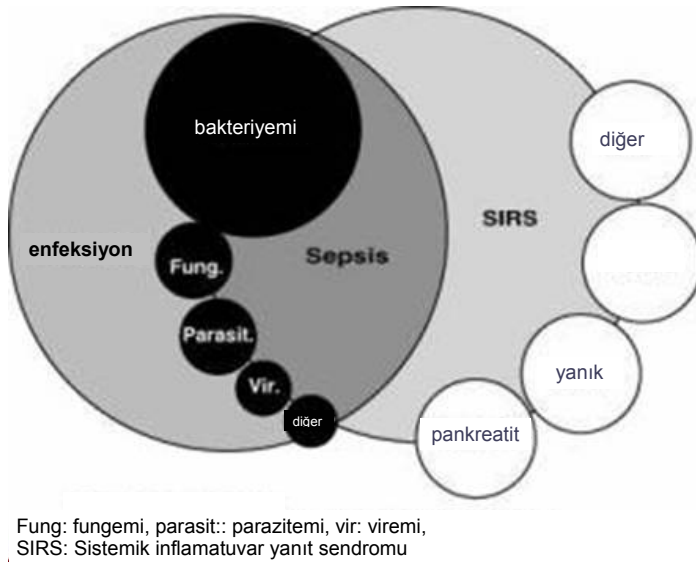
Sepsis, günümüzde hala ciddi bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Pek çok tanı ve tedavi modalitesine rağmen gelinen nokta ne yazık ki hala istenilen düzeylerde değildir. Dolayısıyla tedaviye ışık tutabilecek yeni tedavi yaklaşımları hem problemin giderilmesi, hem de sepsisli hasta için son derece önemlidir (4).

Sepsis vakalarında pek çok organda hasar oluşmaktadır. Ancak mental durum değişikliklerine yol açan septik ensefalopati, özellikle klinik tablonun seyri açısından önemlidir. Sepsise bağlı çoklu organ hasarında pek çok mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir (96). Bunlar arasında serbest radikallerin, nötrofil infiltrasyonunun, sitokin salınımindaki artışın, glutamin-glutamat metabolizmasındaki değişikliklerin septik ensefalopatilerde etkin rolü olduğu bilinmektedir (7, 95). Septik ensefalopatinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın insanda yapılan postmortem bir araştırmada ağır sepsis hastalarında erken dönemde beyin ödemi oluştuğu ve kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin bozulduğu gösterilmiştir (28). Septik ensefalopatide bu mekanizmanın yanısıra aktive olan inflamatuvar yollara bağlı olarak ortaya çıkan oksidan hasar, aminoasit düzeylerindeki ve asit-baz dengesindeki değişikliklerin ve diğer metabolik işlevlerin bozulmasının da rolü vardır (22, 32). Öte yandan eksitator bir aminoasit olan glutamatın salınımını presinaptik olarak inhibe eden riluzol, nöron koruyucu etkisi dolayısıyla günümüzde amyotrofik lateral sklerozun (ALS) tedavisinde onaylanmış tek ilaçtır. Antiglutamaterjik etkinliğinin yanısıra antioksidan, proapoptotik, nörotrofik faktörlerin sentezini artırıcı, protein kinaz C (PKC) inhibisyonu, sodyum ve kalsiyum kanal blokajı ve potasyum kanal aktivasyonu gibi etkileri de bildirilmiştir (31, 90). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda riluzolün çeşitli omurilik, beyin, sinir travma, iskemi, ALS ve Parkinson modellerinde nöron koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (3, 31, 64, 88, 138). Ayrıca travmaya bağlı beyin ödeminde etkili bulunmuştur. Bu nedenle çalışmamızda deneysel sepsis modelinde antioksidan ve nöron koruyucu etkili bir ilaç olan riluzolün kan-beyin bariyeri (KBB) geçirgenliği, oksidan hasar ve beyin morfolojisi üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Sepsis

Sepsis birçok organ ve sistemde hemodinamik değişikliklerle seyreden, acil tedavi edilmesi gereken mortalitesi yüksek bir klinik tablodur. Yoğun bakım ünitelerinde en önemli ölüm nedenidir. Sepsis eski Yunanca'da pütrifikasyon yani çürüme anlamına gelen, tüm sistemlerin etkilendiği sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) sonucu ortaya çıkan bir süreçtir. SIRS, enfeksiyon kaynaklı olabileceği gibi enfeksiyon dışında akut pankreatit, travma, yanık gibi bazı durumlar da sepsis benzeri bir tablo yaratabilir (110) (Şekil 1).



Şekil 1: Enfeksiyon, Sepsis ve Sistemik inflamatuvar yanıt sendromunun ilişkisi

Günümüzde sepsis sendromunun konakçının enfeksiyon etkenine karşı geliştirdiği bir grup yanıtlar dizisi olduğu anlaşılmıştır. Ancak, birçok terimin birbirinin yerine kullanılması ya da genel anlamıyla kullanılması karışıklığa yol açtığından American College of Chest Physicians (ACCP) ve Society of Critical Care Medicine (SSCM) adlı derneklerinin 1991'de yaptıkları toplantıda ele alınmış ve ortak görüş birliğine varılarak bazı tanımlamalar yapılmıştır (125). Bu tanımlamalar daha sonra 2001 yılında yapılan toplantıda European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), American Thoracic Society (ATS) ve Surgical Infection Society (SIS) derneklerinin de katkısıyla yenilenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Sepsis ile ilgili genel tanımlar (4, 66)

▪ Enfeksiyon	Mikroorganizmaların normalde bulunmadığı bir vücut bölmesine girmesi, çoğalması ve konağa zarar vermesi ile ortaya çıkan durum
▪ Bakteriyemi	Kanda bakteri bulunması
▪ Septisemi	Ağır enfeksiyon tablosuyla seyreden bakteriyemi
▪ Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS)	Birçok ağır klinik durumda görülen sistemik inflamasyon yanıtı Bulgulardan en az ikisi olmalıdır. 1. Temperatür >38 veya $<36^{\circ}\text{C}$ 2. Nabız >90 3. Solunum hızı >20 4. Akyuvar sayısı WBC $>12 \times 10^9/\text{L}$ veya $<4 \times 10^9/\text{L}$
▪ Sepsis	SIRS kriterlerinden en az ikisinin varlığı ve ispatlanmış enfeksiyon (pozitif kan kültürü)
▪ Ağır sepsis	• Organ disfonksiyonu • Hipotansiyon • Hipoperfüzyon • Laktik asidoz, oligüri, mental değişikliklerin ortaya çıkması
▪ Septik şok	Sıvı resusitasyonuna rağmen hipotansiyon, hipoperfüzyon
▪ Yanıtsız septik şok	Hiçbir etkili tedaviye yanıt vermeyen ve 1 saatten uzun süren septik şok
▪ Multiorgan disfonksiyonu sendromu (MODS)	Organ fonksiyon bozukluklarının ve yetmezliğinin ortaya çıktığı durum

Sepsiste erken ve geç dönemde rastlanan birçok belirti olmakla birlikte (Tablo 2) yoğun bakım ünitelerinde izlenen hastalarda ilk klinik belirtiler ateş, hiperventilasyon

ve mental durum değişiklikleridir (45, 125). İlk görülen metabolik değişiklik ise solunumsal alkalozdur (125).

Tablo 2: Sepsisin belirtileri (45)

<i>Sık rastlanan</i>	<i>Daha az rastlanan</i>
• Ateş, rigor, myalji • Irritabilite • Letarji • Taşikardi • Taşipne (respiratuvar alkaloz) • Hipoksemi • Proteinüri • Lökositoz • Eozinopeni • Hiperferremi • Karaciğer fonksiyon bozukluğu • Diabetlilerde hiperglisemi	• Stupor, koma • Hipotermi • Şok • Gastrointestinal kanama • Kutanöz lezyonlar • Laktik asidoz • Akut solunum yetmezliği • Azotemi, oligüri • Lökopeni • Trombositopeni • Disemine intravasküler koagülasyon • Anemi • Hipoglisemi

Tanı ve tedavideki pek çok gelişmeye karşın sepsiste mortalite oranı genel olarak %30-90 arasında değişmektedir (125). Mortalite oranı konakçı ve çevre faktörlerine göre değişkenlik göstermektedir. Sepsiste prognoz açısından erken tanı ve tedavi çok önemlidir. Mortalite oranı erken tanı ve tedaviyle azaltılabilmektedir. Sepsis geri dönüşümsüz evreye geçmeden önce tedaviye başlanması tedavi başarısını etkileyen en önemli faktördür. Sepsisin patogenezinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması sonucu klasik tedaviye yardımcı tedavi yaklaşımları ortaya çıkmıştır (13).

4.1.4. Sepsis Patogenezi

Sepsis patogenezinin aydınlatılması için *Escherichia coli* inokülasyonu veya endojen polimikrobiyal sepsis oluşturulması gibi çeşitli deneysel laboratuvar modelleri

kullanılmıştır (97, 141). Sepsis esas olarak enfeksiyona karşı gelişen sistemik inflamatuvar yanıttır. Etken mikroorganizma genellikle hastanın kendi florasından kaynaklanır. Adhezyon özelliği, serumun bakterisit etkisine karşı direnç, enzimler, toksinler, hücre içinde yaşama ve antifagositik yüzey gibi faktörler sepsis patogeneğinde rol oynar. Endotoksin görevi gören lipopolisakkaritler (LPS) kan dolaşımına geçerek kompleman ve koagülasyon sistemi gibi mekanizmaları tetikler (72, 73). Mikroorganizmaya ait hücresel elemanlar ve konakçının dolaşım sistemindeki mononükleer fagositler, endotel hücreler ile diğer hücrelerden sitokin salıverilmesini başlatır. Monositlerden tümör nekroz faktör (TNF)- α , IL-1, IL-6, IL-8 gibi interlökinler ve trombosit aktive edici faktör (PAF) salındıktan sonra araşidonik asit metabolizması başlar; lökotrienler, prostaglandin E₂ (PGE₂), prostasiklin (PGI₂) oluşur. Interlökinler T hücrelerini aktive eder. T hücrelerinden γ -interferon, IL-2, IL-4 ve granülosit monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salınır. Bu sitokinler lokal enfeksiyonun ortadan kaldırılmasını sağlarken, diğer taraftan aşırı miktarda sentezlenerek dolaşıma karıştıklarından yaygın endotel hücre zedelenmesine ve kapiller geçirgenlikte artışa neden olurlar (1). Kapiler geçirgenlikteki artışla ortaya çıkan bu göllenme sonucu dolaşımdaki kan hacmi azalır, şok ve organ yetmezliği oluşur (40, 132). Ayrıca TNF- α , IL-2'nin etkisiyle endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) yapımı artar (44, 98). Artan NO düz kasları gevşeterek miyokard depresyonu ve hipotansiyona neden olur (99, 143). Sepsiste amino asit dengesi (22, 32, 60) ve enerji metabolizmasındaki (23) değişiklikler hastalığın seyrini kötüleştirmektedir.

Diğer taraftan endotoksin etkisiyle kompleman sistemi de aktive olur. Kompleman sisteminin aktivasyonu vazodilatasyon, vasküler geçirgenlik artışı, trombosit agregasyonu ve nötrofil aktivasyonunu içine alan inflamasyon zincirini başlatır (47). Aktive olan nötrofillerin degranülasyonu sonucu ortaya çıkan proteazlar ve toksik oksijen metabolitleri endotel hücre hasarını artırır (100, 131, 136, 142). Sepsiste organlarda (kalp, karaciğer, akciğer, böbrek) malondialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleriyle değerlendirilen oksidatif stresin plazmadaki düzeylerle pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (61). Sepsiste tüm bu faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan hemodinamik ve yapısal değişiklikler, bir çok organda patolojik değişikliklere yol açar (4, 140).

Sepsisin patogenezinde rol oynayan yeni mekanizmaların aydınlatılmasıyla birlikte klasik tedavinin yanı sıra antioksidan ajan kullanımı, TNF- α monoklonal antikoru, IL-1 reseptör antagonistleri, nitrik oksit sentaz (NOS) ve siklooksijenaz (COX) enzim inhibitörlerinin kullanımı ve immunoterapi gibi yeni tedavi yaklaşımları da ortaya çıkmıştır (13, 134).

4.1.5. Septik Ensefalopati

Ensefalopati, beyin dışındaki bir organın hastalığı esnasında mental durumdaki değişme veya uyanıklık seviyesindeki azalma olarak tanımlanmaktadır (62). Enfeksiyon ve bozulmuş beyin fonksiyonları arasındaki ilişki uzun süredir bilinmektedir (42, 96). Sepsiste organ disfonksiyonuna bağlı mortalite %26 oranındayken, buna santral sinir sistemi (SSS) disfonksiyonu eklendiğinde mortalite %49'a çıkmaktadır (42). Bu nedenle son yıllardaki çalışmalar septik ensefalopati üzerinde yoğunlaşmıştır. Septik ensefalopati hastaların %8-70'inde gözlenmektedir ve yoğun bakım ünitelerinde en sık rastlanan ensefalopati şeklidir (96).

Septik ensefalopati erken ve geç dönem olmak üzere ikiye ayrılır. Erken ensefalopati multiorgan yetmezliğinden önce gözlenir; dolayısıyla renal, hepatik disfonksiyon ya da hipoksemi ile açıklanamaz. Geç ensefalopati ise multiorgan yetmezliği, hipotansiyon ya da diğer sistemik olaylarla beraberdir. Ensefalopatinin beyinde oluşan inflamatuvar medyatörler ve beyin hücrelerinin bu medyatörlere sitotoksik cevabı sonucunda ortaya çıktığı sanılmaktadır (96).

Septik ensefalopatinin patofizyolojisinde bir çok mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar arasında serebral endotel disfonksiyonu (100, 142), kan-beyin engelinde bozulma, beyin ödemi, serebral kan akımında azalma (81), bakteriyel translokasyon, disemine mikroabse oluşumu, multifokal nekrotizan ve hemorajik lökoensefalit, nörotransmitter/ amino asit dengesizliği (7, 17), NO ve glutamat düzeyindeki değişiklikler (16), hiperamonemi (77), nörotoksik moleküllerin beyne geçişi ve inflamatuvar mediyatörlerin artışına bağlı olarak meydana gelen oksidan hasar (35, 37) sayılmaktadır. Septik şok sonrası 23 hastanın beyninin postmortem incelendiği bir çalışmada hemoraji %26, hiperkoagülasyon %9, mikroabse %9, multifokal nekrotizan lökoensefalopati %9 ve iskemi %100 oranında bulunmuştur (108). Konuyla ilgili yapılan ilk çalışmalarda disemine serebral mikroabseler suçlanmıştır (107, 120). Ancak

pankreatit, böbrek, karaciğer yetmezliği gibi enfeksiyon dışı durumların da ensefalopatiye yol açması, ensefalopatinin yaygın inflamasyona bağlı olduğunu düşündürmektedir (108, 109). Sepsiste lökositlerden salınan inflamatuvar medyatörler, endotel hücreleri ve astrositlere etki ederek nöronal hasara, bunun sonucunda da nörolojik işlev bozukluğuna yol açmaktadır (47).

Sepsis oluşturulan sıçanlarda 3 saat sonra beyin dokusunda noradrenalin konsantrasyonunun azaldığı ve 24 saat sonra ön beyinde beta adrenerjik reseptör yoğunluğunun azaldığı gösterilmiştir (54). Chan ve arkadaşlarının 2003’de yaptığı araştırma da bu sonuçları desteklemektedir ve otonomik disfonksiyonun yanısıra anjiyotensin (AT)-1 reseptör yoğunluğunun azalma bulunmuştur (21). Bazı araştırmacılar ise sepsiste nörolojik bozukluklara serotonerjik aktivitede artışın neden olduğunu öne sürmektedir (111).

4.1.6. Sepsisin Nörolojik Komplikasyonları

Sepsis yalnızca parenkimal organlarda değil, aynı zamanda periferik sinirlerde ve iskelet kaslarında hasara yol açabilir. Bu duruma sepsis ile ilişkili polinöropati ve myopati adı verilir. Bazı vakalarda kalıcı motor bozukluğa yolaçabilen bu akut aksonal nöropati ve myopatinin patogenezinde sistemik inflamatuvar yanıtın rol oynadığı düşünülmektedir (50, 51).

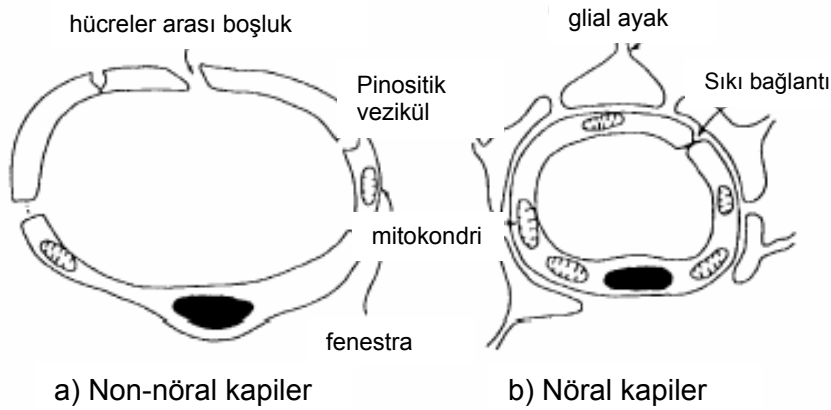
Septik hastalarda SSS ile ilişkili olarak oryantasyon bozukluğu, konsantrasyon bozukluğu, yazma yeteneğinde bozulma; daha ağır vakalarda da deliryum ve koma gözlenmektedir. Yapısal beyin lezyonlarının aksine, septik ensefalopatili hastalarda simetrik nörolojik bulgular mevcuttur. Septik ensefalopatinin değerlendirilmesinde nörolojik muayene ve “Glasgow Koma Skalası” kullanılmaktadır. Bu ölçeğe göre yapılan skorelama puanının düşüklüğü mortalite oranı ile yakından ilişkilidir (41).

Sepsisin nörolojik komplikasyonları için henüz spesifik bir tedavi yoktur. Kas gevşeticiler, düşük doz kortikosteroid, immunoterapi, antiinflamatuvar ya da antioksidan ilaçların kullanımı gibi tedavi yaklaşımları önerilmektedir (35, 51).

4.7. Kan-Beyin Bariyeri

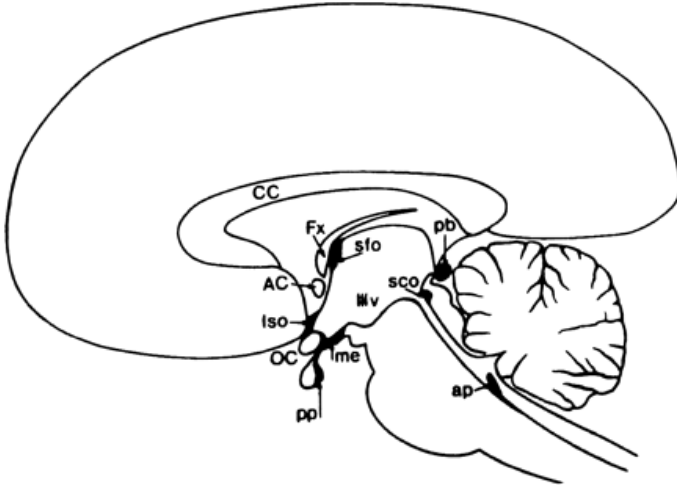
4.7.1. Genel Özellikleri

Kan beyin bariyeri (KBB) beyindeki vasküler endotel hücrelerinin oluşturduğu bir yapıdır. Endotel, astroglia, perisit hücreleri ve bazal laminanın oluşturduğu bu sistem dolaşımdaki maddelerin beyne geçmesini kısıtlar. Astrositlerin glial ayakları ve perisit adı verilen ve endotel hücrelerinin büyümesini kontrol eden kontraktıl hücreler bazal laminaya tutunan serebral endotel hücrelerini sıkıca sararlar. Bunlarla birlikte sıkı bağlantıları olan tek sıra hücreler KBB'ni oluşturmaktadır. Pinositik veziküllerin eksikliği ve pencere bulunmaması da geçişi kısıtlamaktadır (30), (Şekil 2). Sıkı bağlantılar paraselüler geçişi kısıtlar. Ancak lipofil bileşikler çözünerek ya da difüzyonla geçebilir. Polar bileşikler ise özel taşıyıcılarla taşınır. KBB'nde 20'den fazla spesifik taşıyıcı pompanın varlığı saptanmıştır (113).



Şekil 2: Nöral ve nöral olmayan kılcal damarların şematik görünümü. Nöral kapilerlerde sıkı bağlantılar mevcuttur. Pinositik aktivite düşüktür., fenestre yoktur, mitokondri dansitesi daha fazladır. Nöral endotel hücreleri bazal lamina ve astrosit ayaklarıyla çevrelenmiştir (113).

Beynin yaklaşık %1'inde KBB'nin bulunmadığı bazı bölgeler vardır. Sirkümvatriküler organlarda (medyan eminens, area postrema, subfornikal organ, subkomissural organ, hipofiz bezi, nörohipofiz ve organum vasculosum) KBB yoktur (113).



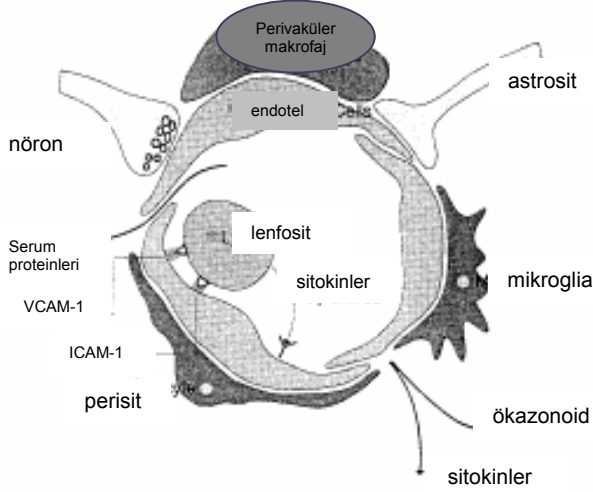
Şekil 3: Kan-beyin engeli bulunmayan bölgeler (ap, area postrema, pb, hipofiz bezi, sfo, subfornikal organ; sco, subcommissural organ; me, median eminens; pp, posterior pituitary, arka hipofiz; ve iso, lamina supraoptica) siyah renkle gösterilmiştir. Referans olarak gösterilen diğer bölgeler: IIIv, üçüncü ventrikül; AC, anterior commissure; ve CC, corpus callosum (113).

4.7.2. Sepsis Ve Kan-Beyin Bariyeri

Multiple skleroz, epilepsi, alkolizm, hipertansiyon, beyin ödemi, beyin tümörü, fizyolojik hepatit, hiperbilirubinemi, AIDS, beyne hipertonic çözelti verilmesi, radyoterapi, menenjit, ensefalit ve sepsis gibi durumlar KBB'nin geçirgenliğinde artışa yol açmakta ve beyne aşırı miktarda lökosit göçü olmaktadır (30).

Sepsiste patojenler endotelden KBB'ni aşarak beyin dokusuna geçebilirler. Bu patojenler enfekte lökositleri truva atı gibi kullanarak transselüler yolla beyne geçebilmektedir (84). KBB'ndeki hücrelerin inflamatuvar medyatörleri oluşturması ya da adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması nöroimmün cevapta rol oynar (Şekil 4). Ayrıca nötrofiller, perivasküler makrofajlar ve mikroglial hücrelerin de nöroimmün cevaba katkısı vardır (30). Nöroimmün cevap inflamasyonu tetikler ve inflamasyonda aktive olan nonfagositik mikroglia hücreleri ve travma, enfeksiyon, nöronal hasar ile aktive olan fagositik (reaktif) tipteki her iki mikroglia hücreleri de sitokinler, pıhtılaşma faktörleri, kompleman faktörleri, ökazonoidler, proteazlar, reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve NO gibi inflamasyona aracılık eden medyatörler salgılanır. Aktive olan mikroglia hücrelerinden açığa çıkan süreoksit ($O_2^{\bullet}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve serbest NO radikali ($NO^{\bullet}$) oksidatif hasara yol açmaktadır. Lipid peroksitlerinin oluşumu membran yapısını bozarken, beyin demirden zengin olduğu için

demir iyonu serbestleşmesine ve nöronlarda oksidan hasarın şiddetlenmesine neden olmaktadır (72, 73).

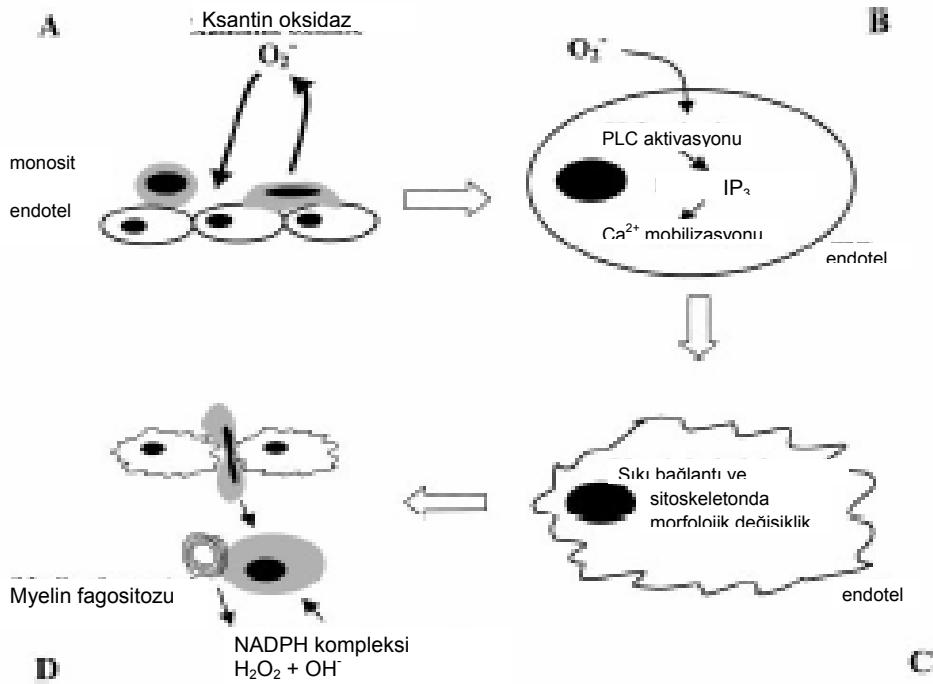


Şekil 4: Nörolojik hastalıklarda endotel hücrelerinde kan-beyin engelinin yapısı değişmektedir. Endotel hücreler ökazonoidler ve sitokinler gibi inflamatuvar medyatörler salgırlar. Buna ek olarak adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki artış merkezi sinir sistemine lökosit girişini artırır. Bu faktörler inflamasyon sinyalinin mikroglia, astrozit, nöron, perisit, perivasküler makrofajlar gibi diğer hücrelere de iletimini artırır. VCAM: vasküler hücre adezyon molekülü; ICAM: hücre-içi adezyon molekülü

Sepsiste LPS, KBB'nin geçirgenliğini artırmasının yanı sıra mikroglia aktivasyonuna yol açmaktadır (72, 75). Sepsiste LPS'nin NO aracılı bir mekanizmayla KBB geçirgenliğinin artmasına yol açtığı gösterilmiştir (73, 75). Bu artış L-NAME ve aminoguanidin gibi NOS inhibitörleriyle önlenabilirken (75), NO donörleri ile artmaktadır (76). Beyindeki temel eksitator amino asit olan glutamatın doğrudan bir etkiyle de düşük molekül ağırlığına sahip maddelere KBB'nin geçirgenliğini artırdığı ve NO aracılı bir yolla serebral arterleri genişlettiği gösterilmiştir (74).

Bakteriyel menenjitte IL-1 β , TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve TNF- α ile indüklenen COX-2'nin de KBB geçirgenliğini artırdığı gösterilmiştir (102, 123, 124). *Escherichia coli* infüzyonu ile oluşturulan sepsiste dolaşımda ve beyinde TNF- α , IL-6 gibi sitokinlerin miktarının arttığı, bu artışa bağlı olarak beyin ödemi gözleendiği ve sonuçta nöronal ölüm olduğu bildirilmiştir (14). Hücre kültüründe oluşturulan endotoksik şoktan kaynaklanan nöronal ölümde de TNF- α önemli rol oynadığı gösterilmiştir. TNF- α sentez inhibitörleri ve anti-TNF antikorları bu modelde nöronal

hasara karşı koruyucu etki göstermektedir (29). Sepsiste akuaporin-4 (AQP4), okludin ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikler beyin ödeme ve sıkı bağlantıların açılması sonucu KBB'den geçişin artmasına neden olmaktadır (28). Bunların bir sonucu olarak serebral kan akımının yavaşlaması ve ayrıca oksidatif mekanizmalar da hasara katkıda bulunmaktadır (81). ROM, KBB'ni oluşturan serebral endotel hücrelerine lökosit göçünü artırmaktadır (Şekil 5). $O_2^{\bullet}$ sıkı bağlantıların yapısının bozulmasına yol açmaktadır (133).



Şekil 5: A) Monositlerin serebral endotel hücrelerine göçü ve adezyonu ksantin oksidazın (XO) aktivasyonuna ve $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna yol açar. B) $O_2^{\bullet-}$ oluşumunun indüksiyonu fosfolipaz C ile ilişkili sinyal iletim mekanizmasını uyarır. Serebral endotel hücrelerinde IP_3 ve hücre içi Ca^{2+} mobilizasyonu artar. C) Serebral endotel hücrelerinin sıkı bağlantılarında yapısal değişikliğe neden olur. D) Sıkı bağlantıların açılması monosit diapedezini artırır. Makrofaj göçü ve farklılaşması sonucu myelin NADPH oksidazı aktive eder. Makrofajlardan H_2O_2 and $OH^{\bullet}$ gibi çeşitli ROM açığa çıkar.

4.8. Beyin Ödemi

Travma, beyin tümörü, toksik, anoksik, metabolik ve enfeksiyon kaynaklı olabilen beyin ödemi, morbidite ve mortaliteyi olumsuz yönde etkileyen bir durumdur. Beynin sıvı hacmindeki bu artış, kafa içi basıncı artırmanın yanı sıra perfüzyon ve oksijenasyonun bozulmasına neden olur. Diğer organlardan farklı olarak beyin, su içeriğinin artışına çok daha duyarlıdır ve beyin ödemi yaşamı tehdit eden bir durumdur (58).

4.8.1. Ödemin Sınıflandırılması

Beyin ödemi sınıflandırması ilk kez 1967'de yapılmıştır. Buna göre vazojenik ve sitotoksik olmak üzere iki tip ödem mevcuttur. 1975'de bu sınıflamaya hidrosefalik hastalarda gözlenen interstisyel ödem ve osmotik dengenin bozulmasından kaynaklanan ozmotik ödem de eklenmiştir (127).

Ozmotik ödemde özellikle sodyum (Na^+) gibi elektrolitlerin dengesindeki bozulma ve hücre içine su girişindeki artış söz konusudur. Hidrosefalik/ interstisyel ödemde beyin-omurilik sıvısının akışında sorun vardır. Vazojenik ve sitotoksik ödem oluşumunda ise birçok faktörün rolü vardır. Bunlar arasında glutamat, NO, araşidonik asit ve metabolitleri, histamin, kininler, interlökinler, VEGF, laktat, serbest oksijen radikalleri, potasyum (K^+), hidrojen (H^+) ve kalsiyum (Ca^{2+}) sayılabilir (127).

Ödem sınıflandırması ve bu ödem tiplerinin özellikleri, oluşum mekanizmaları Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3: Ödem sınıflandırması (58, 127)

	<i>Vazojenik</i>	<i>Sitotoksik</i>	<i>Ozmotik</i>	<i>İnterstisyel</i>
<i>Neden</i>	KBB hasarı: <u>Akut</u> : travma, inme, hemoraji, arteriyel hipertansiyon <u>Kronik</u> : Tümör, abse, ensefalit	İskemi, Anoksi, intoksikasyon	Metabolik bozukluk: Dializ, dehidratasyon, diyabetik koma	Obstriktif hidrosefali
<i>Oluşumu</i>	Doku hasarı sonucu kapiller endotel hücrelerinin geçirgenlik artışı	1. Hücre zarında Na/K geçirgenliğinde artış 2. Na/K-ATPaz pompasında bozukluk 3. Osmotik maddelerin alımında artma	Ozmotik gradient (plazma→doku)	Beyin-omurilik sıvısının geri emilimi ya da eflüksünün bozulması
<i>Geçirgenlik</i>	Artar	Değişmez	Değişmez	Değişmez
<i>Ödem sıvısının özellği</i>	Proteinden zengin	Protein yok Elektrolitten zengin	Protein yok Elektrolit oranı çok yüksek veya çok düşük	Normal beyin- omurilik sıvısı
<i>Morfoloji</i>	İnterstisyel boşlukta genişleme, hücreler şişmez; çoğunlukla beyaz madde etkilenir, sekonder olarak astrositlerde şişme gözlenir.	Hücreler şişer; İnterstisyel boşluk azalır	Hücreler şişer İnterstisyel boşluk azalır	Sıvı hücreler arasıdır; İnterstisyel boşlukta genişleme

4.8.2. Sepsis Ve Beyin Ödemi

Septik ensefalopatide beyin ödemi ve nöronal hasar içiçe geçmiş bir durumdur. Patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte sepsiste AQP4, okludin ve VEGF gibi faktörlerin ekspresyonundaki değişiklikler beyin ödemi ile nöronal hasara katkıda bulunmaktadır. Beyin ödemi ve sıkı bağlantıların açılmasının bir sonucu olarak septik ensefalopatili hastalarda beyin-omurilik sıvısında protein artışı gözlenmektedir (28). Domuzlarda fekal peritonit modeliyle oluşturulan septik ensefalopatide mikroskopik incelemede frontal korteksteki astrositlerde belirgin bir şişme gözlenmektedir. Bu ödem sitotoksik karakteristiktir (95). Domuzlarda yapılan bir başka çalışmada yine astrositlerde şişme, perivasküler ve sitotoksik ödem ile beyaz maddede hiperemi gözlenmiştir (14). Astrosit ayaklarındaki şişme endotel hasarının ve KBB yıkımının göstergeleri kabul edilmektedir. Ayrıca kılcal damarlardaki ödem ve hasar oluşumu oksijen transportunun bozulmasına yol açmaktadır (28).

4.9. Oksidan Hasar Ve Savunma Mekanizmaları

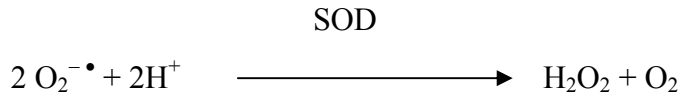
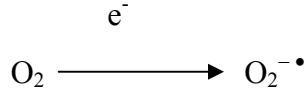
4.9.1. Serbest Radikaller Ve Oksidan Hasar

“Serbest radikal”, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu kararsız ve reaktif hale getirir.

Tablo 4: Başlıca reaktif oksijen metabolitleri ve yarılanma ömürleri

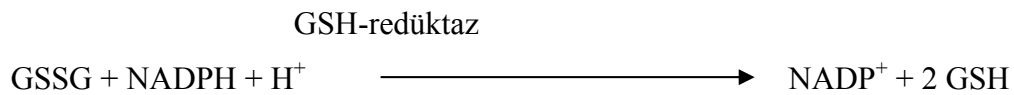
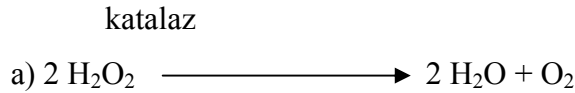
<i>Radikal</i>	<i>Sembol</i>	<i>37 °C de yarılanma ömrü (saniye)</i>
Alkoksil radikali	RO•	1×10^{-6}
Hidroksil radikali	OH•	1×10^{-9}
Lipit peroksid	ROOH	$>10^2$
Moleküler oksijen	O ₂	>10
Peroksil radikali	ROO•	1×10^{-2}
Singlet oksijen	¹ O ₂	1×10^{-6}
Süperoksit anyon radikali	O ₂ ^{-•}	1×10^{-6}

Organizmanın aldığı O_2 'in %95'i enerji oluşumunda kullanılırken, %5'den fazlası da reaktif oksijen metabolitlerine, yani bir başka deyişle oksijen türevi radikallere dönüşür. $O_2^{\bullet-}$, oksijen (O_2) molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile H_2O_2 'ye indirgenir.

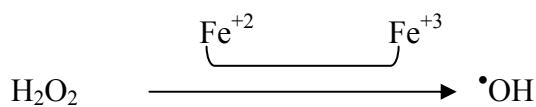


H_2O_2 eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir. H_2O_2 'in metabolizması hücre içinde birkaç şekilde olabilir:

- 1- H_2O_2 , katalaz veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından toksik olmayan ürünlere (su ve indirgenmiş glutatyon, GSSG) dönüşür; o da NADPH (nikotinamidadenin dinükleotid fosfat) ile birleşerek GSH oluşturur.



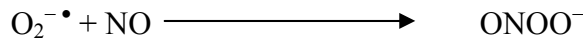
- 2- H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik $\bullet OH$ radikaline dönüşür.(Fenton reaksiyonu)



H₂O₂'nin $\bullet$ OH'e indirgenmesi Fe⁺² ve Cu⁺² gibi geçiş metalleri varlığında olur. Bu metaller hücrede serbest değildir. Serumda demir transferin, bakır ise seruloplazmin şeklinde depolanır ki; depo halinde iken serbest radikal oluşturamaz. Dolayısı ile antioksidan enzimler ve serbest radikal sprclerinin yanı sıra geçiş metallerini bağlayan proteinler de organizmanın total antioksidan kapasitesinin bir bölümünü oluşturur (144).

$\bullet$ OH ise oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbondhidrat ve lipidler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulunduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir (37).

O₂^{•-}'e bağlı olan toksisite $\bullet$ OH'e bağlı olanla karşılaştırıldığında daha hafiftir. Ancak bazen radikaller diğer radikallerle etkileşerek stabil moleküller verir. Böyle bir durumda her radikaldeki eşlenmemiş elektronlar kovalan bağ oluşturur. Örneğin, O₂^{•-} endojen NO ile tepkimeye girerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturur. Oluşan ONOO⁻ protein ve peptitlerin metiyonin rezidülerini ve tiyol gruplarını oksitleyerek hasar oluşturabilir ve ayrıca NO₂[•], OH[•] ya da nitronyum iyonu (NO²⁺) gibi toksik ürünlere dönüşebilir (26, 27).



“Oksidatif hasar” organizmada oluşan toksik oksijen türevi metabolitlerin neden olduğu hücre, doku ve organ hasarını tanımlamaktadır. Oksidatif hasarın göstergeleri olarak kullanılan başlıca parametreler radikallerin hedef aldığı makromolekllerdeki hasarı yansıtır (37). Bu parametreler başlıca;

- 8-okso, dihydro-2-deoksikuanosin tayini (DNA hasarı)
- Malondialdehit (MDA), hidroksialkenal ve dien konjugatlarının tayini (Lipidlerde oksidasyon)
- karbonil tayini (proteinlerin oksidatif hasarı) dir.

4.9.2. Serbest Radikallerin Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

Serbest oksijen radikalleri fizyolojik şartlarda endojen olarak oluşurken aynı zamanda hava kirliliği, pestisitler, UV radyasyon, X-ışını gibi ekzojen faktörlerin etkisi ile de oluşumları artmaktadır (37).

Serbest radikallerin artrit, hemorajik şok, ateroskleroz, yaşlanma, iskemi/reperfüzyon hasarı, enfeksiyonlar, sepsis, Alzheimer ve Parkinson hastalığı, gastrointestinal disfonksiyonlar, tümör oluşumu, karsinogenez ve AIDS gibi hastalıklarda işe karıştığı gösterilmiştir (24). Güçlü serbest radikal süpürücü etkiye sahip olan çok sayıda sentetik ve doğal antioksidanın insan sağlığında ve hastalıkların önlenmesinde faydalı etkilerinin olduğu bilinmekte ve bundan yola çıkılarak ROM'ne bağlı gelişen pek çok hastalıkta kullanılabileceği bildirilmektedir (25, 35, 37, 72). Bu konuda özellikle son yıllarda çalışılmasına rağmen, özellikle nörolojik bozukluklarda kullanılmak üzere KBB'ni geçebilen antioksidanlara ihtiyaç vardır (38, 39).

Serbest radikaller yüksek oranda reaktif bileşiklerdir. Sahip oldukları bu reaktivite ile hücre membranının yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, DNA'daki nükleotitler ve proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olurlar. (26, 27). Poli(ADP-riboz) sentaz (PARS) ya da diğer adıyla poli(ADP-riboz) tranferaz olarak da bilinen poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) enzimi ökaryotlarda bulunan nükleer bir enzimdir. Çevresel uyarılar, hidroksil, süperoksit ve peroksinitrit gibi serbest radikaller, iyonizan radyasyon ve genotoksik ajanların PARS enzimini aktive etmesi DNA sarmalında kırılmaya neden olur. PARS enziminin inhibisyonu bir çok inflamatuvar hastalıkta koruyucu etki göstermektedir (26).

4.9.2.1. Sepsis Ve Oksidan Hasar

Septik şok ve çoklu organ yetmezliği sendromunun patogenezinde daha önceki bölümlerde bahsedildiği üzere dolaşımdaki katekolaminlerin artışı, sitokin oluşumu, ökazonoid sentezinin artışı, NO salıverilmesi, ROM'nin açığa çıkması gibi birçok mekanizma rol oynamaktadır. $O_2^{\bullet}$ ve $ONOO^-$ radikalleri birçok inflamatuvar durumda olduğu gibi sepsiste de önemli rol oynamaktadır. Sepsiste doku ve plazmadaki oksidatif stresin korelasyon gösterdiği bulunmuştur (61). Sepsiste antioksidan ajanların kullanımıyla uzak organ hasarı azaltılabilmektedir (Sener 2005a, Sener 2005b). Ayrıca izole doku ve hücre kültürü çalışmalarında $O_2^{\bullet}$ ve $ONOO^-$ radikallerinin sepsis ile ilişkili patofizyolojik değişikliklere (endotel ve epitel disfonksiyonu, vasküler

hiporeaktivite, hücre disfonksiyonu) yolaçtığı gösterilmiştir. Bu değişiklikler kısmen PARS enzimi aracılığıyla gerçekleşmektedir (27). Sepsis ve çoklu organ yetmezliği sendromunda nikotinamid, 3-aminobenzamid, PJ34, 5-aminoizokinolinon gibi PARS enzim inhibitörlerinin endotoksemi modellerinde koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca PARS enzimi bulunmayan hayvanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde sağkalım %100 olarak bulunmuştur (26).

4.9.3. Endojen Antioksidan Sistem

Serbest oksijen radikallerinin ciddi hasar yapma potansiyellerine karşı hücreler, bu toksik ürünleri hızla metabolize edecek savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Hücre ve dokuları serbest oksijen radikallerine karşı korumada oksijen radikallerinin yapımlarının inhibisyonu önemlidir.

SOD enzimi $O_2^{\bullet-}$ 'in H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize ederek oksijen toksisitesine karşı ilk savunma basamağını oluşturur. Sitozolik SOD bakır-çinko içeren metalloenzimdir ve mitokondride bulunan formu ise manganez içerir. Süperoksitin H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Peroksizomlarda bulunan H_2O_2 yine aynı organelde bulunan katalaz enzimi tarafından metabolize edilir. Katalaz, sitoplazma içinde ve peroksizomlarda ve hemen her hücrede bulunan enzimdir. Sitozolde ve mitokondrilerde bulunan H_2O_2 metabolizmasında rol alan bir diğer enzim GSH-Px'dır. Organizmada bulunan tüm bu antioksidan enzimler endojen veya hastalık durumunda oluşumu artan serbest radikallere karşı vücudun antioksidan savunma sisteminin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar.

Bir diğer önemli antioksidan savunma yöntemi ise Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşumunun engellenerek, redoks aktif metallerin (bakır, demir gibi) transport veya depo proteinlerine bağlanarak ortamdan uzaklaştırılması ve serbest radikallerin lipidlerle oluşturduğu zincirleme reaksiyonların durdurulmasıdır.

Farklı bir koruma mekanizması da antioksidan etkili vitaminler ile serbest oksijen radikallerinin detoksifiye edilmesidir. E vitamini lipidden zengin membranlarda, C vitamini su bazlı ortamlarda temel korumayı oluşturur. E vitamini (α -tokoferol) lipid peroksidasyonunda oluşan zincirleme reaksiyonu, yapısındaki hidrojen atomunu lipid peroksiline vererek önler. Kendisi ise oksidasyon sonucu α -tokoferoksil radikaline

dönüşür. C vitamini (askorbik asit) ise bir elektron vererek dehidroaskorbat'a indirgenirken tokoferoksil radikalının α -tokoferole dönüşümünü gerçekleştirir.

Diğer antioksidan maddeler α -lipoik asit, ürat, γ -glutamil-sisteinil-glisin (glutasyon, GSH) gibi hidrofilik radikal süpürücüler, flavonoidler, karotenoidler, ubiquinol gibi lipid radikal süpürücüler ve GSH redüktaz, dehidroaskorbate redüktaz gibi küçük moleküler antioksidanların okside formlarının indirgenmesinde etkili enzimler, protein tiyollerin devamlılığında sorumlu olan tiyoredoksin redüktaz, GSSG'un GSH'a dönüşümünde elektron donörü olarak kullandığı NADPH yenileyen glukoz-6 fosfat dehidrojenez (G6PD) enzimi gibi enzimler antioksidan savunmaya katkıda bulunmaktadır.

Beyin KBB ile korunmuş olmakla birlikte oksidan hasara karşı çok daha duyarlıdır. Bunda endojen antioksidan kapasitenin azlığı ve beyin yağ asidi, askorbat ve demirden zengin olması gibi yapısal faktörlerin rolü vardır (24).

4.9.3.1. Glutasyonun Fizyolojik Olaylardaki Rolü (144)

1. GSH etkin bir şekilde serbest radikalleri ve diğer reaktif oksijen bileşiklerini (hidroksil, lipid peroksitler, peroksinitrit) ve H_2O_2 'yi süpürür.
2. GSH aynı zamanda elektrofilik bileşikler, fizyolojik metabolitler (östrojen, melanin, PG, LT) ve ksenobiyotikler (bromobenzen, asetaminofen) ile reaksiyona girerek merkaptürat oluşturur.
3. NO ile konjuge olarak S-nitrozo-glutasyon oluşturur.
4. Formaldehid dehidrogenaz enziminin substratıdır. Bu enzim, formaldehidi ve GSH'nu S-formil glutatona dönüştürür. Metiyonin, kolin, metanol ve sitokrom enzimleri ile yıkılan ksenobiyotiklerin metabolizması sonucu açığa çıkan ve kanserojen bir madde olan formaldehidin vücuttan uzaklaştırılması önemlidir.
5. Glutasyon PGH_2 'den endoperoksit izomeraz enzimi ile PGD_2 ve PGE_2 dönüşümü için gereklidir.
6. Ayrıca proteinlerin glutasyonidasyonu (tiyoredoksin, sitokrom-c oksidaz) fizyolojik olaylar için gereklidir.
7. Laktat oluşumunu artırır.
8. Spermatogenezi artırır. DNA ve protein sentezinde rol oynar.

9. GSH, T lenfosit ve polimorf nüveli lökositler (PMNL)'in sitokin üretimini artırır. Enfeksiyonlara karşı bağışıklık sistemini güçlendirir.

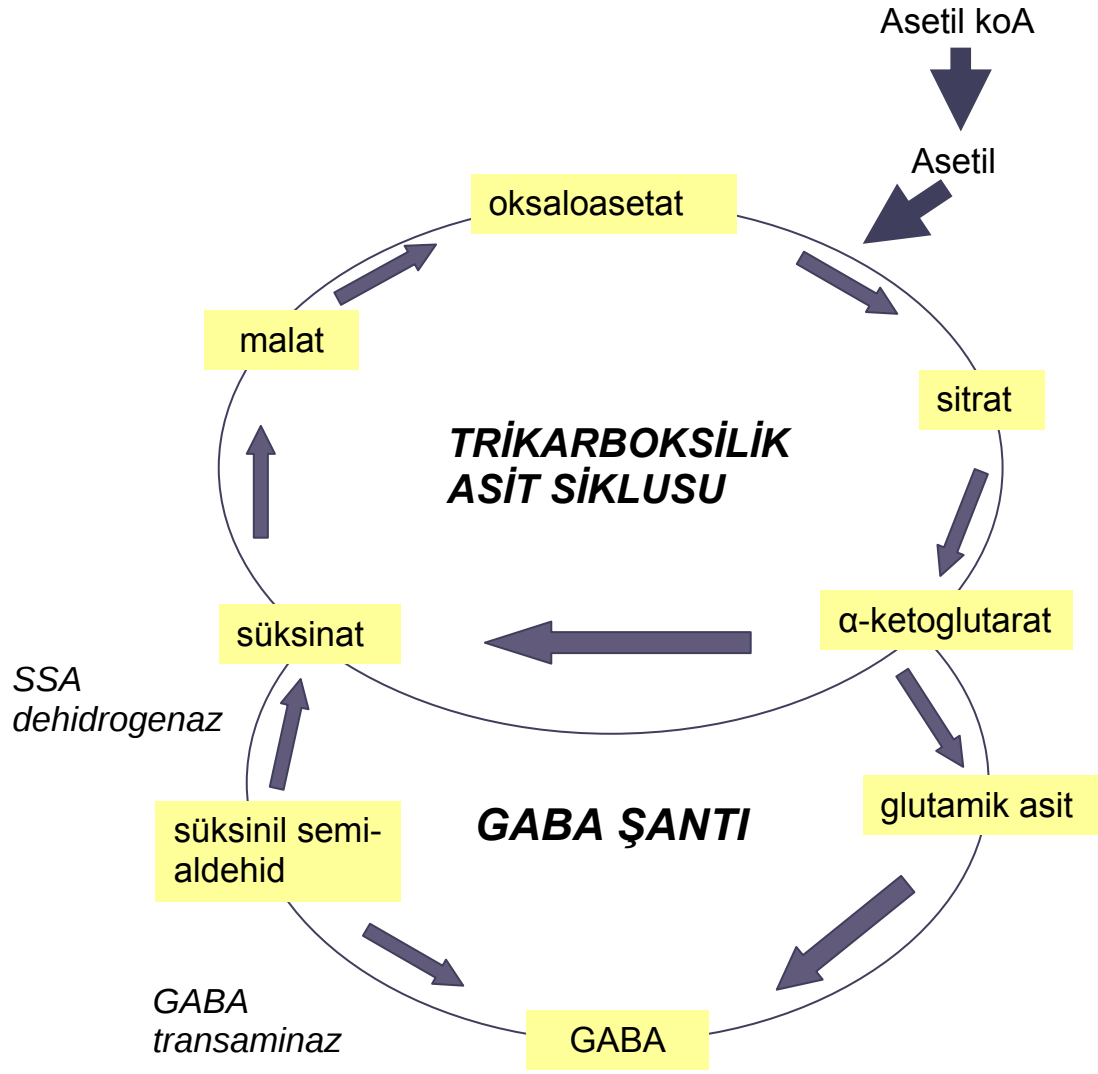
4.9.3.2. Sepsis Ve Glutasyon

Enfekte olan sıçanlarda glutasyon döngüsü organlar arasında oran farklılıkları göstermekle birlikte genel anlamda çok artmaktadır. Batın içi sepsiste plazma ve dokudaki oksidatif stresin göstergeleri olan MDA ile GSH düzeylerinin pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (61). Sepsisin ilk saatlerinde uygulanan tedavi GSH seviyelerinin korunmasını sağlayabilirken, iki gün sonra doku glutasyon depoları fazlasıyla boşalmaktadır ve tedaviden sağlanan fayda daha sınırlı olmaktadır (68). GSH depleksiyonunun nötrofillerin enfeksiyon alanına göçünü inhibe ettiği; bakteri kolonilerinin sayısını artırdığı ve sepsisin seyrini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (135).

4.10. Glutamat

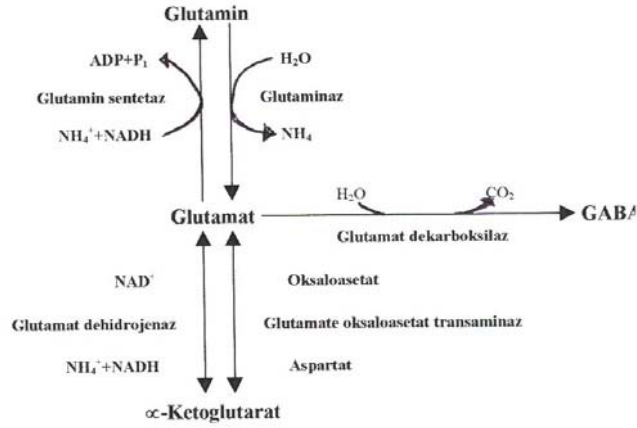
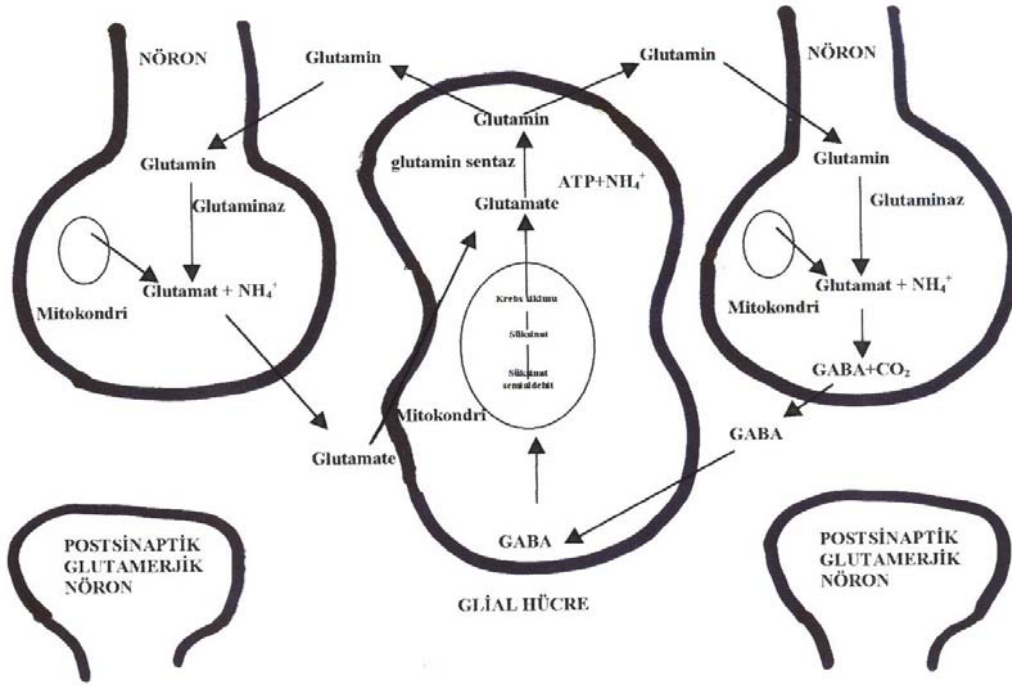
4.10.1. Glutamatın, Sentezi, Salınımı Ve Metabolizması

Glutamat, beyin ve omurilikte bulunan temel uyarıcı nöromediyatördür. Beyindeki 100 milyar nöronun yarısından fazlası glutamat ürettiğinden birçok nörolojik bozukluğun patogeneğinde rol almaktadır (48). Glutamik asit ya da onun iyonize şekli olan glutamat, sinir ucunda oksoglutarik asit ve glutamin ile dinamik denge halinde bulunur (85). Glutamik asit sinir ucunda glutaminaz enzimiyle glutaminin hidrolizi sonucu oluşur (86, 121).



Şekil 6: Glutamatın sentezi (94)

L-glutamat presinaptik sinir ucundaki veziküllerde depolanır ve Ca^{2+} bağımlı bir mekanizmayla salınır. Sinaptik aralığa salınan glutamatın etkisi presinaptik sinir ucuna veya glialara yüksek afiniteli uptake mekanizmaları ile alınmasıyla sonlanır. Glutamik asit glutamin sentetaz enzimi ile glutamine dönüştürölüp inaktive edilir (94, 86).

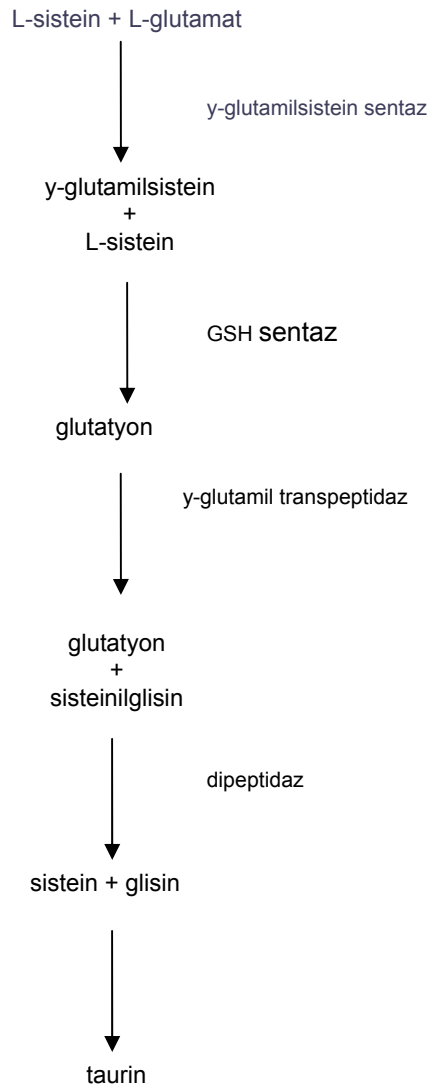


Şekil 7: Glutamatın salınımı ve metabolizması (94)

Beynin birçok bölgesine dolaşımdaki amino asitlerin geçişi KBB ile sınırlanmıştır. Vasküler endoteldeki sıkı bağlantılardan bazı maddeler difüzyonla geçebilir. Ancak glutamat gibi amino asitler plazmadan beyne yüksek afiniteli bir taşıma sistemi ile geçmektedir. Beyinden plazmaya geçişi de Na^+ bağımlı aktif transport sistemi ile gerçekleşir. Plazma glutamat düzeyindeki dalgalanmalar gün içinde değişkenlik

göstermektedir. Ancak bu dalgalanmalar beyne yansımaz. Ancak çok yüksek konsantrasyon değişikliklerinde beyin etkilenmektedir. Ancak sirkümventriküler organlardan (medyan eminens, area postrema, subfornical organ, subkomissural organ, hipofiz bezi, nörohipofiz ve organum vasculosum) beyne glutamat geçişi olmaktadır (113).

Hücre dışı veya hücre içi olarak bulunan glutamat hem GSH sentezinde öncü madde olarak kullanılır; hem de GSH sentezinde iki yolla önemli düzenleyici etki yapar: 1. Sistein alımını, 2. Glutamattan GSH'ın sentezini sağlayan GCS (γ -glutamilsistein sentaz) enziminin aktivitesini düzenler (144) (Şekil 7).



Şekil 8: Glutamat-glutatyon sentez basamakları

4.10.2. Beyin ve Omurilikte Glutamaterjik Aksonların Oluşturduğu Yolaklar

1. *Birinci Duyusal Nöronlar:* Bir kısmı omurilik dorsal boynuzunda ve diğer kısmı beyin sapında n. kuneatus ve n. graciliste bulunur. Bu çekirdeklerde impulsun 2. duyusal nörona aşırılmasından sorumlu olduğu sanılmaktadır. Dorsal boynuzda sonlanan duyusal sinir uçları ağırlı impuls aşırımında glutamat ve P maddesi (SP) aracılığıyla rol oynar. Salıverilen glutamatın yanısıra aspartatın da postsinaptik NMDA reseptörlerini etkilediği bildirilmiştir.
2. *Vagus ve glossofaringeus sinirlerinde bulunan glutamaterjik lifler:* Baroreseptörden kalkan uyarının bulbustaki NTS' ye taşınmasından bu lifler ve SP sorumludur.
3. Omurilik arka boynuzundaki substantia gelatinosadaki ağrı impulslarının birinci sıra nöronlardan 2. sıra nöronlara aşırılmasında nörokinin ve glutamat sorumludur.
4. *Kortikostriatal, kortikokortikal ve talamokortikal yolaklar:* Frontal korteksden striatuma uzanan bu yolaktaki nigrostriatal dopaminerjik sinirler glutamat salınımını inhibe eder. Talamokortikal yolak bazal ganglia tarafından lokomotor aktivite kontrolü için önemlidir. Parkinsonizmde bu yolak hipoaktifdir. Kortikokortikal yolaklar serebral korteksle ilişkili asosiyasyon yolaklarıdır.
5. *Vizüel korteksten kaynaklanan glutamaterjik yolaklar:* n. geniculatus lateralise uzanır ve oradan superior colliculusa yayılır.
6. *Hipokampal yolaklar:* Hipokampusun CA3 bölgesi ve subikulumdaki piramidal hücrelerden lateral septum, n. akümbens ve hipotalamusa uzanır.
7. *Serebellumla ilgili yolaklar:* Serebellar kortekste granül hücreleri glutamaterjik nöronlardan oluşur. Inferior olivada serebellar kortekse gelen tırmanıcı lifler bulunur.
8. *Diğer yolaklar:* Duyusal korteks, ventrolateral talamik nükleuslar, n. ruber ve omurilikten substantia nigraya uzanan bu yolak piramidal traktusun bir bölümünü oluşturur.

Serebral korteks, hipokampus, limbik yapılar, kortikospinal sinir uçları ve omurilikteki primer aferent sinir uçları gibi bazı yapılardaki eksitasyon/ inhibisyon olayları glutamat/ GABA dengesine bağlıdır (71, 86).

4.10.3. Glutamat Reseptörleri

Beyinde sinaptik aralığa salınan glutamat reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. Glutamaterjik reseptörler 4 tiptir ve aspartata da afinite gösterirler. Bu reseptörler iyonotropik ve metabotropik olarak iki gruba ayrılır (104, 105).

- **İyonotropik:** İyon kanalı ile kenetli, postsinaptik reseptörlerdir. Bu grupta NMDA, AMPA, Kainat reseptörleri bulunur.
- **Metabotropik:** Fosfoinozitid hidrolizi aracılığıyla çalışan ve bir G-proteinine kenetli presinaptik reseptörlerdir. 8 alt tipi olan L-AP4 (2-amino-4-fosfopropiyonik asit) reseptörleri metabotropik tiptedir.

AMPA reseptörleri SSS'de yaygın olarak bulunur ve hızlı eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP)'nin hızlı komponentinden (Na^+ akımından) sorumludur. AMPA reseptörleri düşük aşırımlı ve EPSP oluşturur.

NMDA reseptörleri ise uyarı frekansı arttığında devreye girer. Yavaş ama uzun süren EPSP yani uzun süreli potensiyalizasyon (long-term potentiation, LTP) oluşturur. NMDA reseptörlerinin eksitotoksisite, iskemik hasar, öğrenme-bellek, epilepsi, Huntington koresi, Alzheimer hastalığı, analjezi ve anksiyete gibi durumlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir (104, 105).

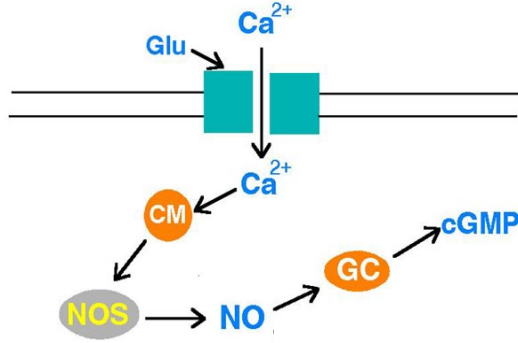
4.10.4. Glutamat ve Eksitotoksisite

Ekzitotoksisite terimi ilk olarak ekzojen uygulanan glutamat veya glutamat agonistlerinin neden olduğu nöronal ölümü ifade etmek için kullanılmıştır. Daha sonra bu terim endojen olarak ortaya çıkan glutamat aracılı nörotoksisite için de kullanılmaya başlanmıştır (92).

Marangos ve ark.'nın glutamate hipotezine göre nöronal toksisiteye bağlı hücre ölümü glutamat sentezindeki artıştan, glutamat geri alınımındaki veya yıkımındaki azalmadan, ya da eksitator nöronların inhibisyonundaki azalmadan kaynaklanmaktadır (92). Bu durumlar ortamdaki glutamat miktarını artırmakta ve önce ilerleyen bir nöron dejenerasyona, daha sonra da nöron ölümüne yol açmaktadır (89-92).

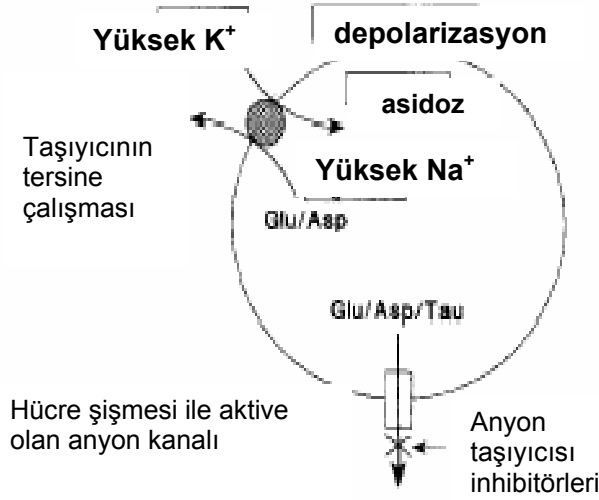
Normal glutamaterjik iletimde presinaptik sinir ucundan salınan glutamat sinaptik aralığı geçerek postsinaptik reseptörlerine bağlanarak onları uyarır. Glutamatın neden

olduğu sinaptik eksitasyon non-NMDA reseptörleri aracılığı ile olmaktadır. Aferent boşalımlarla uyarılan internöronlardan salınan glutamat da ikinci sıra nöronlarda NMDA reseptörleri aracılığıyla eksitasyona neden olur. Böylece hücre içi Ca^{2+} miktarı artarken PKC ve NOS aktivasyonu gerçekleşir (Bkz Şekil 9). Salınan NO, glutamat salınımını daha da artırır (146).



Şekil 9: Glutamat ve NO ilişkisi (146) PKC: protein kinaz C, NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentaz, Glu: Glutamat, CM: kalsiyum kalmodulin, GC: guanilat siklaz

Glutamatın etkisi eksitator sinyal perisinaptik glialarda bulunan glutamat re-uptake taşıyıcı protein tarafından sonlandırılır. Glutamat taşıyıcı sistemi anoksi/ hipoksiye yol açan durumlarda bozulur. Glutamat geri alımı için eksternal Na^+ ve internal K^+ a ihtiyaç vardır. Glutamat geri alınması Na/K gradienti ile doğrudan ilişkilidir. Hücre içi asidoz, hücre şişmesi, araşidonik asit ve serbest radikal oluşumu da astrositlere glutamat geri alımını inhibe etmektedir (Şekil 10) (88-92, 117). Hücresel pH yavaş yavaş asitleşirken, hücre dışında K^+ konsantrasyonu artar. Hücre dışı Na^+ ve Ca^{2+} azalır. K^+ artışı hücrelerin depolarizasyonuna ve yine glutamat salınımına neden olur (94). Fazla glutamat salıverilmesine bağlı olarak glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre içi Ca^{2+} artışı ve serbest radikal oluşumuyla nöron hasarına yol açmaktadır (16, 18, 88, 89, 92).

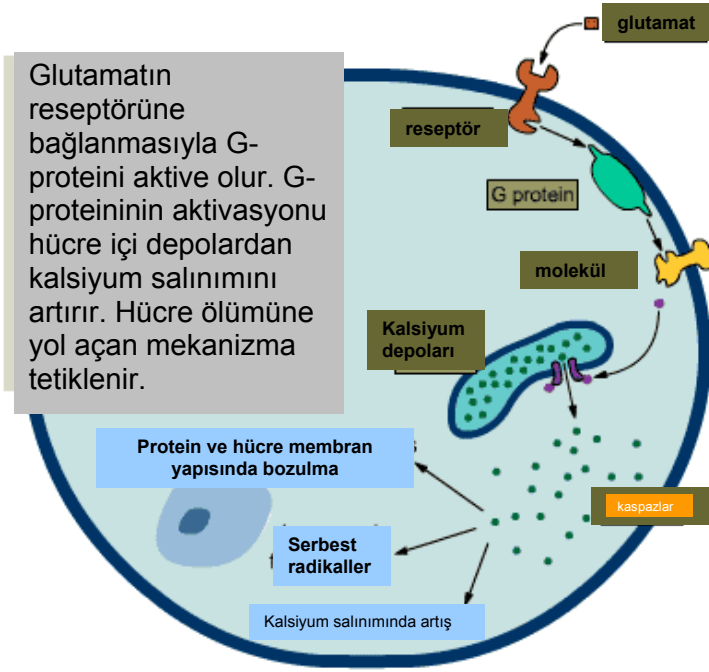


Şekil 10: Bir astrositten glutamat ve aspartatın glutamat/aspartat taşıyıcısının tersine dönerek salınması. Anyon kanalı hücrenin şişmesiyle aktive olur ve taşınma tersine döner. Glu, glutamat; Asp, aspartat; Tau,taurin.

Ca^{2+} nöronal uyarılabilirlik ve hücre içi ikinci haberci sistemlerin düzenlenmesi gibi normal hücresel süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyonu nöronlarda sıkı denetim altındadır. Hücre içi Ca^{2+} homeostazının bozulması glutamat toksisitesinde önemli rol oynar (Şekil 11). Ca^{2+} tamponlayan parvalbumin, calbindin gibi proteinlerdeki yetersizlik ya da bozulma toksisiteyi beraberinde getirir. Ca^{2+} mobilizasyonunun azaltılması dışında da ekzitotoksositeye karşı bir çok doğrudan ve dolaylı savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar glutamaterjik sinyali sınırlandırmaya yönelik hareket etmektedir (89-92).

Mitokondrinin en önemli görevleri hücre içi ATP yapımı, hücre içi Ca^{2+} artışının tamponlanması, hücre içi serbest radikal oluşumu ve apoptozun başlamasıdır. Mitokondriyal proteinler ve DNA serbest radikal hasarından zarar gören yapılardır. Serbest radikaller spesifik mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin inhibe edilmesinin yanı sıra, DNA hasarı da SSS toksisitesine zemin hazırlayan faktörlerdir. Mitokondrideki DNA onarım mekanizmalarının yetersizliği de olaya katkıda bulunmaktadır.

Özetle, glutamata bağlı nöronal hasarda hem eksitatör amino asit reseptörlerinin aşırı uyarılmasının, hem de serbest radikal oluşumunun rolü vardır.

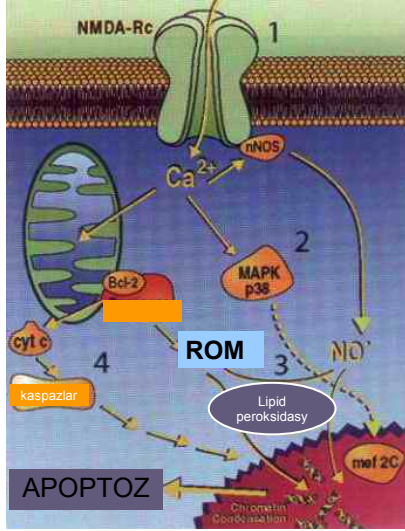


Şekil 7: Glutamata bağlı ekzitotoksitenin mekanizması

4.10.5. Glutamat Ve Oksidan Hasar

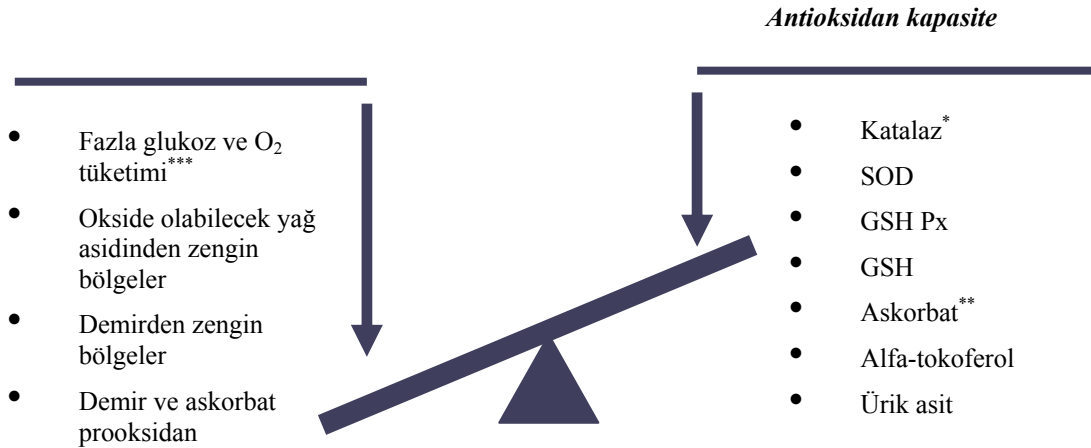
Birçok nörodejeneratif hastalıkta ortaya çıkan hasardan ROM'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir (24). Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre içi Ca^{2+} artışı ve serbest radikal oluşumuyla nöron hasarına yol açmaktadır (16, 18, 89). Dağınık bulunan glutamat reseptörlerinin yaygın aktivasyonu ve hücre içi serbest radikallerin oluşumu bu nöronal hasarda önemli rol oynar.

Nöronlar gibi replikasyonu olmayan hücrelerde oksidatif stress kümülatif olabilmektedir. Beyin dokusunda yapılan postmortem çalışmalar esas olarak protein ve DNA yapılarındaki biyokimyasal değişikliklerin varlığını göstermektedir.



Şekil 8: Glutamat ekzitotoksitesi sonucunda apoptoz oluşması

Bazı çalışmalarda oksidatif stress varlığında hücre içi antioksidan savunma sisteminin bileşenlerinin ekspresyonunda artış gibi nörokimyasal değişiklikler görülmesi, kompensasyon mekanizmalarının devreye girdiğini düşündürmektedir (88, 92). Ancak beyin, KBB ile korunmuş olmasına rağmen oksidan hasara karşı çok duyarlıdır (35). Bu durumda endojen antioksidan kapasitenin azlığı ve beyin yağ asidi, askorbat ve demirden zengin olması gibi yapısal faktörlerin rolü vardır (Şekil 13).



* İnsan beyindeki oran kalp ve karaciğerin %10-20'sidir.

** İnsan beyinde 1 mM, plazmada 62.4 µM bulunur.

*** Beynin oksijen tüketimi tüm vücudun harcadığının %20'sidir.

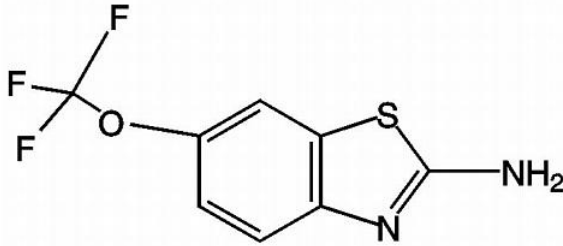
SOD: süperoksit dismutaz, GSH Px: glutatyon peroksidaz

Şekil 9: Beyinde Oksidatif Hasar (35)

4.11. Riluzol

Riluzol voltaj bağımlı Na⁺ kanallarını bloke ederek glutamat salıverilmesini inhibe eden nöron koruyucu bir ajandır (10, 49, 114). Riluzol glutamaterjik nöronlarda presinaptik olarak glutamat salınımını inhibe etmesinin yanısıra striatal sinaptozomlarda GABA geri-alınımını inhibe eder (2, 31). Glutamat salıverilmesini inhibe ettiği ve nöron koruyucu etkisi olduğu için, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığında görülen motor nöron hasarının ilerlemesini azaltmaktadır (43, 55, 67). ALS tedavisi için 1996'da FDA tarafından kullanımı onaylanmış ilk ve tek ilaçtır. Ülkemizde de yaklaşık 10 yıldır kullanılmaktadır.

Daha önce yapılmış çalışmalarda riluzolün myorelaksan, psikotropik, antikonvülsan, sedatif, hipnotik, anestezik, hipotermik, global iskemi modellerinde iskemik hasara karşı koruyucu ve anoksi ya da ekzitotoksik hasara karşı nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir (31, 63, 64, 90-92, 138). Sıçanlarda oluşturulan beyin travması modellerinde lezyonların yanı sıra nörolojik motor ve kognitif bozukluğu düzeltmektedir (55, 78, 138).



Şekil 10: Riluzol'ün (2-amino-6-(trifluoromethoxy) benzothiazole) kimyasal yapısı

4.11.1. Farmakokinetik Özellikleri

Oral verilen riluzolün absorpsiyonu oldukça iyidir (yaklaşık %90). Riluzolün mutlak biyoyaralanımı ortalama %60'dır. 12 saatte bir uygulandığında 25-100 mg arası dozlarda lineer farmakokinetik özellik gösterir. Yağlı besinler emilimini azaltır. Dolayısıyla aç karnına alınması gerekir. Tekrarlayan dozlarda ortalama t_{1/2} 12 saattir. Plazma proteinlerine, özellikle albumin ve lipoproteine yüksek oranda (%96) bağlanır. (http://www.rxlist.com/cgi/generic3/riluzole_cp.htm, güncelleme: 18.Ocak.2005). Radyoaktif işaretli riluzol (¹⁴C- riluzol) tek doz 50 mg uygulandığında, verilisi takip eden 1. saatte SSS'ndeki riluzol radyoaktivitesi plazmadakinin 3 katı olmaktadır (89).

Riluzolün 6 ana metaboliti vardır. Bunlardan bazıları da aktiftir. Daha fazla oranda karaciğerde sitokrom P-450 enzimlerinden CYP1A2 aracılığıyla N-hidroksilasyona uğrar ve glukronidasyon ile metabolize olur. Bunun dışında CYP2D6, CYP 2C19, CYP 3A4 and CYP 2E1 enzimleri de riluzol metabolizmasında görev almaktadır.

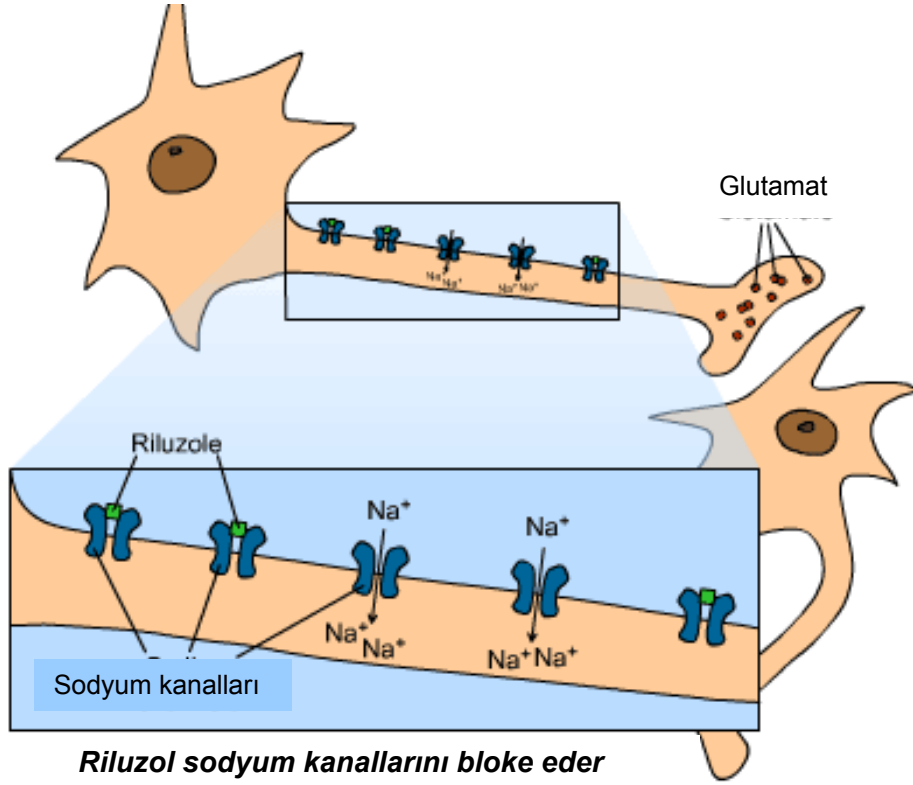
Tek sefer 150 mg dozda uygulanan ¹⁴C-riluzol radyoaktivitesinin %90'ı idrarda, %5'i dışkıda 7 günden fazla süreyle gözlenmiştir. Glukronitler idrardaki metabolitlerinin %85'ini oluşturur. Yalnızca %2'si idrarla değişmeden atılır.

Fare ve sıçanlar için kullanılan deneysel dozları 1-15 mg/kg arasında değişir. 15 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda doğrulma refleksinin kaybolmasına yol açar; anestezik etki gösterir. 4 mg/kg ip doz için E_{max} 40 dakikadır. Etkisi yaklaşık 3 saat devam eder (31).

4.11.2. Riluzolün Etki Mekanizması

Riluzolün başlıca etki mekanizması glutamaterjik impuls aşırımını bloke etmesidir (31, 67). Riluzol hücrelerinde hem bazal, hem de nöronal aktivasyon sonucu oluşan glutamik asit salınımını da presinaptik etkiyle ve yine pertussis toksine duyarlı bir mekanizmayla inhibe eder (2). Bunun yanı sıra striatal sinaptozomlarda GABA geri-alınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (128). Ayrıca farelerin beyin dokusunda amino asitlerle uyarılan nörotransmitter salınımını da inhibe ettiği ileri sürülmektedir (53). Riluzol hipoglossal motor nöronlarda yapılan in vitro çalışmalarda NMDA ve kainat reseptörlerinin uyarılması sonucu oluşan akımları inhibe ettiğinin görülmesi, etkisini bu reseptörler aracılığıyla yaptığı fikrinin ortaya atılmasına neden olmuştur (49). Ancak, daha sonra yapılan hiçbir reseptör bağlanma çalışmasında riluzolün NMDA, AMPA ya da kainat reseptörlerine bağlandığı gösterilememiştir (139). Buna ek olarak GABA, adenosin ve dopamin reseptörlerine de bağlanmamaktadır (129). Riluzolün presinaptik glutamat salınımını inhibe etmesinin yanı sıra ekzojen olarak uygulanan glutamat ile oluşturulan membran depolarizasyonunun amplitüdünü de azaltması postsinaptik etkilerinin dolaylı olduğunu iddiasını desteklemektedir (20). Nöron koruyucu etkide glutamat salınımının azaltılmasının yanı sıra voltaja bağımlı iyon kanallarının modülasyonu da önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (18, 90).

Riluzol glutamat salınımını inhibe eder



Riluzol sodyum kanallarını bloke eder

Şekil 11: Riluzolün etki mekanizması

Riluzol myelinli sinir liflerinde voltaj bağımlı Na⁺ kanallarını çok düşük konsantrasyonlarda bile bloke ederek nöronal depolarizasyonu önlemektedir (115). Na⁺ kanalları üzerindeki batrakotoksin-bağlanma bölgesine afinite gösterdiğinden depolarize nöronlarda da seçici etkisi vardır; aksiyon potansiyeli oluşumunu önlediği gösterilmiştir (10). Na⁺ kanal aktivatörü olan veratridin ile indüklenen eksitotoksisteyi riluzol hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda pertusis toksine bağımlı bir mekanizmayla önlediği bildirilmektedir (2, 114).

Riluzolün, sıçan serebellar granüler hücre kültüründe postsinaptik olarak glutamat ve NMDA reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak oluşan Ca²⁺ mobilizasyonunu yüksek dozlarda G proteinlerini inaktive eden pertusis toksine duyarlı bir mekanizmayla bloke ettiği gösterilmiştir (114, 115).

Riluzol glutamatin saliverilmesini önlemektedir. Ancak Urenjak ve ark. riluzolün fizyolojik durumdaki glutamatin veziküler eksitozunu değil, enerji deplesyonunda Na^+ ve Ca^+ kanalları aktive olmasıyla görülen glutamatin sitozolik efluksunu inhibe ettiği öne sürmüşlerdir (129). Na^+ ve Ca^+ kanallarını bloke eden ilaçların global serebral iskemi ve diğer modellerde nöron hasarını azalttığı gösterilmiştir (93). Ayrıca K^+ kanallarının aktivasyonu ve Cl^- kanallarının blokajının da bu etkilerine aracılık ettiği öne sürülmektedir (8, 65).

Riluzol hasar tehdidi durumlarında hücrenin direncini artırarak gösterdiği nöron koruyucu etkilerin yanısıra, onarım mekanizmalarını da devreye sokarak rejenerasyonu artırmaktadır (91). Fare astrosit hücre kültüründe riluzolün NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) ve GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor) gibi intrinsik nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (79). Özellikle NGF septal lezyonları takiben ödem oluşumunu azaltmaktadır (52). Farklı travma modellerinde ilk yarım saat içinde uygulanan riluzolün beyin ödemi ve lezyon oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (5, 101).

Riluzolün eksitoksisiteye bağlı olarak ortaya çıkan oksidan hasarı önlemesinin yanısıra in vitro bir çalışmada da kortikal nöron hücre kültüründe glutamat antagonistlerinin varlığında FeCl_3 ile oluşturulan noneksitotoksik oksidatif hasarı doğrudan önlediği gösterilmiştir (58, 82). Bir başka çalışmada da riluzolün sıçanlarda MPP (metil fenil piridinyum) ile oluşturulan parkinson modelinde indirekt olarak ATP tüketimini ve Fe-III ile oluşan lipid peroksidasyonunu azalttığı, dopaminerjik nöronları oksidan hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (116). Noneksitotoksik oksidan hasardaki koruyucu etkilerinde PLA_2 inhibisyonu ile araşidonik asit ve metabolitlerinin oluşumunu azaltmasının yanısıra, etkin bir PKC inhibisyonu yapmasının da rolü olduğu gösterilmiştir (87).

Sonuç olarak riluzolün etkisinde öne sürülen temel etki mekanizmaları şunlardır:

1. EAA reseptörleri ile dolaylı etkileşim
2. Glutamat salınımının presinaptik inhibisyonu (128)
3. GABA ile dolaylı etkileşim (46, 80)
4. Voltaj bağımlı Na^+ kanallarının blokajı ve daha yüksek dozlarda P/Q ve N tipi Ca^{2+} kanal blokajı (83, 91, 147)

5. K⁺ kanallarının aktivasyonu/modulasyonu (19, 65, 145, 147)
6. Nöronal NOS inhibisyonu (57)
7. Pertusis toksine duyarlı G-protein bağımlı sinyal transdüksiyonunun stimülasyonu (Wang 2004), PKA, PKC modulasyonu (83)
8. Antioksidan etki (59)

Bu mekanizmalardan ilk üçü sinerjist olarak glutamaterjik aşırımı baskılar. Ancak bu mekanizmaların birbirinden bağımsız olup olmadığı ya da ne şekilde birbirlerini modüle ettiği bilinmemektedir (31).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda deneysel sepsis modelinde antioksidan ve nöron koruyucu etkili bir ilaç olan riluzolün KBB geçirgenliği, oksidan hasar ve beyin morfolojisi üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Deney Hayvanları

Deneylerde her iki cinsten 300-350g ağırlığında Spaque Dawley sıçanlar kullanılmıştır.

Hayvanlar 12:12 saat aydınlık/karanlık siklusuna uyularak, 22 ± 3 °C sıcaklıkta ve %

65-70 nem içeren bir ortamda plastik kafeslerde barındırılmıştır. Standart laboratuvar

yemi ile beslenmişler ve su alımları serbest bırakılmıştır. Hayvanlar “Laboratuvar

Hayvanlarının Bakım ve Kullanım İlkeleri”ne uygun koşullarda barındırılmış ve

deneyler için etik kurul izni alınmıştır. Çalışmalar M.Ü. Eczacılık Fakültesi

Farmakoloji, Farmasötik Mikrobiyoloji ve M.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji & Embriyoloji

Anabilim Dallarının laboratuvarlarında yapılmıştır.

5.2. Deney Grupları

<i>Grup</i>	<i>Süre</i>	<i>n</i>
Kontrol (sham)	6 saat	8
	48 saat	8
Riluzol 6 mg/kg sc (Ril)	6 saat	8
	48 saat	8
Sepsis (Sep)	6 saat	8
	48 saat	8
Sepsis + Riluzol (Sep+Ril)	6 saat	8
	48 saat	8

Bu gruplar 3 seri olarak çalışılmıştır. Bir seride dokular transkardiyak fiksasyon perfüzyonundan sonra % 4 paraformaldehid çözeltisinde fikse edilerek ışık mikroskobu ile incelenmiştir. İkinci bir seride beyin ödemi ve kan-beyin bariyerinin geçirgenliği

değerlendirilmiştir. Diğer bir seride ise biyokimyasal tayinler yapılarak beyin homojenatlarında glutatyon (GSH) ve malondialdehid (MDA), düzeyleri ölçülmüştür.

5.3. Deneysel Sepsis Oluşturulması Ve İlaçların Uygulanması

Endojen olarak polimikrobiyal sepsis oluşturulması için klasik CLP (çekum ligasyonu & perforasyonu) yöntemi kullanılmıştır (36). Bu yöntemde Sprague Dawley sıçanlara tiyopental anestezisi altında (35 mg/kg ip) orta hattın 1.5-2 cm yanından 2 cm uzunluğunda insizyon yapılmış; ileoçekal valfin distalinden çekum USP 1 ipekle bağlanarak ve 18 G iğneyle 3 adet delik açılmıştır. Hafif sıkılarak, dışarıya feçes çıkarılmış ve peritona bulaştırılmıştır. Daha sonra USP 4/0 cerrahi ipek suture ile dikilerek batın kapatılmıştır. Dehidratasyonu önlemek amacıyla subkutan 5 ml/sıçan serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılmıştır. Cerrahi işlemten hemen sonra riluzol veya SF verilmiştir. Kontrol (sham) grubunun ise aynı şekilde batını açılarak çekum manipüle edilmiş; ancak başka bir işlem yapmadan geri kapatılmıştır. Hayvanlarda kilo, rektal ateş takibi ve nörolojik muayene yapılmıştır. Daha sonra 6 ve 48. saatlerde lökosit sayımı amacıyla kan alındıktan sonra dekapitasyon yapılarak beyin dokuları çıkarılmıştır. Hayvanlarda CLP yöntemiyle deneysel olarak oluşturulmuş olan sepsisin tedavisi amacıyla riluzol cerrahi işlemten hemen sonra ve 6 saat sonra olmak üzere iki kez 6 mg/ kg dozda sc yolla verilmiş; daha sonra riluzol günde 2 kez idame tedavisi olarak uygulanmıştır.

Tiyopental (Pental Na, İ.E. Ulagay) SF ile, riluzol (Sigma-RBI, R-116) ise distile suyla ultrasonik banyoda (Branson-221) 30 dakika karıştırılarak çözüldü. Tüm çözeltiler uygulamadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır. Hayvanlara ilaçların parenteral olarak sabit ve mümkün olan en düşük hacimde verilebilmesi için çözeltiler 0.1ml/ 100g hayvan ağırlığı olacak şekilde hazırlanmıştır.

5.4. Ölçülen Parametreler

5.4.1. Kilo Takibi

Hayvanlar deney öncesinde ve sepsis oluşumunu takiben 24. ile 48. saatlerde elektronik tartı (Shimadzu BX-3200H) ile tartılarak ağırlıklarındaki değişim tespit edilmiştir.

5.4.2. Rektal Ateş

Hayvanların rektal vücut ısısı deney öncesinde ve sepsis oluşumunu takiben 3., 6., 24. ve 48. saatlerde dijital termometre yardımıyla ölçülerek ateş takibi yapılmıştır.

5.4.3. Nörolojik Muayene

Hayvanlara sepsis oluşumunu takip eden 6. ve 48. saatlerde nörolojik muayene yapılmıştır. Nörolojik muayene Bederson ve arkadaşlarının oluşturduğu modifiye nörolojik skorlaması ile yapılmıştır (9). Bu skorlamada bilinç durumları, tırmanma yetenekleri, ekstremiteler tonuları ve ağrılı uyarana yanıtları değerlendirilmiştir. Puanlama sisteminde düşük skor (min. 0) hayvanın uyanık, aktif ve reflekslerinin normal olduğunu göstermektedir. Artan skorlar (max. 20) nörolojik bozukluğun meydana geldiğine işaret etmektedir. Ayrıntılı puanlama sistemi Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Bederson modifiye nörolojik muayene skorlaması

BİLİNÇ	<i>Normal</i> <i>Huzursuz</i> <i>Letarji</i> <i>Stupor</i> <i>Nöbet</i> <i>Ölüm</i>	0 1 2 3 4 5
TIRMANMA PLATFORMU	<i>Tırmanıyor</i> <i>Arka bacak üzerinde duruyor</i> <i>>5s asılı kalıyor</i> <i><5s asılı kalıyor</i> <i>Yakalama refleksi yok</i>	0 1 2 3 4
EKSTREMİTE TONUSU	<i>Normal</i> <i>Zayıf</i>	0 1
YÜRÜME	<i>Normal</i> <i>Pençe addüksiyon</i> <i>Hipomobilité</i> <i>Paretik tarafa dönme</i> <i>Ayakta duramıyor</i>	0 1 2 3 4
ROTASYON TESTİ	<i>>1s 180 derece</i> <i><1s 180 derece</i> <i>1-3s 90 derece</i> <i><1s 90 derece</i> <i>1-3s 45 derece</i> <i><1s 45 derece</i>	0 1 2 3 4 5
AĞRI YANITI	<i><1s uyarıya normal</i> <i>>1s uyarıya hipoaktif</i>	0 1
TOPLAM		0-20 arası

5.4.4. Lökosit Sayımı

Hayvanlardan deney öncesinde ve sepsis oluşumunu takiben 6. ve 48. saatlerde dekapitasyon öncesi %2 EDTA içeren tüplere kan alınmıştır. Alınan kan lökosit pipeti ile çekilerek %2 (v/v) glasiyel asetik asit (Sigma A6283) çözeltisiyle 20 kez seyreltildikten sonra Thoma lamına (hemositometre lamı) damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır. Işık mikroskopunda (Olympus CX-21FS1) 10 kat büyütme ile 16'şar kareden meydana gelen 4 alandaki lökositler sayılmıştır. Bulunan sayı 4'e bölünerek bir alan için ortalama değer bulunduktan sonra bu değer 200 katsayısı ile çarpılarak 1 mm³ kandaki lökosit sayısı hesaplanmıştır (33)

5.4.5. Beyin Ödemi

Beyin ödeminin değerlendirilmesi için beynin ıslak/ kuru su içeriği oranından yararlanılmıştır (70). Bu amaçla dekapitasyon ile çıkarılan beyinler darası alınan bir porselen kapsüle konularak hassas terazide (Mettler AE50) tartılır. Daha sonra 100°C etüvde 24 saat kurutulup tekrar tartılır.

% su içeriği= (ıslak-kuru)/ ıslak x100 formülü ile hesaplanır.

5.4.6. Oksidan Hasar Ve Savunma

Sepsis oluşturulduktan 6 ve 48 saat sonra dekapite edilen sıçanların beyin dokusunda oksidan hasarın bir göstergesi olarak lipid peroksidasyonu MDA miktarı üzerinden ölçülmüştür. Antioksidan savunma mekanizması ise GSH üzerinden ölçülmüştür.

5.4.6.1. MDA

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak beyin dokularında MDA miktarı Buege yöntemine göre tayin edilmiştir (11). Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan beyinler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutuldu, tartıldı. Ika Werk homojenizatöründe buz üstünde 150 mM KCl çözeltisiyle %10'luk homojenatı hazırlandı.

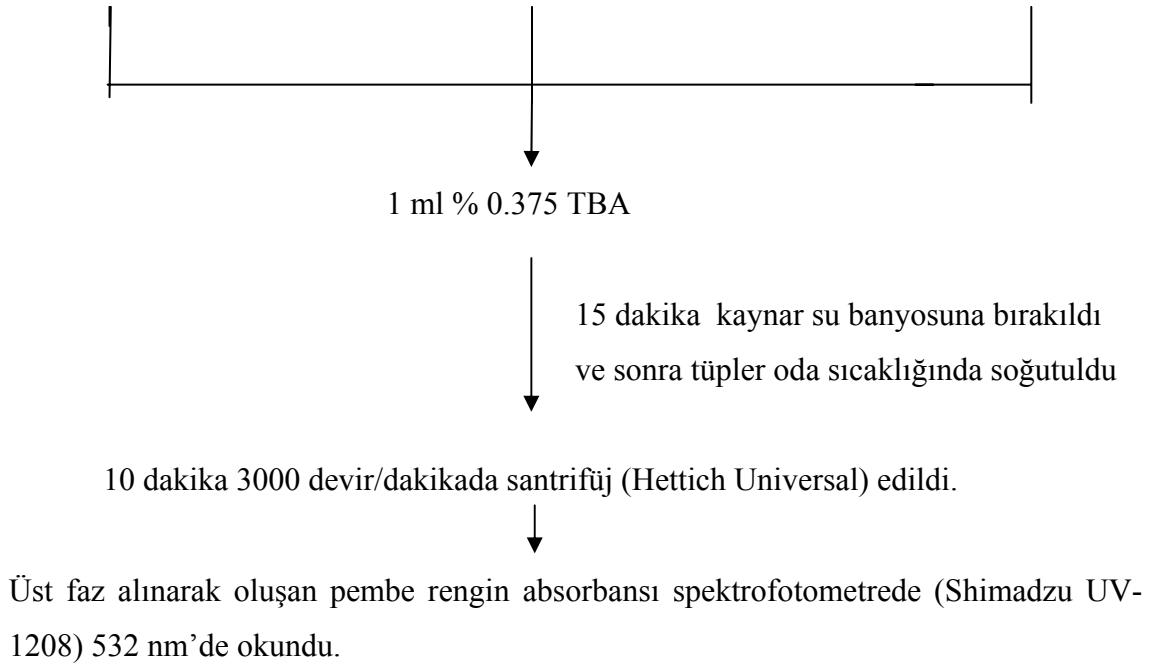
Gerekli Çözeltiler

TBA (2-Tiyobarbitürik asit, Sigma T5500) çözeltisi: % 0.375 g TBA ve % 15'lik TCA (Trikloroasetik asit) içeren çözelti, 0.25N HCl (Hidroklorik asit) ile hazırlandı.

Standart Çözeltisi: 1,1,3,3 tetraetoksipropan (malonaldehid bis [dietyl asetal], Sigma T9889)'ın 10 mM'lık stok çözeltisinden farklı seyreltmeler yapılarak standart çözelti hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kör	Standart	Numune
0.5 ml 150 mM KCl homojenat	0.5 ml standart çözeltisi	0.5 ml böbrek



5.4.6.2. GSH

Dokuda GSH tayini Ellman yöntemine göre yapıldı (12). GSH tayininde MDA tayini için hazırlanan % 10'luk homojenatlar kullanıldı.

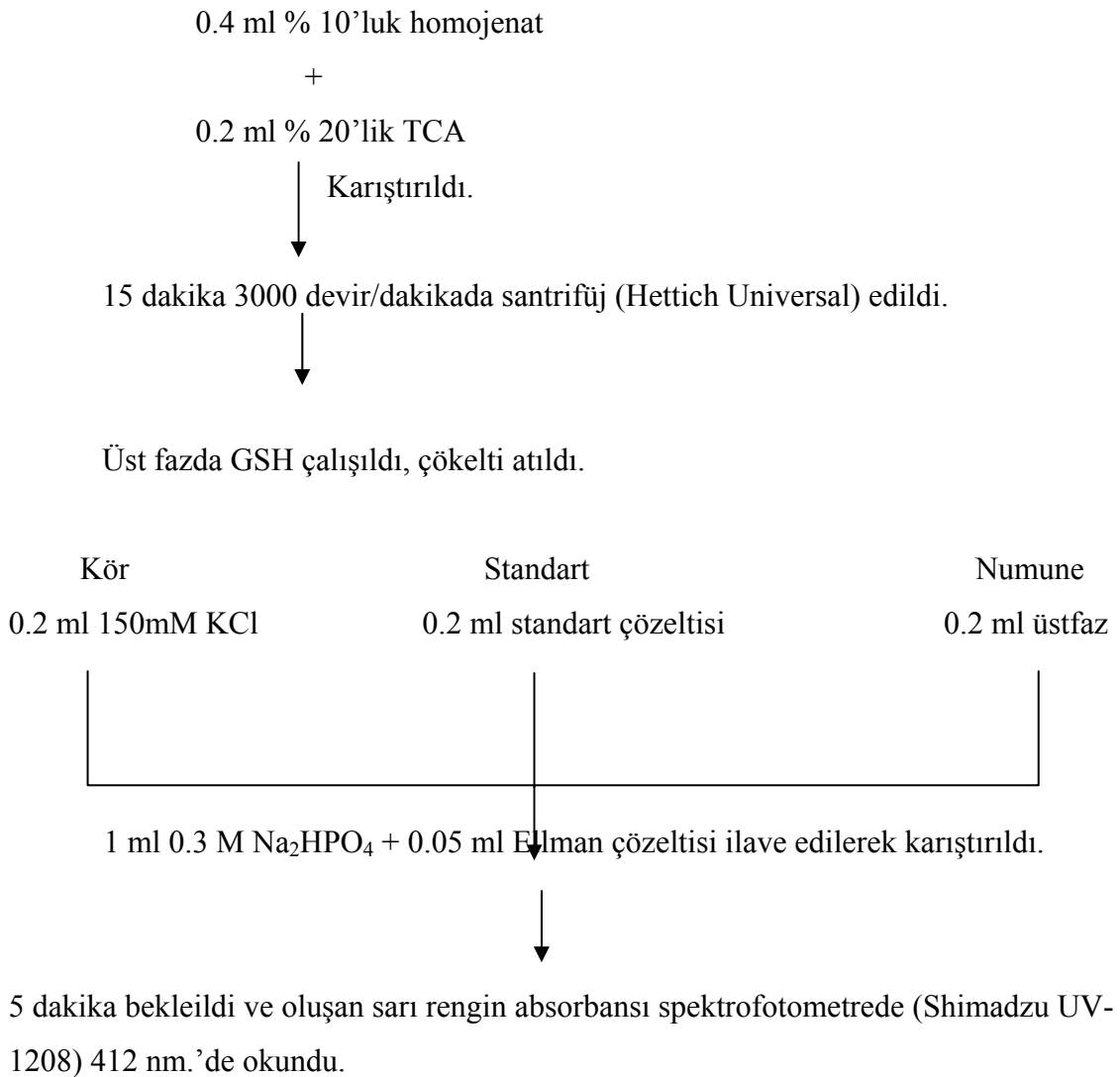
Gerekli Çözeltiler:

0,3M Na₂HPO₄ (Disodyum hidrojen fosfat, Carlo Erba 480137)

10mM DTNB (Ditiyo nitro benzen, Ellman, Sigma D8130): 39.63 mg DTNB % 1'lik sodyum sitrat ile 10 ml'ye tamamlandı.

% 20'lik TCA çözeltisi : Trikloro asetik asit (Carlo Erba 411525)

Standart glutatyon çözeltisi: 50 mg glutatyon (Sigma G4251) distile suda çözüldü, 5 ml'ye tamamlandı. Bu stoktan farklı seyreltmeler yapılarak standart çözelti hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:**5.4.7. KBB Geçirgenliği**

Sepsis oluşturulduktan sonraki 6. ve 48. saatlerde tiyopental anestezisi altında sıçanlara juguler venden %2'lik evans mavisi (EB) çözeltisi 4ml/kg dozda verilerek 30 dakika beklenmiştir. Daha sonra damar içindeki boya transkardiyak (sol ventriküle girilip, sağ atriyumuna çentik atılır) olarak verilen 110mmHg basınçlı yaklaşık 250 ml SF perfüzyonu ile 15 dakika yıkanmıştır. Sağ atriyumdan berrak sıvı geldiğinde perfüzyon sonlandırılmıştır. Beyinler hemen çıkarılarak tartıldı. Örnekler 2.5 ml pH 7.4 fosfat tamponu ile homojenize edilerek aşağıdaki prosedüre göre çalışıldı (34, 106).

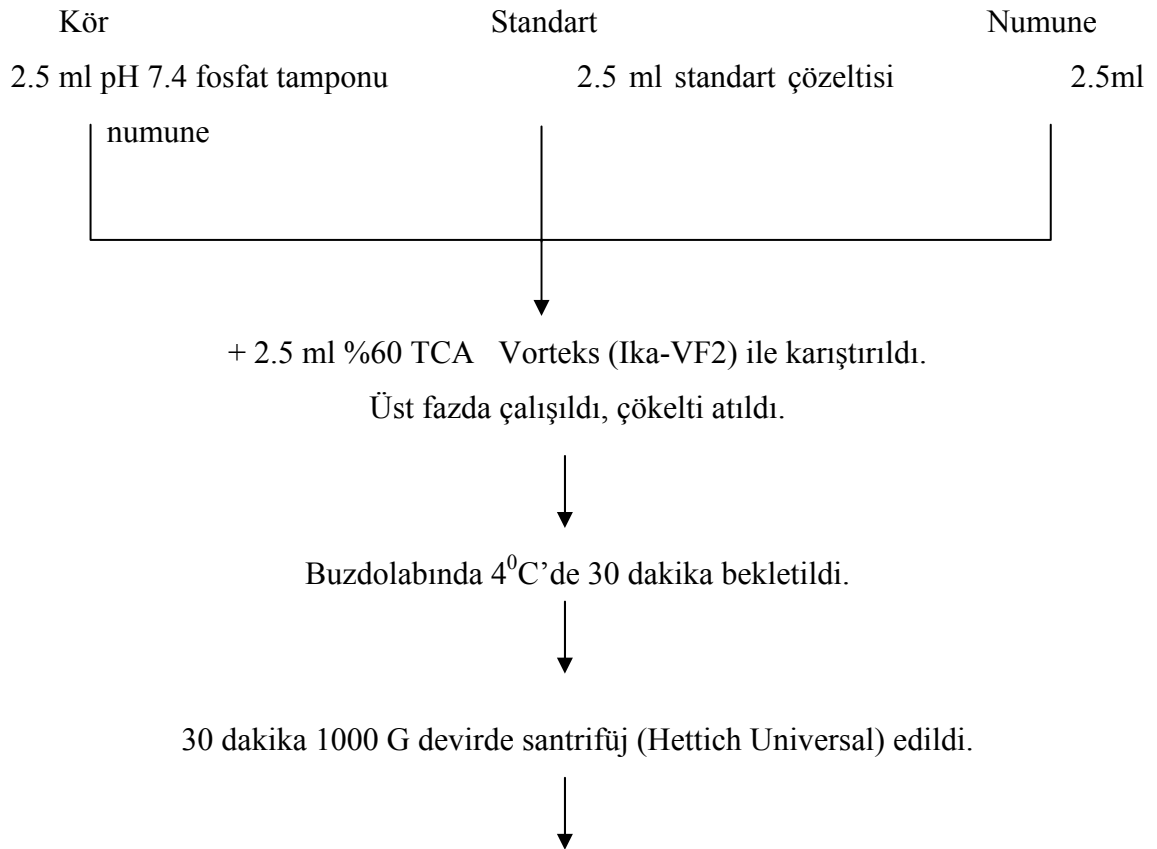
Gerekli Çözeltiler:

Standart Çözeltisi: Evans mavisinin (Sigma E2129) 10 µg/ml'lik stok çözeltisinden farklı seyreltmeler yapılarak standart çözelti hazırlandı.

0.1M Fosfat tamponu: 13.6g KH₂PO₄, 14.4g Na₂HPO₄, 2g KCl ve 9g NaCl suda çözülerek 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra pH 7.4'e ayarlandı.

% 60 TCA çözeltisi

Deneyin Yapılışı:



Üst faz alınarak oluşan rengin absorbanşı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) 620 nm’de okundu.

5.4.8. Histolojik İncelemeler

Histolojik incelemelerin yapıldığı erken (6 saat) ve geç dönem (48 saat) gruplarında sepsis oluşturularak 200ml %4 para-formaldehid (Sigma P6148) (pH 7.4 fosfat tamponu içindeki çözeltisi) ile 110mmHg basınçla 10 dakikalık transkardiyak (sol ventriküle girilip, sağ atriyauma çentik atılarak) fiksasyon perfüzyonu yapılmıştır. Ense sertleştiğinde perfüzyon sonlandırılmıştır. Fikse edilmiş beyin dokusundan koronal düzlemde 40 µm kalınlığında kesitler alınarak %1 kretil viyole ile boyanmıştır. Serebral ve serebellar korteksler tedavi gruplarından habersiz deneyimli histologlar tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BH-12, Japan) incelenmiş ve semikantitatif mikroskopik skorlama yapılmıştır. Histolojik skorlama aşağıdaki kriterlere göre yapılmıştır. Toplam skor bu iki kriterden alınan puanların toplamıdır. Her bir örnekte en az 5 alan incelenerek skorlama yapılmıştır.

- ***İnflamasyon:*** Periselüler, vasküler ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (0-3 arasında) değerlendirildi. (0:yok, 1:hafif, 2:orta, 3:ağır)
- ***Hücre hasarı:*** Alan başına düşen hasarlı nöron skoru (0-3 arasında) değerlendirildi. (0:yok; 1:1-3 hücre; 2:4-6 hücre; 3:7-10 hücre)

5.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmanın verileri ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Tüm testlerde $P < 0.05$ hata istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Testler bilgisayarda Graph-Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, 2003, San Diego; CA; USA) bilgisayar istatistik programı kullanılarak yapılmıştır.

Aynı hayvanların sepsis öncesi ve sonrası değerleri karşılaştırılırken tekrarlanan ölçümlere yönelik ANOVA testi kullanılmıştır. Grupların karşılaştırılmasında ise tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Doğrulama testi olarak da Tukey’in çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır.

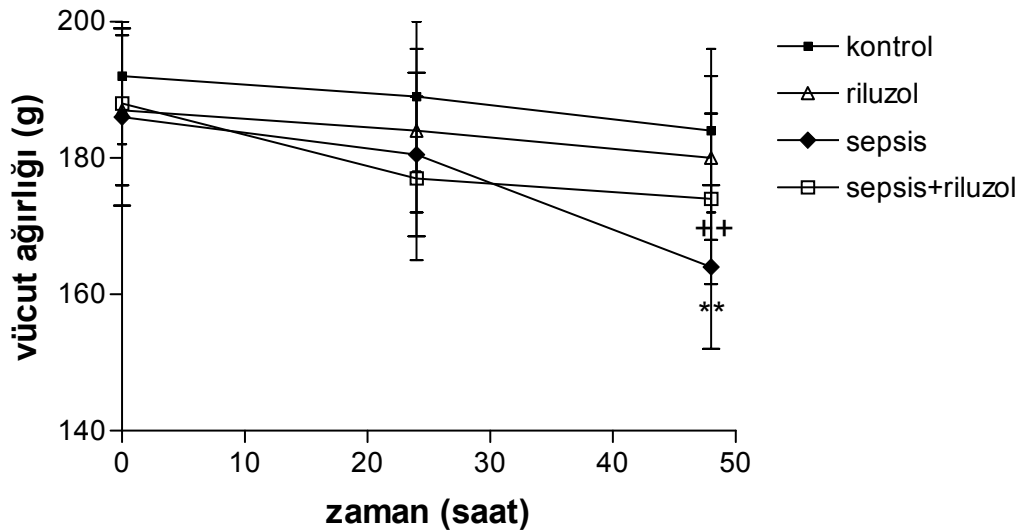
6. BULGULAR

6.1. Sağkalım

24 saatlik sağkalım sepsis grubunda % 50 (23/46), riluzolde ise % 75 (33/44), 48 saatlik sağkalım sepsis grubunda %25 (18/72), riluzol grubunda % 50 (19/38) olarak bulunmuştur (Şekil 16).

6.2. Kilo

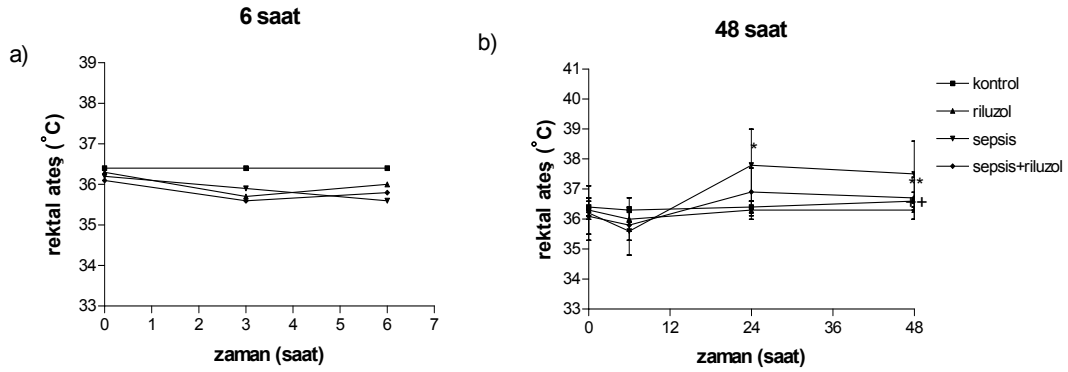
Cerrahi olarak sepsis oluşturulmasından sonraki 48 saat boyunca yapılan kilo takibinde 24. saatten sonra hayvanların vücut ağırlıklarında yaklaşık 10 gram (total vücut ağırlığının %7'si) kadar kilo kaybı gözlenmiştir. Ancak bu kayıp istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sepsis grubunda 48. saatte kaybedilen kilo miktarı 24 saatteki oranın iki katına çıkmaktadır ($p<0.01$). Riluzol uygulanan grupta da kilo kaybı olmakla birlikte sepsis grubuyla karşılaştırıldığında daha azdır ($p<0.01$) (Şekil 16).



Şekil 16: Deney hayvanlarının 48 saatlik kilo takibi. ANOVA tekrarlayan ölçümler testi; **: $p<0.01$, başlangıç ağırlığıyla karşılaştırma; ++: $p<0.01$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.3. Rektal Ateş

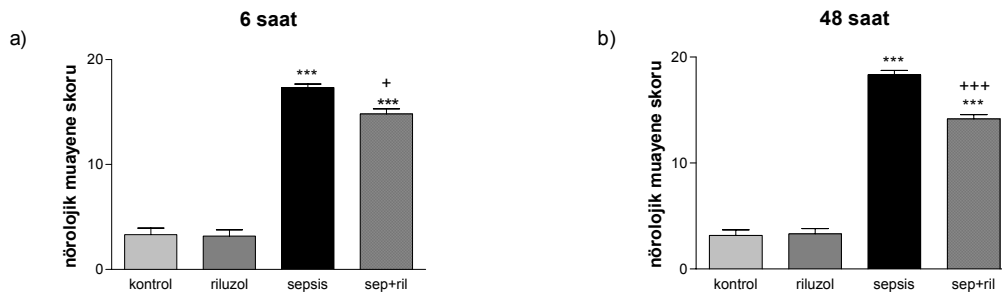
Sepsis oluşturulmasını takip eden ilk 3 saatte vücut ısısında anesteziye bağlı olması muhtemel hafif bir düşme (yaklaşık 1°C) gözlenmiştir. Bu düşüş sonraki 3 saatte de devam etmiştir. Cerrahi işlemin 24. saatinde ise sepsis grubunda rektal vücut ısısında bir artış meydana gelmiştir ($p<0.05$). Riluzol uygulaması bu artışı baskılamıştır ($p<0.01$) (Şekil 17).



Şekil 17: Deney hayvanlarının a) erken dönem, b) geç dönem rektal ateş değişiklikleri. ANOVA tekrarlayan ölçümler testi; *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, başlangıç değeriyle karşılaştırma; ++: $p<0.01$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.4. Nörolojik Muayene

Erken ve geç dönemde Bederson nörolojik muayene skoru sepsiste de, sepsis+ riluzol tedavi grubunda da yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Riluzol tedavisi nörolojik muayene skorunu bir miktar azaltmakla ($p<0.05$, 6. saat; $p<0.001$, 48. saat) birlikte kontrol düzeylerine yaklaştıramamıştır (Şekil 18).

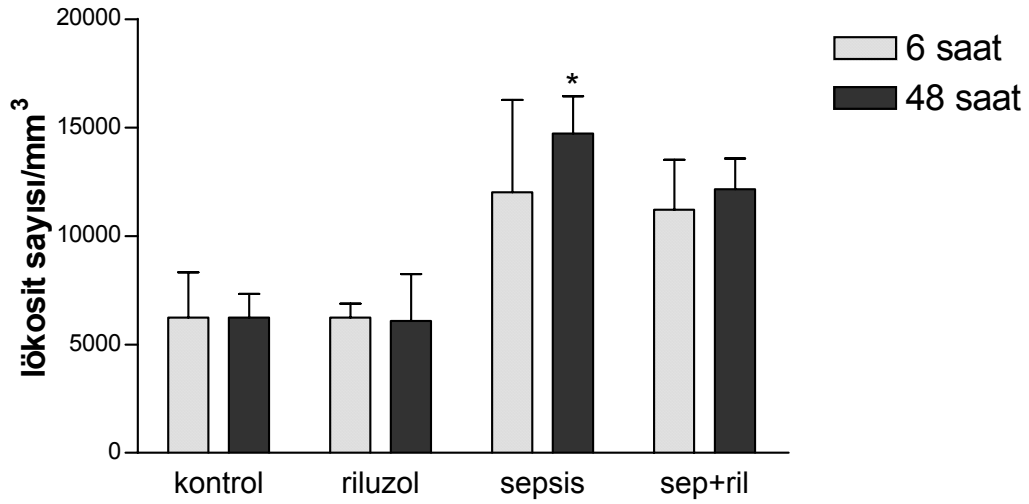


Şekil 18: Deney hayvanlarının a) erken dönem, b) geç dönem Bederson nörolojik muayene skorları. Tek yönlü ANOVA testi; ***: $p<0.001$, kontrol grubu ile

karşılaştırma; +: $p<0.05$, +++: $p<0.001$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.5. Lökosit Sayımı

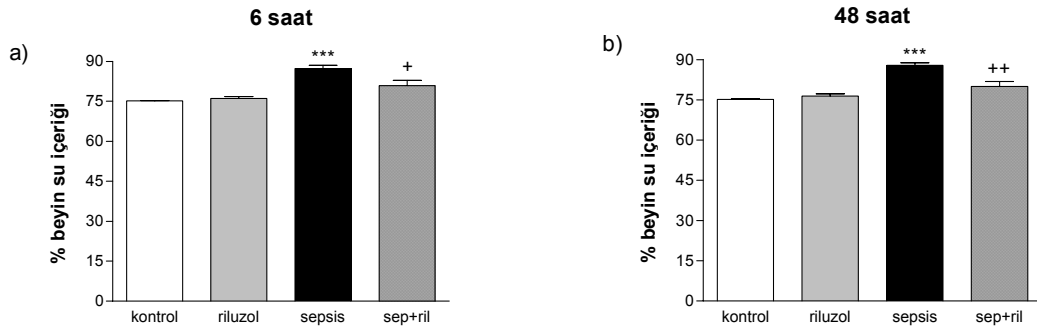
Sepsis oluşturulmasını takip eden 6. ve 48. saatlerde alınan kan örneklerinde lökosit sayımı yapıldığında, lökosit sayısı yalnızca 48. saatte yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Her iki zaman aralığında da lökosit sayısında genel bir artış olmakla birlikte, hayvanlar arasında değişkenlik mevcuttur. Bunun sebebi muhtemelen, sepsise bağlı olarak bazı hayvanlarda lökositoz, bazılarında ise lökopeni gözlenmesidir. Riluzol uygulaması artan lökosit sayısında bir değişiklik oluşturmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 19).



Şekil 19: Deney hayvanlarının a) erken dönem, b) geç dönem lökosit sayıları. Tek yönlü ANOVA testi; *: $p<0.05$ kontrol grubuyla karşılaştırma

6.6. Beyin Ödemi

Sepsis oluşturulan hayvanlarda beyin su içeriği erken ve geç olarak her iki dönemde de artmıştır (Şekil 20a ve 20b). Riluzol uygulaması beyin ödemi her iki dönemde de azaltarak kontrol düzeyine yaklaştırmıştır ($p<0.05$; $p<0.01$).

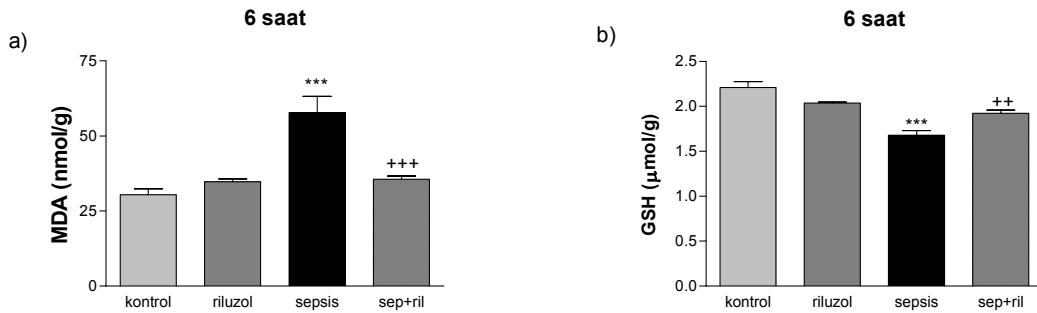


Şekil 20: Deney hayvanlarının a) erken dönem, b) geç dönem beyin su içerikleri. Tek yönlü ANOVA testi; ***: $p<0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırma; +: $p<0.05$, ++: $p<0.01$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.7. MDA VE GSH

6.7.1. Erken Dönem

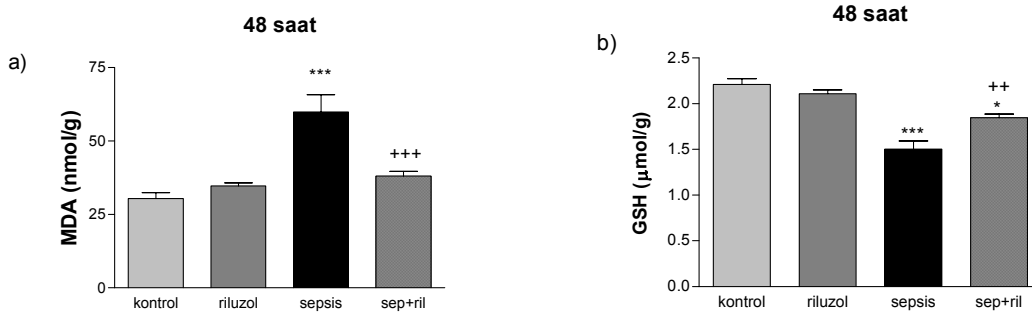
Lipid peroksidasyonunun ve oksidan hasarın bir göstergesi olan MDA düzeyi sepsis oluşturulmasını takip eden 6. saatte artış gösterirken ($p<0.001$), GSH düzeyi de paralel olarak azalmıştır ($p<0.001$). Riluzol uygulaması lipid peroksidasyonunu hemen hemen kontrol seviyelerine düşürürken, GSH düzeyindeki azalmayı da önlemiştir (Şekil 21a ve 21b).



Şekil 21: Deney hayvanlarının erken dönemde (6 saat) beyin dokusunda a) malondialdehid (MDA), b) Glutatyon (GSH) içeriği. Tek yönlü ANOVA testi; ***: $p<0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırma; ++: $p<0.01$, +++: $p<0.001$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.7.2. Geç Dönem

Lipid peroksidasyonunun ve oksidan hasarın bir göstergesi olan MDA düzeyi sepsis oluşturulmasını takip eden 48 saatte artış gösterirken ($p<0.001$), GSH düzeyi de paralel olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 20a ve 20b). Riluzol uygulaması lipid peroksidasyonunu hemen hemen kontrol seviyelerine düşürmüştür. GSH düzeyi kontrolden daha düşük olmakla birlikte sepsis grubundan daha yüksektir ($p<0.01$) (Şekil 22a ve 22b).

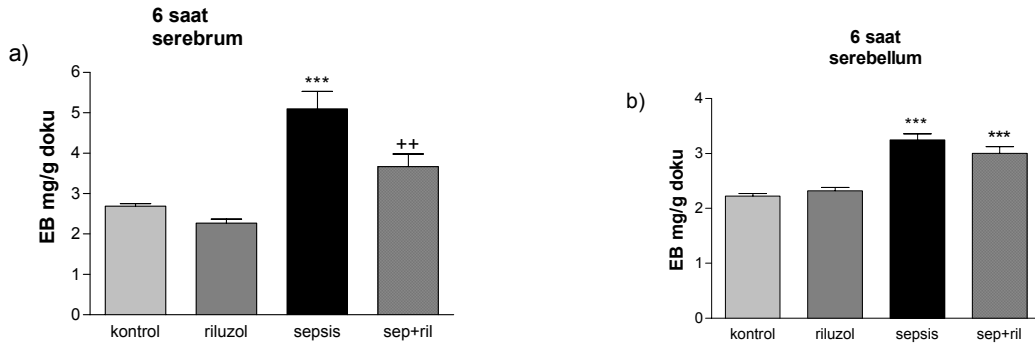


Şekil 22: Deney hayvanlarının geç dönemde (48 saat) beyin dokusunda a) malondialdehid (MDA), b) Glutasyon (GSH) içeriği. Tek yönlü ANOVA testi; *: $p<0.05$, ***: $p<0.001$, , kontrol grubu ile karşılaştırma; ++: $p<0.01$, +++: $p<0.001$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.8. KBB Geçirgenliği

6.8.1. Erken Dönem

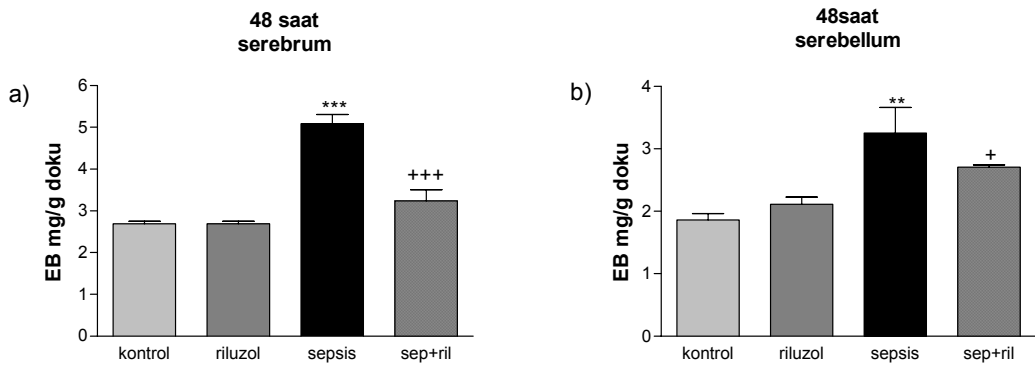
Sepsis oluşturulan hayvanlarda KBB geçirgenliğindeki artışın göstergesi olarak gram dokudaki EB miktarı hem serebrumda, hem de serebellumda anlamlı olarak artmıştır. Riluzol uygulaması ise serebrumdaki artışı azaltırken ($p<0.01$), serebellumdaki artışa etki etmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 23a ve 23b).



Şekil 23: Deney hayvanlarının erken dönemde (6 saat) a) serebral, b) serebellar beyin dokusunda kan-beyin bariyeri geçirgenlik artışının Evans mavisi (EB) ile değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA testi; ***: $p<0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırma; **: $p<0.01$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.8.2. Geç Dönem

Sepsis oluşturulan hayvanlarda geç dönemde KBB geçirgenliğindeki artışın göstergesi olarak gram dokudaki EB miktarı hem serebrumda, hem de serebellumda artmıştır ($p<0.001$, $p<0.01$). Riluzol uygulaması ise hem serebrumdaki, hem de serebellumdaki artışı azaltmıştır ($p<0.001$, $p<0.05$) (Şekil 24a ve 24b).



Şekil 24: Deney hayvanlarının geç dönemde (48 saat) a) serebral, b) serebellar beyin dokusunda kan-beyin bariyeri geçirgenlik artışının Evans mavisi (EB) ile değerlendirilmesi. Tek yönlü ANOVA testi; ***: $p<0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırma; +: $p<0.05$, sepsis ve sepsis+riluzol grubunun karşılaştırılması

6.9. Histolojik İncelemeler

6.9.1. İnflamasyon Ve Hücre Hasarı

Serebrum ve serebellumdan alınan kesitlerde yapılan histolojik incelemelerde sepsisin her iki bölgede de 6. saatte gözlenebilen (Tablo 6, 7) ve 48. saatte şiddetlenen (Tablo 8, 9) inflamasyon ve nöron hasarı oluşturduğu bulunmuştur. Riluzol tedavisi bu inflamasyon ve hasarı tamamen ortadan kaldırmamakla birlikte yoğunluğunu azaltmıştır.

6.9.1.1. Erken Dönem

Tablo 6: Kortekste erken dönemde (6 saat) inflamasyon (0-3) ve hücre hasarı (0-3) skorlaması. (Tüm gruplarda n=8). *Inflamasyon:* Periselüler, vasküler ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (0:yok, 1:hafif, 2:orta, 3:ağır); *Hücre hasarı:* Alan başına düşen hasarlı nöron skoru (0:yok; 1:1-3 hücre; 2:4-6 hücre; 3:7-10 hücre)

	Kontrol	Riluzol	Sepsis	Sepsis+Riluzol
İnflamasyon	0	0	2	1
Hücre hasarı	0	0	2	1
Toplam	0	0	4	2

Tablo 7: Serebellumda erken dönemde (6 saat) inflamasyon (0-3) ve hücre hasarı (0-3) skorlaması. (Tüm gruplarda n=8). *Inflamasyon:* Periselüler, vasküler ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (0:yok, 1:hafif, 2:orta, 3:ağır); *Hücre hasarı:* Alan başına düşen hasarlı nöron skoru (0:yok; 1:1-3 hücre; 2:4-6 hücre; 3:7-10 hücre)

	Kontrol	Riluzol	Sepsis	Sepsis+Riluzol
İnflamasyon	0	0	2	1
Hücre hasarı	0	0	2	1
Toplam	0	0	4	2

6.9.1.2. Geç Dönem

Tablo 8: Kortekste geç dönemde (48 saat) inflamasyon (0-3) ve hücre hasarı (0-3) skorlaması. (Tüm gruplarda n=8). *Inflamasyon:* Periselüler, vasküler ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (0:yok, 1:hafif, 2:orta, 3:ağır); *Hücre hasarı:* Alan başına düşen hasarlı nöron skoru (0:yok; 1:1-3 hücre; 2:4-6 hücre; 3:7-10 hücre)

	Kontrol	Riluzol	Sepsis	Sepsis+Riluzol
İnflamasyon	0	0	3	1
Hücre hasarı	0	0	3	1
Toplam	0	0	6	2

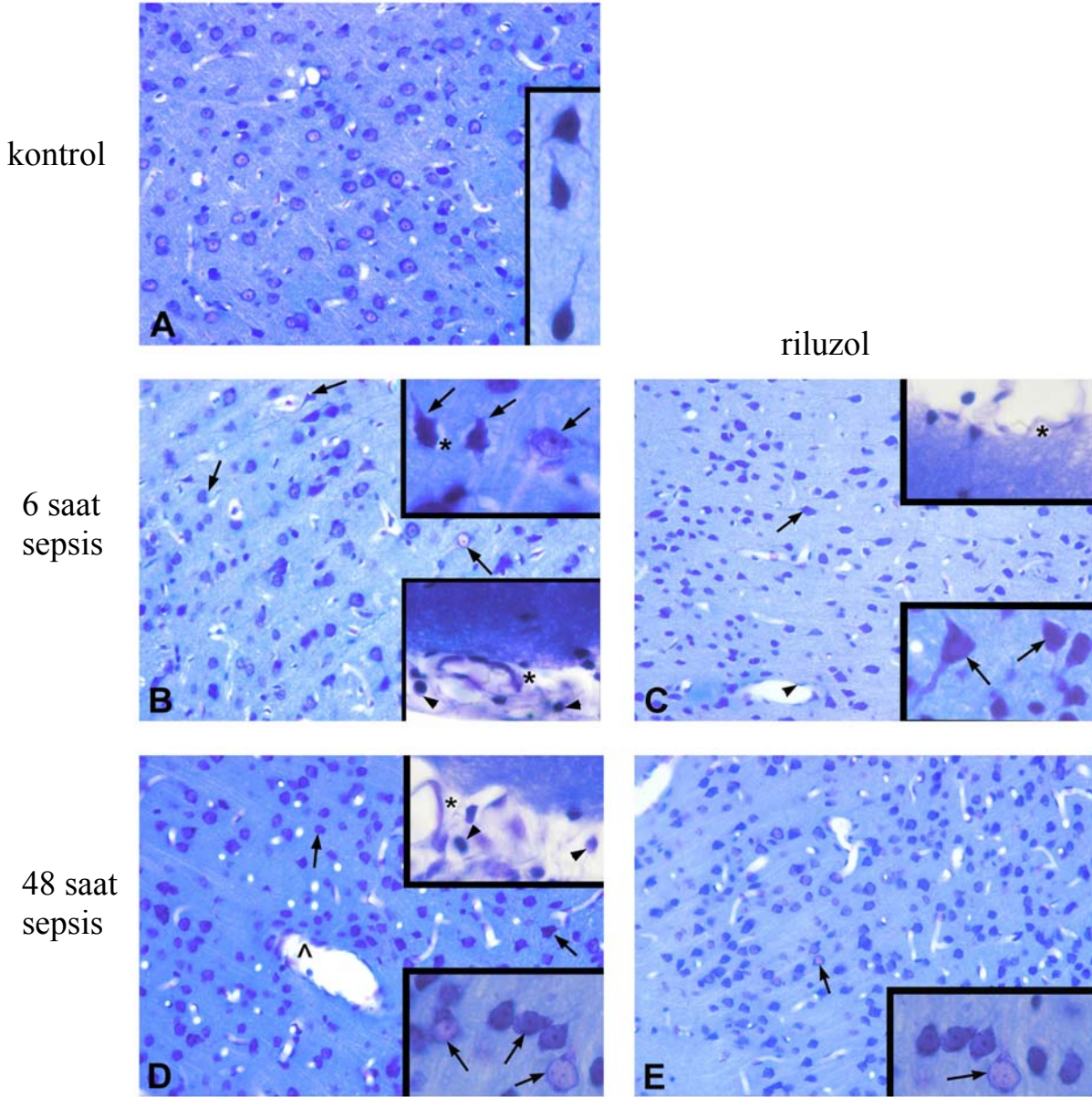
Tablo 9: Serebellumda geç dönemde (48 saat) inflamasyon (0-3) ve hücre hasarı (0-3) skorlaması. (Tüm gruplarda n=8). *Inflamasyon:* Periselüler, vasküler ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (0:yok, 1:hafif, 2:orta, 3:ağır); *Hücre hasarı:* Alan başına düşen hasarlı nöron skoru (0:yok; 1:1-3 hücre; 2:4-6 hücre; 3:7-10 hücre)

	Kontrol	Riluzol	Sepsis	Sepsis+Riluzol
İnflamasyon	0	0	3	1
Hücre hasarı	0	0	3	1
Toplam	0	0	6	2

6.9.2. Morfolojik İnceleme

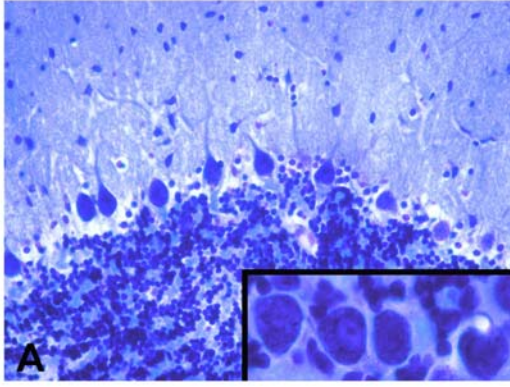
Kontrol grubunda hem serebral (Resim 1A), hem de serebellar kortekste (Resim 2A) düzenli morfoloji gözlenmiştir. 6 saatlik sepsis grubunda serebrumda (Resim 1B) ağır nöron hasarı, periselüler ve perivasküler ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenirken serebellumda (Resim 2B) purkinje hücrelerinde ağır hasar ve periselüler ödem mevcuttur. 48 saatlik sepsis grubunda serebral korteks dejenerasyonu daha da ağırlaşmıştır. Dejenere olan piramidal nöronların sayısı artmıştır. Vasküler ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu da artış gösterirken, kapiller endotel hasarı daha da

belirginleşmiştir (Resim 1D). Serbellumda da hasarlı purkinje hücrelerinin sayısı artmış ve kapiller dejenerasyon gözlenmiştir. Riluzol tedavisi uygulanan 6 ve 48 saatlik her iki grupta da hem serebral (Resim 1C, E), hem de serebellar korteksteki (Resim 2C, 2E) dejenerasyon orta düzeydedir.

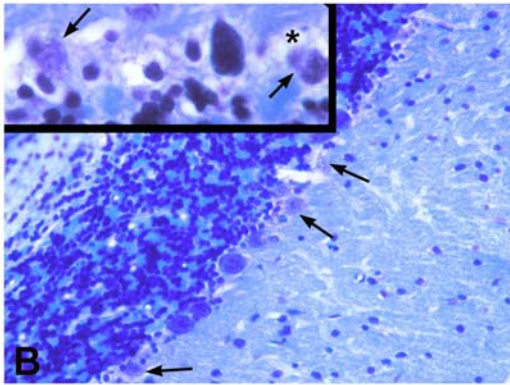


Resim 1: Kontrol grubunda (A) düzenli serebral korteks morfolojisi gözlenmiştir. Hasarlı nöronlar (➔), periselüler and perivasküler ödem (*), ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➤) 6 saatlik sepsis grubunda (B) gözlenmiştir. Oldukça ağır olan bu hasarın yanısıra 48 saat grubunda (D) vasküler endotelial dejenerasyon (^) da görülmektedir. 6 ve 48 saatlik riluzol tedavi gruplarında (C) ve (E) birçok bölgede normal nöronlar (➔) ve hafif vasküler ödem (*) mevcuttur. Krezil viyole boyaması, orijinal büyütme: x200, iç resimler: X400.

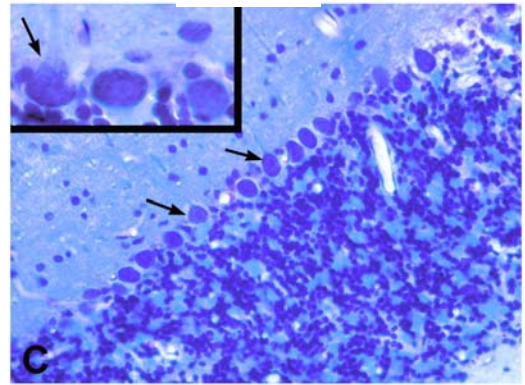
kontrol



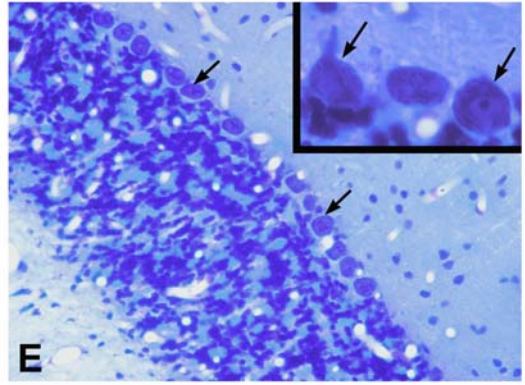
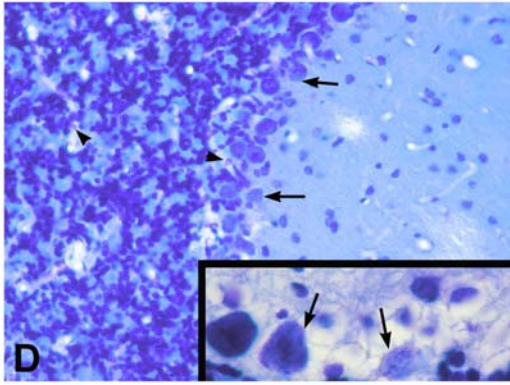
6 saat
sepsis



riluzol



48 saat
sepsis



Resim 2: Kontrol grubunda (A) düzenli serebral korteks morfolojisi gözlenmiştir. 6 saatlik sepsis grubunda (B) mevcut olan hasarlı purkinje hücreleri (➔), periselüler ödem (*), ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➤), 48 saatlik sepsis grubunda (D) daha da ağırdır. 6 ve 48 saatlik riluzol tedavi gruplarında (C) ve (E) birçok bölgede normal purkinje hücreleri (➔) gözlenmiştir. Krezil viyole boyaması, orijinal büyütme: x200, iç resimler: X400.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvanlarda CLP modeliyle deneysel olarak oluşturulan sepsis, vücutta 6. saatten itibaren belirgin değişiklikler oluşturmaktadır. Bu değişiklikler 48. saatte daha da açığa çıkmakta ve birçok yönden geri dönüşümsüz olmakta ve oldukça önemli bozukluklara yol açmaktadır. Özellikle geç dönemde ortaya çıkan değişiklikler sağkalımı ve hastalığın seyrini olumsuz etkilemektedir.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak (97) sepsis grubunda 24 saatte % 50 olan sağkalım oranı 48. saatte %25'e düşmüştür. Riluzol tedavisiyle ise sağkalım oranı 24. saatte % 75'e, 48 saatte % 50'ye yükselmiştir. Riluzol tedavisinin sağkalımı yaklaşık %25 oranında artırdığı görülmektedir.

Sepsis oluşturulmasını takip eden 6. ve 48. saatlerde alınan kan örneklerinde lökosit sayımı yapıldığında her iki zaman aralığında da lökosit sayısında genel bir artış olmakla birlikte hayvanlar arasında bireysel değişkenlik görülmüştür. Bunun sebebi muhtemelen sepsise bağlı olarak bazı hayvanlarda lökositoz, bazılarında ise lökopeni gözlenmesidir (66). Riluzol uygulaması artan lökosit sayısında bir değişiklik oluşturmamıştır. Ancak genel olarak sağkalımı artırmış ve hastalığın seyrini histolojik, biyokimyasal ve davranışsal parametreler açısından iyileştirmiştir.

Sepsis oluşturmak için yapılan anesteziyi takiben hayvanlarda vücut sıcaklığında 3. saate kadar devam eden düşme gözlenmiştir. Riluzol uygulaması bu artışı baskılamıştır. Bu etki kısmen anestezie bağlı olmakla birlikte, riluzolün de payı olması muhtemeldir. Zira glutamatın hipertermik etkisi olduğu ve glutamat antagonistlerinin de hipotermik etki gösterdiği bilinmektedir (112). Hipoterminin glutamat salınımını ve sitotoksik ödem oluşumunu azaltarak nöron koruyucu etki gösterdiği bildirilmektedir (69). Hatta son yıllarda yapılan birçok çalışmada sinir sistemi ile ilgili travma ve iskemi durumlarında hafif hipotermi oluşturulması önerilmektedir (69). Ayrıca çeşitli ajanlarla serbest radikal oluşumunun önlenmesi de LPS ile indüklenen ateşi baskılamaktadır (103). Riluzol hem glutamat salınımını inhibe ettiği için, hem de dolaylı olarak antioksidan etki gösterdiği için muhtemelen sepsise bağlı ateş yükselmesini baskılamaktadır.

Sepsis yalnızca parenkimal organlarda değil, aynı zamanda periferik sinirlerde ve iskelet kaslarında da hasara yol açabilmektedir (50, 51). Sepsis ile ilişkili aksonal polinöropati ve myopati bazı vakalarda kalıcı motor bozukluğa neden olmaktadır (14, 50, 51). Ayrıca sepsiste ortaya çıkan nörolojik bozukluğun serebellumdaki hasar ile ilişkili olması muhtemeldir. Çünkü bilindiği gibi serebellum kas ve tendon gerilimindeki değişikliklere duyarlı bir bölge olup denge, istemli ve refleks hareketleri kontrol eden merkezdir. Çalışmamızda Bederson yöntemiyle yaptığımız nörolojik muayenede değerlendirilen ekstremita tonusu, tırmanma platformundaki performans, postural durum ve ağırlı uyarana cevap gibi refleksler serebellumla doğrudan ilişkilidir (9). Bulgularımız riluzol tedavisinin nörolojik muayene skorunu iyileştirdiğini göstermektedir. Riluzolün nörolojik muayene skorunu iyileştirmesinde glutamat salınımını engelleyerek motor nöronlardaki hasarı önleyici rolü olması muhtemeldir (137, 138). Bilindiği üzere riluzol esas olarak ALS hastalığında motor sinirlerde nöron koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır (31, 139). Ayrıca riluzolün beyin ve omurilik travması modellerinde lezyonların yanı sıra nörolojik motor ve kognitif bozukluğu düzelttiği bildirilmiştir (55, 78, 138).

Sepsis oluşturulmasını takiben hayvanlarda kilo kaybı gözlenmektedir. Özellikle geç dönemde sepsise bağlı görülen bu kilo kaybında hayvanların septik şoka girmesinin yanı sıra, kısmen nörolojik muayene skorundaki bozulmanın da katkısı olabilir. Nörolojik muayenede gözlenen lokomotor aktivitedeki azalmanın hayvanların beslenme davranışını azaltarak beslenme bozukluğuna ve bunun sonucunda da kilo kaybına yol açmış olabileceği düşünülebilir.

Septik şok ve çoklu organ yetmezliği sendromunun patogenezinde dolaşımdaki katekolaminlerin artışı, sitokin oluşumu, ökazonoid sentezinin artışı, NO salınması, ROM'nin açığa çıkması gibi birçok mekanizma rol oynamaktadır (30). $O_2^{\bullet-}$ ve $ONOO^-$ birçok inflamatuvar durumda olduğu gibi sepsiste de önemli rol oynamaktadır. Sepsiste organlarda (kalp, karaciğer, akciğer, böbrek) MDA ve GSH düzeyleriyle değerlendirilen oksidatif stresin plazmadaki düzeylerle pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (61). Sepsiste antioksidan ajanların kullanımıyla uzak organ hasarı azaltılabilmektedir (118, 119). Ayrıca izole doku ve hücre kültürü çalışmalarında $O_2^{\bullet-}$ ve $ONOO^-$ sepsis ile ilişkili patofizyolojik değişikliklere (endotel ve epitel disfonksiyonu, vasküler hiporeaktivite, hücre disfonksiyonu) yolaştığı gösterilmiştir (72, 73). Endotel ve epitel

disfonksiyonunun bir sonucu olarak beyin ödemi ve KBB geçirgenliğinde artış ortaya çıkmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda riluzolün oksidan hasara karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (59, 82, 116). Çalışmamızda sepsisin oksidan hasar ile ilişkisi ve bu oksidan hasara karşı riluzolün etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda lipid peroksidasyonunun ve oksidan hasarın bir göstergesi olan MDA düzeyi sepsis oluşturulmasını takip eden 6. ve 48 saatlerde anlamlı artış gösterirken, diğer taraftan GSH düzeyi azalmıştır. Riluzol uygulaması 6 saatlik deneyde lipid peroksidasyonunu hemen hemen kontrol seviyelerine düşürmüştür. Özellikle, riluzol uygulanan 48. saatlik grupta GSH düzeyi kontrolden daha düşük olmakla birlikte sepsis grubundan daha yüksektir. Bu da muhtemelen 48. saatte GSH depolarının boşalmasına bağlıdır. Sepsiste glutasyon döngüsü artmaktadır. Sepsisin ilk saatlerinde uygulanan tedavi GSH seviyelerinin korunmasını sağlayabilirken, iki gün sonra doku glutasyon depoları fazlasıyla boşalmaktadır ve tedaviden sağlanan fayda daha sınırlı olmaktadır (68). GSH depleksiyonunun nötrofillerin enfeksiyon alanına göçünü inhibe ettiği; bakteri kolonilerinin sayısını artırdığı ve sepsisin seyrini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (135). Riluzol ise lipid peroksidasyonunu azaltmanın yanı sıra endojen antioksidan olan glutasyon seviyelerinin korunmasını sağlamıştır. Bu şekilde gösterdiği dolaylı antioksidan etkiyle, serbest radikallere bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif hasarı azalttığı için sağkalımı ve hastalığın seyrini iyileştirdiği düşünülebilir.

Daha önce de anlatıldığı üzere, serbest radikal oluşumu endotel ve epitel disfonksiyonu, vasküler hiporeaktivite, hücre disfonksiyonu gibi patofizyolojik değişikliklere yol açmaktadır. Endotel ve epitel disfonksiyonunun bir sonucu olarak beyin ödemi ve KBB geçirgenliğinde artış ortaya çıkmaktadır (100, 142). Çalışmamızda sepsis oluşturulan hayvanlarda beynin su içeriği hem erken, hem de geç dönemde anlamlı olarak artmıştır. Riluzol uygulaması beyin ödemini her iki dönemde de anlamlı olarak azaltarak kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda da riluzolün farklı travma modellerinde ödemi azaltarak nöronları koruduğu gösterilmiştir (5, 92, 101, 138).

Papadopoulos ve arkadaşlarının (96) domuzlarda yaptığı çalışmalarda septik hayvanlarda ¹⁴C işaretli aminoasitlerin ve ¹²⁵I işaretli albuminin dolaşımdan beyin parenkimine geçtiği gösterilmiştir. Sepsiste özellikle aktive nötrofil ve monositlerden

salınan proinflatuvar sitokinler ve oluşan serbest oksijen radikallerinin eritrosit membranında ve serebral mikrovasküler yapılar da oluşturduğu hücre hasarı nedeniyle serebral perfüzyon, sistemik hipotansiyondan bağımsız olarak bozulmaktadır (95, 124, 131). Bunun sonucunda KBB'nde bozulma ve perimikrovasküler ödem görölmektedir (34, 100, 133).

Bu çalışmada sepsis oluşturulan hayvanlarda KBB geçirgenliğindeki artışın göstergesi olarak gram dokudaki EB miktarı ölçölmüştür. EB metodu yalnızca bariyer geçirgenliğini değil, aynı zamanda hasarın şiddetini yansıtan bir parametre olarak da kabul edilmektedir (56). Çalışmamızda, geçirgenlik 6.ve 48.saatlerde hem serebrumda, hem de serebellumda anlamlı olarak artmıştır. Erken dönemde riluzol uygulaması ise serebrumdaki artışı erken dönemde anlamlı olarak azaltırken, serebellumdaki artışa etki etmemiştir. 48 saatlik grupta riluzol tedavisi her iki bölgede de bu geçirgenlik artışını anlamlı olarak azaltmıştır. Yapılan alışmalar ışığında riluzolün KBB yıkımına neden olduğu bilinen serbest radikallere bağlı oksidan hasarı azalttığı görölmüştür (59, 82, 116). Sonuçta KBB geçirgenliğindeki artışın önlenmesi de riluzolün oksidan hasarı azaltmasına ve glutasyon deplesyonunun önlenmesi ve antioksidan dengeyi sağlamasına bağlı olabilir.

İnfekte maymunlarda yapılan bir çalışmada beynin farklı bölgelerinde hücre içi adezyon molekülleri (ICAM), NOS ve proinflatuvar sitokin düzeyleri incelenmiş ve bu parametreler açısından beynin aynı enfeksiyona bölgesel cevabının farklılık gösterdiği bulunmuştur (122). Barichello ve arkadaşlarının (6) 2006 yılında yaptığı çalışmada ise sıçanlarda CLP modeliyle sepsis oluşturularak beynin farklı bölgelerinde zamana bağlı olarak oksidatif stres ve antioksidan enzim düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. 6. saatte serebellum ve serebral kortekste artmış olan SOD aktivitesi 48. saatte yaklaşık %50 oranında azalmıştır. KAT aktivitesi ise 6. saatte hem serebellumda, hem de serebral kortekste azalırken, 48. saatte yalnızca serebellum ve hipokampusta artış göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda beynin bölgesel olarak antioksidan kapasite açısından zamana bağlı farklılıklar sergilediği anlaşılmaktadır. Bizim alışmamızda da riluzolün nöron koruyucu etkisi açısından serebellum ve serebral kortekste gösterdiği farklılığın zamana bağlı olarak değişen oksidan-antioksidan denge ile ilişkili olabileceği düşünölebilir.

Yapılan histolojik incelemelerde 6 saatlik sepsis grubunda serebrumda ağır nöron hasarı, periselüler ve perivasküler ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenirken serebellumda Purkinje hücrelerinde ağır hasar ve periselüler ödem mevcuttur. 48 saatlik sepsis grubunda serebral korteks dejenerasyonu daha da ağırlaşmıştır. Dejenere olan piramidal nöronların sayısı artmıştır. Vasküler ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu artış gösterirken, kapiller endotel hasarı daha da belirginleşmiştir. Serebellumda da hasarlı Purkinje hücrelerinin sayısı artmış ve kapiller dejenerasyon gözlenmiştir. Sepsis grubunda gözlenen perivasküler ödem daha çok sitotoksik özelliktedir. Bu durum daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur (14, 95). Sitotoksik ödemin patogenezinde özellikle glutamatın önemli rol oynadığı bildirilmiştir (58, 127). Riluzol glutamat salınımı inhibe eden bir ajan olduğu için sitotoksik ödemi azaltması beklenen bir bulgudur. Zaten yapılan histolojik incelemelerde riluzol tedavisi ödemi belirgin şekilde azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar, gravimetrik yöntemle yapılan beyin ödemi değerlendirmesiyle de paralellik göstermektedir. Serebrum ve serebellumdan alınan kesitlerde yapılan histolojik incelemelerde sepsisin her iki bölgede de 6. saatte gözlenebilen ve 48. saatte şiddetlenen inflamasyon ve nöron hasarı oluşturduğu bulunmuştur. Riluzol tedavisi bu inflamasyon ve hasarı tamamen ortadan kaldırmamakla birlikte yoğunluğunu azaltmıştır. Riluzol tedavisi uygulanan 6 ve 48 saatlik her iki grupta da hem serebral, hem de serebellar korteksteki dejenerasyon orta düzeydedir. Sepsisi takip eden geç dönemde hasar artmış olmakla birlikte, riluzol tedavisi devam ettiği için yani tedavi süresi uzadığı için koruyucu etki daha belirgin olarak gözlenmiştir.

Tüm bu bulgular doğrultusunda,

- ✓ Deneyssel olarak oluşturulan sepsis, hayvanlarda kilo kaybı, ateş ve lökositoz oluşturmaktadır. Beyin dokusunda ise inflamasyon, hücre hasarı, morfolojik değişiklikler, lipid peroksidasyonu, KBB geçirgenliğinde artış ve beyin ödeme neden olmaktadır. Bu sıçanlarda aynı zamanda nörolojik muayene skorları da bozulmaktadır.
- ✓ Riluzol tedavisi kilo kaybını azaltmakta, ateşi düşürmekte ve lökosit sayısında anlamlı değişiklik yapmaksızın sağkalımı ve hastalığın seyrini iyileştirmektedir..
- ✓ Riluzol lipid peroksidasyonunu azaltmakta ve endojen antioksidan olan GSH seviyelerinin korunmasını sağlamaktadır.

- √ Histolojik olarak gözlenen nöronal hasarı, inflamatuvar hücre sayısını, perivasküler ödemi ve KBB geçirgenliğini azalttığı görülmektedir.

Sonuç olarak, riluzolün sepsis oluşturulan hayvanların beyinde nöron koruyucu etkileri vardır. Bu etkilerin oluşumunda riluzolün glutamat salıverilmesini inhibe etmesinin yanısıra, diğer nörotransmitterlerle, ikinci haberci sistemlerle ve iyon kanallarıyla etkileşmesi rol oynayabilir (126, 145, 147). Riluzolün nöronlar üzerindeki koruyucu etkisinin kısmen oksidan-antioksidan dengenin sağlanması ile ilişkili olduğu gözükmeyle birlikte, diğer etkilerinin de göz önünde bulundurulması gerekir. Özellikle riluzolün Na^+ kanallarını bloke etmesi ve K^+ kanallarıyla etkileşmesi nöron koruyucu etki açısından anlamlıdır. Zira, Na^+ kanallarını bloke eden ajanların nöroprotektif etkileri bilinmektedir (127-129). Dolayısıyla, riluzolün septik ensefalopatideki koruyucu etki mekanizmasının aydınlatılabilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Ayala A., Lomas J.L., Grutkoski P.S., Chung C.S.: Pathological aspects of apoptosis in severe sepsis and shock? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35: :7-15, 2003.
2. Azbill R.D., Mu X., Springer J.E.: Riluzole increases high-affinity glutamate uptake in rat spinal cord synaptosomes. *Brain Res.*, 871:175-80, 2000.
3. Bae H.J., Lee Y.S., Kang D.W., Koo J.S., Yoon B.W., Roh J.K.: Neuroprotective effect of low dose riluzole in gerbil model of transient global ischemia. *Neurosci. Lett.*, 294:29-32, 2000.
4. Balk R.A., Wesley-Ely E., Goyette R.E.: National Initiative in Sepsis Education: Sepsis Handbook, Vanderbilt University Medical Center, NISE, 2001.
5. Bareyre F., Wahl F., McIntosh T.K., Stutzmann J.M.: Time course of cerebral edema after traumatic brain injury in rats: effects of riluzole and mannitol. *J. Neurotrauma.*, 14: 839-49, 1997.
6. Barichello T., Fortunato J.J., Vitali A.M., Feier G., Reinke A., Moreira J.C., Quevedo J., Dal-Pizzol F.: Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit. Care Med.*, 34: 886-9, 2006.
7. Basler T., Meier-Hellmann A., Bredle D., Reinhart K.: Amino acid imbalance early in septic encephalopathy. *Intensive Care Med.*, 28: 293-8, 2002.
8. Bausch A.R., Roy G.: Volume-sensitive chloride channels blocked by neuroprotective drugs in human glial cells. *Glia.*, 18:73-7, 1996.
9. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., Nishimura M.C., Davis R.L.: Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurological examination. *Stroke*, 17: 472-476, 1986.
10. Benoit E., Escante D.: Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre. *Pflügers Arch.* 419: 603-619, 1991.
11. Beuge J.A., Aust S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-311, 1978.
12. Beutler, E.: Glutathione in red blood cell metabolism. *A Manuel of Biochemical Methods*, Grune & Stratton, New York, s.112-114, 1975.
13. Bochud P.Y., Calandra T.: Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *B.M.J.*, 326: 262-266, 2003.

14. Bogdanski R., Blobner M., Becker I., Hanel F., Fink H., Kochs E.: Cerebral histopathology following portal venous infusion of bacteria in a chronic porcine model. *Anesthesiology*, 93: 793-804, 2000.
15. Bogdanski R., Blobner M., Werner C.: Critical illness polyneuropathy and myopathy: do they persist for lifetime? *Crit. Care Med.*, 31: 1279-1280, 2003.
16. Brown G.C., Bal-Price A.: Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol. Neurobiol.*, 27: 325-355, 2003.
17. Butterworth R.F.: Glutamate transporter and receptor function in disorders of ammonia metabolism. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.*, 7: 276-279, 2001.
18. Calabresi P., Picconi B., Saulle E., Centonze D., Hainsworth A.H., Bernardi G.: Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release? *Stroke*, 31: 766-772, 2000.
19. Cao Y.J., Dreixler J.C., Couey J.J., Houamed K.M.: Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole. *Eur. J. Pharmacol.*, 449: 47-54, 2002.
20. Centonze D., Calabresi P., Pisani A., Marinelli S., Marfia G.A., Bernardi G.: Electrophysiology of the neuroprotective agent riluzole on striatal spiny neurons. *Neuropharmacology*, 37: 1063-70, 1998.
21. Chan J.Y., Wang L.L., Ou C.C., Chan S.H.: Downregulation of angiotensin subtype 1 receptor in rostral ventrolateral medulla during endotoxemia. *Hypertension*, 42: 103-109, 2003.
22. Chiarla C., Giovannini I., Siegel J.H., Boldrini G., Castagneto M.: The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. *J. Nutr.*, Sep;130: 2222-2227, 2000.
23. Chioloro R., Revely J.P., Tappy L.: Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition*, 13: 45S-51S, 1997
24. Chong Z.Z., Li F., Maiese K.: Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiology*, 75: 207-246, 2005.
25. Cuzzocrea S., Riley D.P., Caputi A.P., Salvemini D.: Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.*, 53: 135-159, 2001.

26. Cuzzocrea S.: Shock, inflammation and PARP. *Pharmacol Res.*, 52: 72-82, 2005.
27. Cuzzocrea S., Wang Z.Q.: Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) in shock, ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Res.*, 52: 100-8, 2005.
28. Davies D.C.: Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. *J. Anat.*, 200: 639-646, 2002.
29. De Bock F., Derijard B., Dornand J., Bockaert J., Rondouin G.: The neuronal death induced by endotoxic shock but not that induced by excitatory amino acids requires TNF-alpha. *Eur. J. Neurosci.*, 10: 3107-3114, 1998.
30. De Vries H.E., Kuiper J., De Boer A.G., Van Berkel T.J., Breimer D.D.: The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol. Rev.*, 49: 143-155, 1997.
31. Doble A.: The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, 47: S233-241, 1996.
32. Druml W., Heinzl G., Kleinberger G.: Amino acid kinetics in patients with sepsis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 908-913, 2001.
33. England J.M., Hewer M.G., Bashford C.C., Hughes-Jones N.C., Down M.C.: Simple method for automating the differential leucocyte-count. *Lancet*, 1: 492-493, 1975.
34. 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.*, 9(1): R18-23, 2005.
35. Floyd R.A.: Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222: 236-245, 1999.
36. Fujimura N., Sumita S., Narimatsu E., Nakayama Y., Shitinohe Y.: Effects of isoproterenol on diaphragmatic contractility in septic peritonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161: 440-446, 2000.
37. Gate L., Paul J., Ba G.N., Tew K.D., Tapiero H.: Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.*, 53: 169-180, 1999.
38. Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D.: Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40: 959-975, 2001.

39. Gilgun-Sherki Y., Rosenbaum Z., Melamed E., Offen D.: Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol. Rev.*, 54: 271-284, 2002.
40. Glauser M.P., Zanetti G., Baumgartner J.D., Cohen J.: Septic shock: pathogenesis. *Lancet*, 338: 732-736, 1991.
41. Grant I.S., Andrews P.J.: ABC of intensive care: neurological support. *B.M.J.*, 319:110-113, 1999.
42. Green R., Scott L.K., Minagar A., Conrad S.: Sepsis associated encephalopathy (SAE): a review. *Front. Biosci.*, 9:1637-1641, 2004.
43. Gurney M.E., Fleck T.J., Himes C.S., Hall E.D.: Riluzole preserves motor function in transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol.*, 50: 62-66, 1998.
44. Harada S., Imaki T., Chikada N., Naruse M., Demura H.: Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection. *Brain Res.*, 821: 322-332, 1999.
45. Harris R.L., Musher D.M., Bloom K., Gathe J., Rice L., Sugarman B., Williams T.W. Jr., Young E.J.: Manifestations of sepsis. *Arch. Intern. Med.*, 147: 1895-1906, 1987.
46. He Y., Benz A., Fu T., Wang M., Covey D.F., Zorumski C.F., Mennerick S.: Neuroprotective agent riluzole potentiates postsynaptic GABA(A) receptor function. *Neuropharmacology*, 42:199-209, 2002.
47. Hendriks J.J., Teunissen C.E., de Vries H.E., Dijkstra C.D.: Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res. Rev.*, 48: 185-195, 2005.
48. Holden C.: Excited by glutamate. *Science*, 300: 1866-1868, 2003.
49. Hubert J.P., Delumeau J.C., Glowinski J., Prémont J., Doble A.: Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *Br. J. Pharmacol.* 113: 261-267, 1994.
50. Hund E.: Critical illness polyneuropathy. *Curr. Opin. Neurol.*, 14: 649-653, 2001.
51. Hund E.: Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J. Neurol.*, 248: 929-934, 2001.

52. Janis L.S., Stein D.G.: Intraseptal injections of NGF attenuates edema formation following septal lesions in the rat. *Neurosci. Lett.*, 214: 21-24, 1996.
53. Jehle T., Bauer J., Blauth E., Hummel A., Darstein M., Freiman T.M., Freuerstein T.J.: Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1227-1234, 2000.
54. Kadoi Y., Saito S., Kunimoto F., Imai T., Fujita T.: Impairment of the brain beta-adrenergic system during experimental endotoxemia. *J. Surg. Res.*, 61: 496-502, 1996.
55. Kanthasamy A.G., Yun R.J., Nguyen B., Truong D.D.: Effect of riluzole on the neurological and neuropathological changes in an animal model of cardiac arrest-induced movement disorder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288: 1340-1348, 1999.
56. Kaptanoğlu E., Okutan O., Akbıyık F., Solaroğlu I., Kılınç A., Beşkonaklı E.: Correlation of injury severity and tissue Evans blue content, lipid peroxidation and clinical evaluation in acute spinal cord injury in rats. *J. Clin. Neurosci.*, 11: 879-85, 2004.
57. Keita H., Boczkowski J., Samb A., Lanone S., Lang-Lazdunski L., Rouelle D., Desmonts J.M., Mantz J.: Anesthetic concentrations of riluzole inhibit neuronal nitric oxide synthase activity, but not expression, in the rat hippocampus. *Brain Res.*, 881: 237-240, 2000.
58. Kempinski O.: Cerebral edema. *Semin. Nephrol.*, 21: 303-307, 2001.
59. Koh J.Y., Kim D.K., Hwang J.Y., Kim Y.H., Seo J.H.: Antioxidative and proapoptotic effects of riluzole on cultured cortical neurons. *J. Neurochem.*, 72: 716-723, 1999.
60. Komarov A.M., Reddy M.N.: Effect of septic shock on nitrate, free amino acids, and urea in murine plasma and urine. *Clin. Biochem.*, 31:107-111, 1998.
61. Köksal G.M., Sayılğan C., Aydın S., Öz H., Uzun H.: Correlation of plasma and tissue oxidative stresses in intra-abdominal sepsis. *J. Surg. Res.*, Dec;122: 180-183, 2004.
62. Kunze K.: Metabolic encephalopathies. *J. Neurol.*, 249: 1150-1159, 2002.
63. Lang-Lazdunski L., Heurteaux C., Dupont H., Widmann C., Lazdunski M.: Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J. Vasc. Surg.*, 32: 179-189, 2000.

64. Lang-Lazdunski L., Heurteaux C., Mignon A., Mantz J., Widmann C., Desmonts J., Lazdunski M.: Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 18:174-181, 2000.
65. Lesage F.: Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology*, 44: 1-7, 2003.
66. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.*, 31: 1250-1256, 2003
67. Ludolph A.C.: Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis: Focus on riluzole. *Neurology*, 47 (Supp 4), 1996.
68. Malmezat T., Breuille D., Capitan P., Mirand P.P., Obled C.: Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Nutr.*, 130: 1239-1246, 2000.
69. Mariak Z., Lyson T., Rudzinski W.: Hypothermia as a neuroprotective agent. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 38: 51-54, 2004.
70. Marmarou A., Poll W., Shulman K., Bhagavan H.: A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J. Neurosurg.*, 49: 530-537, 1978.
71. Mayer M.L., Miller R.J.: Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in the mammalian neurons. *Trend. Pharmacol. Sci.* 11: 254-260, 1990.
72. Mayer A.M.: Therapeutic implications of microglia activation by lipopolysaccharide and reactive oxygen species generation in septic shock and central nervous system pathologies: a review. *Medicina (B. Aires)*, 58: 377-385, 1998.
73. Mayer A.M., Oh S., Ramsey K.H., Jacobson P.B., Glaser K.B., Romanic A.M.: *Escherichia coli* lipopolysaccharide potentiation and inhibition of rat neonatal microglia superoxide anion generation: correlation with prior lactic dehydrogenase, nitric oxide, tumor necrosis factor- α , thromboxane B₂, and metalloprotease release. *Shock*, 11: 180-186, 1999.
74. Mayhan W.G., Didion S.P.: Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. *Stroke*, 27: 965-970, 1996.

75. Mayhan W.G.: Effect of lipopolysaccharide on the permeability and reactivity of the cerebral microcirculation: role of inducible nitric oxide synthase. *Brain Res.*, 792: 353-357, 1998.
76. Mayhan W.G.: Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res.*, 866: 101-108, 2000.
77. McEwan P., Simpson D., Kirk J.M., Barr D.G., McKenzie K.J.: Hyperammonaemia in critically ill septic infants. *Arch. Dis. Child.*, 84: 512-513, 2001.
78. McIntosh T.K., Smith D.H., Voddi M., Perri B.R., Stutzmann J.M.: Riluzole, a novel neuroprotective agent, attenuates both neurologic motor and cognitive dysfunction following experimental brain injury in the rat. *J. Neurotrauma.*, 13: 767-80, 1996.
79. Mizuta I., Ohta M., Ohta K., Nishimura M., Mizuta E., Kuno S.: Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. *Neurosci. Lett.*, 310:117-120, 2001.
80. Mohammadi B., Krampfl K., Moschref H., Dengler R., Bufler J.: Interaction of the neuroprotective drug riluzole with GABA(A) and glycine receptor channels. *Eur. J. Pharmacol.*, 415: 135-140, 2001.
81. Moller K., Strauss G.I., Qvist J., Fonsmark L., Knudsen G.M., Larsen F.S., Krabbe K.S., Skinhoj P., Pedersen B.K.: Cerebral blood flow and oxidative metabolism during human endotoxemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22: 1262-1270, 2002.
82. Mu X., Azbill R.D., Springer J.E.: Riluzole improves measures of oxidative stress following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.*, 870: 66-72, 2000.
83. Narahashi T.: Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Jul;294: 1-26, 2000.
84. Nassif X., Bourdoulous S., Eugene E., Couraud P.O.: How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol.*, 10: 227-232, 2002.
85. Neu J., DeMarco V., Li N.: Glutamine: clinical applications and mechanisms of action. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 5: 69-75, 2002.

86. Nicholls D., Atwell D.: The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 462-469, 1990.
87. Noh K.M., Hwang J.Y., Shin H.C., Koh J.Y.: A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiol Dis.* 7: 375-383, 2000.
88. Obrenovitch T.P., Urenjak J.: Actions of riluzole in animal models of CNS ischaemia and trauma. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 8: 227-235, 1997.
89. Obrenovitch T.P., Urenjak J.: Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog. Neurobiol.* 51: 39-87, 1997.
90. Obrenovitch T.P., Urenjak J.: Glutamate release inhibitors: a critical assessment of their action mechanism. *Amino Acids*, 14: 143-150, 1998.
91. Obrenovitch T.P.: Neuroprotective strategies: voltage-gated Na⁺-channel down-modulation versus presynaptic glutamate release inhibition. *Rev. Neurosci.* 9: 203-211, 1998.
92. Obrenovitch T.P., Urenjak J., Zilkha E., Jay T.M.: Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 281-287, 2000.
93. O'Neill M.J., Bath C.P., Dell C.P., Hicks C.A., Gilmore J., Ambler S.J., Ward M.A., Bleakman D.: Effects of Ca²⁺ and Na⁺ channel inhibitors in vitro and in global cerebral ischaemia in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 332: 121-131, 1997.
94. Palmada M., Centelles J.J.: Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Front. Biosci.* 3: 701-718, 1998.
95. Papadopoulos M.C., Lamb F.J., Moss R.F., Davies D.C., Tighe D., Bennett E.D.: Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex. *Clin. Sci. (Lond.)*, 96: 461-466, 1999.
96. Papadopoulos M.C., Davies D.C., Moss R.F., Tighe D., Bennett E.D.: Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit. Care Med.* 28: 3019-3024, 2000.
97. Parker S.J., Watkins P.E.: Experimental models of gram-negative sepsis. *Br. J. Surg.* 88: 22-30, 2001.

98. Parks D.A., Skinner K.A., Skinner H.B., Tan S.: Multiple organ dysfunction syndrome: Role of xanthine oxidase and nitric oxide. *Pathophysiology*, 5: 49-66, 1998.
99. Parratt J.R.: Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41 (Suppl A):31-39, 1998.
100. Peters K., Unger R.E., Brunner J., Kirkpatrick C.J.: Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res.*, 60: 49-57, 2003.
101. Pratt J., Archambaud C., Bohme G.A., Roux M., Rataud J., Imperato A., Stutzmann J.M.: The effect of riluzole and mannitol on cerebral oedema after cryogenic injury in the mouse. *Neurosci. Lett.*, 272: 143-145, 1999.
102. Quan N., Stern E.L., Whiteside M.B., Herkenham M.: Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *J. Neuroimmunol.*, 93: 72-80, 1999.
103. Riedel W., Lang U., Oetjen U., Schlapp U., Shibata M.: Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever. *Mol. Cell. Biochem.*, 247: 83-94, 2003.
104. Salt T.E., Eaton S.A.: Functions of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in the mammalian thalamus. *Prog. Neurobiol.*, 48: 55-72, 1996.
105. Seeburg P.H.: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 14: 297-302, 1993.
106. Shapira Y., Setton D., Artru A.A., Shohami E.: Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic function after closed head injury in rats. *Anaesth. Analg.*, 77: 141-148, 1993.
107. Sharshar T., Gray F., Poron F., Raphael J.C., Gajdos P., Annane D.: Multifocal necrotizing leukoencephalopathy in septic shock. *Crit. Care Med.*, 30: 2371-2375, 2002.
108. Sharshar T., Annane D., de la Grandmaison G.L., Brouland J.P., Hopkinson N.S., Francoise G.: The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol.*, 14: 21-33, 2004.
109. Sharshar T., Hopkinson N.S., Orlikowski D., Annane D.: Science review: The brain in sepsis-culprit and victim. *Crit. Care.*, 9: 37-44, 2005.

110. Sherwood E.R., Toliver-Kinsky T.: Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 18: 385-405, 2004.
111. Shimizu I., Adachi N., Liu K., Lei B., Nagaro T., Arai T.: Sepsis facilitates brain serotonin activity and impairs learning ability in rats. *Brain Res.*, 830: 94-100, 1999.
112. Singh J., Gupta M.C.: Effect of aspartate and glutamate on nociception, catalepsy and core temperature in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 41: 123-128, 1997.
113. Smith Q.R.: Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J. Nutr.*, 130 (4S Suppl): 1016S-1022S, 2000.
114. Song J.H., Huang C.S., Nagata K., Yeh J.Z., Narahashi T.: Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282: 707-714, 1997.
115. Stefani A., Spadoni F., Bernardi G.: Differential inhibition by riluzole, lamotrigine, and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp. Neurol.*, 147: 115-122, 1997.
116. Storch A., Burkhardt K., Ludolph A.C., Schwarz J.: Protective effects of riluzole on dopamine neurons: involvement of oxidative stress and cellular energy metabolism. *J. Neurochem.*, 75: 2259-2269, 2000.
117. Suarez I., Bodega G., Fernandez B.: Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem. Int.*, 41: 123-142, 2002.
118. Şener G., Toklu H., Kapucu C., Ercan F., Erkanlı G., Kaçmaz A., Tilki M., Yeğen BÇ.: Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg. Today.*, 35:52-59, 2005.
119. Şener G., Toklu H., Ercan F., Erkanlı G.: Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int. Immunopharmacol.*, 5: 1387-1396, 2005.
120. Tanser S.J., Walker M.B., Hilton D.A.: Acute haemorrhagic leucoencephalitis complicating sepsis. *Anaesth. Intensive Care*, 29: 54-57, 2001.
121. Tapiero H., Mathe G., Couvreur P., Tew K.D.: II. Glutamine and glutamate. *Biomed. Pharmacother.*, 56: 446-457, 2002.
122. Tongren J.E., Yang C., Collins W.E., Sullivan J.S., Lal A.A., Xiao L.: Expression of proinflammatory cytokines in four regions of the brain in Macaque mulatta

- (rhesus) monkeys infected with *Plasmodium coatneyi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62: 530-534, 2000.
123. Tsao N., Hsu H.P., Lei H.Y.: TNF-alpha-induced cyclooxygenase 2 not only increases the vasopermeability of blood-brain barrier but also enhances the neutrophil survival in *Escherichia coli*-induced brain inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 57: 371-382, 1999.
 124. Tsao N., Hsu H.P., Wu C.M., Liu C.C., Lei H.Y.: Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis. *J. Med. Microbiol.*, 50: 812-821, 2001.
 125. Tünger A.: Sepsis. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, 15: 113-121, 2002.
 126. Umemiya M., Berger A.J.: Inhibition by riluzole of glycinergic postsynaptic currents in rat hypoglossal motoneurons. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 3227-3330, 1995.
 127. Unterberg A.W., Stover J., Kress B., Kiening K.L.: Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129: 1021-1029, 2004.
 128. Urenjak J., Obrenovitch T.P.: Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol. Rev.*, 48: 21-67, 1996.
 129. Urenjak J., Obrenovitch T.P.: Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels by riluzole: an alternative to antiexcitotoxic actions. *Rev. Contemp. Pharmacother.*, 8: 237-246, 1997.
 130. Vallet B.: Gut oxygenation in sepsis: still a matter of controversy? *Crit. Care*, 6: 282-283, 2002.
 131. Vallet B.: Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit. Care.*, 7: 130-138, 2003.
 132. Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J., Kuiper J.: Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 379-414, 2003.
 133. Van der Goes A., Wouters D., Van Der Pol S.M., Huizinga R., Ronken E., Adamson P., Greenwood J., Dijkstra C.D., De Vries H.E.: Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier in vitro. *FASEB J.*, 15: 1852-1854, 2001.
 134. Van der Poll T.: Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect. Dis.*, 1: 165-174, 2001.

135. Villa P., Saccani A., Sica A., Ghezzi P.: Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J. Infect. Dis.*, 185: 1115-1120, 2002.
136. Volk T., Kox W.J.: Endothelium function in sepsis. *Inflamm. Res.*, 49: 185-189, 2000.
137. Wahl F., Renou E., Mary V., Stutzmann J.M.: Riluzole reduces brain lesions and improves neurological function in rats after a traumatic brain injury. *Brain Res.*, 756: 247-255, 1997.
138. Wahl F., Stutzmann J.M.: Neuroprotective effects of riluzole in neurotrauma models: a review. *Acta Neurochir. Suppl.* 73: 103-110, 1999.
139. Wang S.J., Wang K.Y., Wang W.C.: Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience*, 125: 191-201, 2004.
140. Weigand M.A., Horner C., Bardenheuer H.J., Bouchon A.: The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 18: 455-475, 2004.
141. Wichterman K.A., Baue A.E., Chaudry I.H.: Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29: 189-201, 1980.
142. Wiel E., Vallet B., ten Cate H.: The endothelium in intensive care. *Crit. Care Clin.*, 21: 403-416, 2005.
143. Wolkow P.P.: Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm. Res.*, 47: 152-166, 1998.
144. Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D.: Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.*, 134: 489-492, 2004.
145. Xu L., Enyeart J.A., Enyeart J.J.: Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv1.4 potassium channels by a voltage-dependent oxidative mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299: 227-237, 2001.
146. Yaksh T.L.: Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20: 329-337, 1999.

147. Zona C., Siniscalchi A., Mercuri N.B., Bernardi G.: Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience*, 85: 931-938, 1998.

9. ÖZGEÇMİŞ

E-mail: haletoklu@yahoo.com

Tel: +90 216 414 29 62

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı

Tıbbiye Cad. No:49, Haydarpaşa (34668), İstanbul

Adı: Hale Zerrin

Soyadı: Toklu

Doğum tarihi: 09.08.1974

Medeni Hali: Evli

Çalıştığı kurum: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi

Eğitim Durumu

1980-1985	Faik Reşit Unat İlkokulu
1986-1992	Özel Moda Lisesi
1994-1998	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Lisans Eğitimi
1998-2001	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Farmakoloji Yüksek Lisans Eğitimi
2001-2006	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Farmakoloji Doktora Eğitimi

Tezler

- √ Glutamat salınım inhibitörü riluzolün farelerde morfine tolerans ve bağımlılık gelişmesine etkisi; 2001. Danışman: Doç. Dr. Levent Kabasakal

Yabancı diller

İngilizce : Çok iyi

Almanca: Orta

Üyelikler

1. Türk Farmakoloji Derneği
2. Klinik Eczacılık Derneği
3. Beyin Araştırmaları Derneği

Uluslararası Yayınlar

1. Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S, Ayanoglu-Dulger G.: Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Sener G, Sehirli AO. Journal of Pineal Research 2002; 32(4): 231-236
2. Aricioglu F, Altunbas H.: Agmatine an endogenous anxiolytic/ antidepressant agent? Annals of New York Academy of Science 2003; 1009: 136-140
3. Aricioglu F, Altunbas H.: Annals Harmane induces anxiolysis and antidepressant-like effects in rats. of New York Academy of Science 2003; 1009: 196-201
4. Sener G, Paskaloglu K, Toklu H, Kapucu C, Ayanoglu-Dulger G, Kacmaz A, Sakarcan A.: Melatonin ameliorates chronic renal failure-induced oxidative organ damage in rats. Journal of Pineal Research 2004; 36(4): 232-241
5. Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanlı G, Kacmaz A, Tilki M, Yegen BC.: Melatonin Protects Against Oxidative Organ Injury In A Rat Model Of Sepsis. Surgery Today 2005; 35(1):52-59.
6. Akici A, Kalaca S, Ugurlu MU, Toklu HZ, Iskender E, Oktay S.: Patient knowledge about drugs prescribed at primary healthcare facilities. Pharmacoepidemiology and Drug Safety 2004; 13: 871-876.
7. Sener G, Toklu HZ, Erkanlı G, Ercan F.: Protective Effect of β -Glucan Against Oxidative Organ Injury in a Rat Model of Sepsis. International Immunopharmacology; 2005; 5:1387-96.
8. Toklu HZ, Sener G, Jahovic N, Uslu B, Arbak S, Yegen BC.: Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. International Immunopharmacology; 2006; 6: 156-69.
9. Şener G, Toklu HZ, Şehirli AO, Velioğlu-Övünç A, Çetinel S, Gedik N: Protective Effects of Resveratrol Against Acetaminophen-Induced Toxicity In Mice. Hepatology Research 2006; 35:62-68.

10. Oruc EE, Kocyigit-Kaymakcioglu B, Oral B, Altunbas-Toklu HZ, Kabasakal L, Rollas S. Synthesis of some novel azo derivatives of 3,5-dimethyl-1-(2-hydroxyethyl)pyrazole as potent analgesic agents. Arch Pharm (Weinheim). 2006; 339: 267-72.
11. Toklu HZ, Şehirli AO, Velioglu-Öğünç A, Çetinel S, Şener G: Acetaminophen-induced toxicity is prevented by β -D-glucan treatment in mice. European Journal Pharmacology (yayına kabul edildi).
12. Şener G, Toklu HZ, Çetinel S: β -glucan protects against chronic nicotine-induced oxidative damage in rat kidney and bladder. Environmental Toxicology Phamacology (yayına kabul edildi).
13. Şener G, Toklu HZ, Alican I: The beneficial effect of resveratrol on rat bladder contractility and oxidant damage following ischemia/reperfusion. Pharmacology (yayına kabul edildi).

10. ETİK KURUL RAPORU



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ARAŞTIRMA ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU**

PROJENİN ADI : Sıçanlarda sepsise bağlı ensefalopatilerde erken ve geç dönemde riluzolün koruyucu etkilerinin araştırılması

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof. Dr. Meral Keyer UYSAL

PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Araşt. Gör. Hale Z. TOKLU

PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR : M.Ü Eczacılık Fak. Farmakoloji ABD

ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI : 13. 10.2004 – 76.2003.mar

Sayın : Prof. Dr. Meral Keyer UYSAL

Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na “ Sıçanlarda sepsise bağlı ensefalopatilerde erken ve geç dönemde riluzolün koruyucu etkilerinin araştırılması “ isimli proje ile yapmış olduğunuz başvurunuz, “Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu” tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Doç. Dr. M. Zafer Gören

**Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu
Yürütücü Sekreteri**

Fikir Belirtenler

Prof. Dr. Özdemir AKTAN

Prof. Dr. Berrak YEĞEN

Doç. Dr. Zafer GÖREN

Araşt. Gör. Gürkan SERT

Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, “Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu’na” bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir.



Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakoloji Anabilim Dalı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

İMZA

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Meral KEYER UYSAL
Üniversitesi : Marmara

Üye : Prof.Dr.Gül AYANOĞLU DÜLGER
Üniversitesi : Marmara

Üye : Prof.Dr.Mehmet KAYA
Üniversitesi : İstanbul

Üye : Prof.Dr.Lütfiye EROĞLU
Üniversitesi : İstanbul

Üye : Doç.Dr.Levent KABASAKAL
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun30/ 06 / 2006 tarih ve3.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür