



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SESAMOLÜN KAN-BEYİN BARIYERİNDE SİGARA DUMANI
TOKSİSİTESİNE KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İldem KORU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Bellkıs ATASEVER ARSLAN

İSTANBUL-2024

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SESAMOLÜN KAN-BEYİN BARIYERİNDE SİGARA DUMANI
TOKSİSİTESİNE KARŞI KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

İldem KORU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Belkıs ATASEVER ARSLAN

İSTANBUL-2024

ÖZET

Sesamolün Kan-Beyin Bariyerinde Sigara Dumanı Toksisitesine Karşı Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Giriş ve Amaç: Kan beyin bariyeri (KBB), besinlerin beyne iletilmesi ve toksik bileşiklerin geçişini engelleyerek merkezi sinir sistemini koruyan seçici bir bariyerdir. Sigara dumanı, oksidatif stresle KBB'yi bozarak inflamasyona yol açar. Bu çalışmada, HUVEC ve T98G hücrelerinden oluşturulan in vitro KBB modeline sigara dumanı ekstraktı (SDE) uygulanmış ve sesamolün IL-8, IL-6 ve TNF- α seviyeleri üzerindeki etkisi incelenerek antiinflamatuvar ve koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Deneylerde hücresel zarar, inflamasyon ve bariyer bütünlüğü çeşitli yöntemlerle analiz edilmiştir. Sesamolün farmakokinetik özellikleri ve antiinflamatuvar etkisi IL-8, IL-6 ve TNF- α seviyeleriyle incelenmiş, KBB geçirgenliği FITC-dextran testi ile değerlendirilmiştir ve hücre zar bütünlüğü tripan mavisi boyaması ile test edilmiştir. SwissADME arayüzü kullanılarak sesamolün farmakokinetik parametreleri belirlenmiştir.

Bulgular: Yapılan MTT testinde, 20 μ M SDE uygulamasının HUVEC hücrelerinde %51.34 \pm 1,36, T98G hücrelerinde ise %55.94 \pm 2,24 hücre canlılığı sağladığı; 10 μ M sesamol uygulamasının ise HUVEC hücrelerinde %130.12 \pm 2,83, T98G hücrelerinde %90.39 \pm 4,46 hücre canlılığı gösterdiği belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinde IL-8 seviyesi, sesamol ($p < 0,0001$) ve sesamol+SDE ($p = 0,0003$) gruplarında azalmıştır. T98G hücrelerinde ise IL-8 seviyesi, SDE grubunda artarken ($p = 0,0038$), sesamol ($p = 0,0340$) ve sesamol+SDE ($p < 0,0001$) gruplarında azalmıştır. T98G hücrelerinde TNF- α seviyesi, SDE grubunda ($p = 0,0029$) artarken, sesamol grubunda ($p < 0,0001$) azalmıştır. HUVEC hücrelerinde TNF- α açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). HUVEC hücrelerinde IL-6 seviyesi, sesamol ($p = 0,0040$) ve sesamol+SDE ($p = 0,0004$) gruplarında artarken, T98G hücrelerinde sesamol grubunda ($p = 0,0252$) azalma gözlenmiştir. FITC-dextran geçirgenlik testi, SDE'nin KBB bütünlüğüne zarar verdiğini; SwissADME analizi ise sesamolün KBB'den geçebilen ve Lipinski kurallarına uygun bir molekül olduğunu göstermiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, 20 μ M SDE ve 10 μ M sesamol optimum konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Sesamol, SDE'nin neden olduğu inflamasyona karşı IL-8, IL-6 ve TNF- α düzeylerini normalize ederek koruyucu bir etki göstermiştir. T98G hücrelerinde sesamolün bu sitokin düzeylerini düşürmesi, antiinflamatuvar etkisini kanıtlamaktadır. Ayrıca, T98G hücrelerinde SDE'nin IL-8 ve TNF- α düzeylerini artırması, inflamasyonu tetiklediğini göstermektedir. HUVEC hücrelerinde ise sesamol, IL-8 düzeylerini düşürmüş, IL-6 düzeylerini artırarak antiinflamatuvar etkisini ortaya koymuştur. FITC-dextran ölçümleri, SDE'nin KBB'ye zarar verdiğini ve sesamolün bu hasarı önlediğini göstermiştir. Sonuçlar, sesamolün nöroinflamasyonu azaltmada ve KBB'yi korumada potansiyel bir aday olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: KBB, sesamol, sitokin, inflamasyon, sigara dumanı

ABSTRACT

Investigation of the Protective Effects of Sesamol against Cigarette Smoke Toxicity at the Blood-Brain Barrier

Introduction and Aim: The blood-brain barrier (BBB) is a selective barrier that protects the central nervous system by preventing the transmission of nutrients to the brain and the passage of toxic compounds. Cigarette smoke disrupts the BBB through oxidative stress, leading to inflammation. In this study, cigarette smoke extract (CSE) was applied to the in vitro BBB model created from HUVEC and T98G cells, and the effect of sesamol on IL-8, IL-6 and TNF- α levels was examined, and its anti-inflammatory and protective effects were investigated.

Methods: In the experiments, cellular damage, inflammation and barrier integrity were analyzed by various methods. The pharmacokinetic properties and anti-inflammatory effect of sesamol were examined by IL-8, IL-6 and TNF- α levels, BBB permeability was evaluated by FITC-dextran test and cell membrane integrity was tested by trypan blue staining. Pharmacokinetic parameters of sesamol were determined using SwissADME interface.

Results: In the MTT test, it was determined that 20 μ M SDE application provided 51.34 \pm 1.36% cell viability in HUVEC cells and 55.94 \pm 2.24% cell viability in T98G cells; while 10 μ M sesamol application showed 130.12 \pm 2.83% cell viability in HUVEC cells and 90.39 \pm 4.46% cell viability in T98G cells. IL-8 level in HUVEC cells decreased in the sesamol ($p < 0.0001$) and sesamol+CSE ($p = 0.0003$) groups. IL-8 level in T98G cells increased in the CSE group ($p = 0.0038$), and decreased in the sesamol ($p = 0.0340$) and sesamol+CSE ($p < 0.0001$) groups. In T98G cells, TNF- α levels increased in the CSE group ($p = 0.0029$), while they decreased in the sesamol group ($p < 0.0001$). In HUVEC cells, no difference was found between the groups in terms of TNF- α ($p > 0.05$). In HUVEC cells, IL-6 levels increased in the sesamol ($p = 0.0040$) and sesamol+CSE ($p = 0.0004$) groups, while they decreased in the sesamol group ($p = 0.0252$) in T98G cells. FITC-dextran permeability test showed that CSE damaged the BBB integrity; SwissADME analysis showed that sesamol is a molecule that can pass through the BBB and complies with the Lipinski rules.

Conclusion: In the MTT test, it was determined that 20 μ M CSE application provided 51.34 \pm 1.36% cell viability in HUVEC cells and 55.94 \pm 2.24% cell viability in T98G cells;

while 10 μ M sesamol application showed $130.12 \pm 2.83\%$ cell viability in HUVEC cells and $90.39 \pm 4.46\%$ cell viability in T98G cells. IL-8 level in HUVEC cells decreased in the sesamol ($p < 0.0001$) and sesamol+CSE ($p = 0.0003$) groups. IL-8 level in T98G cells increased in the CSE group ($p = 0.0038$), and decreased in the sesamol ($p = 0.0340$) and sesamol+CSE ($p < 0.0001$) groups. In T98G cells, TNF- α levels increased in the CSE group ($p = 0.0029$), while they decreased in the sesamol group ($p < 0.0001$). In HUVEC cells, no difference was found between the groups in terms of TNF- α ($p > 0.05$). In HUVEC cells, IL-6 levels increased in the sesamol ($p = 0.0040$) and sesamol+CSE ($p = 0.0004$) groups, while they decreased in the sesamol group ($p = 0.0252$) in T98G cells. FITC-dextran permeability test showed that CSE damaged the BBB integrity; SwissADME analysis showed that sesamol is a molecule that can pass through the BBB and complies with the Lipinski rules.

Keywords: BBB, sesamol, cytokine, inflammation, cigarette smoke

TEŞEKKÜR

Öncelikle, Türkiye Cumhuriyeti'nin kurucusu Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk'e, kadınlara sunduğu haklar, kurduğu cumhuriyet, gerçekleştirdiği inkılaplar ve yolunu aydınlatan fikirleri için Őukranlarımı ve sonsuz minnetimi sunuyorum.

Lisans eğitimimden bu yana bilgi birikimi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Belkıs Atasever Arslan'a teŐekkürlerimi sunarım.

Bu tez, sadece akademik bir çalışmanın ürünü değil, aynı zamanda yaŐadıđım tüm zorluklar boyunca yanımda olan, beni destekleyen insanların katkılarıyla ortaya ıktı.

BaŐta, yaŐamım boyunca bana mücadele etmeyi öğreten, bana inanmaktan asla vazgeçmeyen, her zaman ve her koŐulda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen baŐta annem Gülay Kuru olmak üzere babam Ali Kaya Kuru ve anneannem Fatma Büke'ye en derin teŐekkürlerimi sunuyorum.

Lisans hayatımdan beri bilgi birikimi ve deneyimiyle her zaman yanımda olan BarıŐ Bitmez'e ayrıca teşekkür ederim.

Her zor anımda yanımda olan, beni daima destekleyen ve her koŐulda moral veren Cansu Kaymakçı ve Akın Atalı'ya sonsuz teşekkür ederim. Varlığınız, bu süreci çok daha kolay kıldı.

Laboratuvarda birlikte çalıŐtıđım, her koŐulda yanımda olup desteğini esirgemeyen sevgili arkadaŐım Zeynep ArslantaŐ'a da özel bir teşekkür borçluyum. Bu zorlu süreci birlikte atlattık, her an desteğini hissetmek benim için çok değerliydi.

Bunun yanı sıra, desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen Beste Balbal, Burak AliOsman Kılınç ve Deniz İrem Acar'a teŐekkürlerimi bir borç bilirim.

Ve en büyük teŐekkürü de kendime etmek istiyorum... Tüm zorluklara rağmen inancımı kaybetmeden devam ettiğim ve bu tezi baŐarıyla tamamladığım için.

Bu tez alıŐması, TÜSEB 2022-A2-YL tarafından desteklenen 31141 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

BEYAN FORMU

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tarafımdan üretildiğini ve Üsküdar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim



Tarih
İldem KORU
İmzası

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
BEYAN FORMU	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kan-Beyin Bariyeri (KBB).....	4
2.1.1. Kan-Beyin Bariyerinin Hücresel Bileşenleri.....	6
2.1.1.1. Endotel Hücreleri.....	6
2.1.1.2. Astrositler	7
2.1.1.3. Sıkı Bağlantılar (TJ'ler).....	8
2.1.1.4. Perisitler.....	9
2.1.1.5. Mikroglia	10
2.1.2. Sitokinlerin Kan-Beyin Bariyeri Üzerindeki Etkileri ve Hücresel Yanıt Mekanizmaları	11
2.2. Sigara Dumanı	12
2.2.1. Sigara Dumanı ve Kan-Beyin Bariyeri İlişkisi.....	14
2.3. Sesamol.....	15
3. MATERYAL ve METOT	18
3.1. Kullanılan Materyal.....	18
3.2. Kullanılan Metot.....	18
3.2.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması.....	18

3.2.2.	Hücrelerin Kültürlenmesi	18
3.2.3.	Hücrelerin Pasajlanması	18
3.2.4.	Hücrelerin Dondurulması	19
3.2.5.	Hücre Canlılık Testi	19
3.2.6.	Deney Gruplarının Oluşturulması	20
3.2.7.	Sigara Dumanı Ekstraktının (SDE) hazırlanması.....	20
3.2.8.	Kan Beyin Bariyeri Modellemesi	21
3.2.9.	Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi	21
3.2.10.	FITC (Floresan İzotiyosiyanat)- Dekstran Geçirgenlik Ölçümü.....	22
3.2.11.	Tripan Mavisi Hücre Canlılığı.....	22
3.2.13.	İstatiksel Analiz	25
4.	BULGULAR	26
4.1.	Sigara Dumanı Ekstraktının ve Sesamolün HUVEC ve T98G Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	26
4.2.	Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi	29
4.3.	FITC-Dekstran Geçirgenlik Ölçümü	31
4.4.	Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı	33
4.5.	Sesamolün In Silico Farmakokinetik Parametreleri.....	34
5.	TARTIŞMA.....	36
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	43
	KAYNAKLAR	44
	EKLER	54
	Ek 1 Özgeçmiş	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Kan-beyin bariyeri (BioRender.com (2024), tarafından hazırlanan ‘Blood Brain Barrier’ şablonundan uyarlanmıştır).....	4
Şekil 2: KBB’nin hücresel bileşenleri (BioRender.com (2024), tarafından oluşturulmuştur.).....	11
Şekil 3: Sigara dumanı ekstraktı elde etmek için oluşturulan düzenek (BioRender.com (2024), tarafından oluşturulmuştur.).....	13
Şekil 4: Sesamolün kimyasal yapısı.....	16
Şekil 5: Sigara dumanı ekstraktının hazırlanması.....	20
Şekil 6: KBB modeli (BioRender.com (2024), tarafından oluşturulmuştur.).....	21
Şekil 7: PubChem veritabanı	23
Şekil 8: PubChem sesamol molekülü	23
Şekil 9: Sesamol molekülünü SMILES kodu	24
Şekil 10: SwissADME arayüzü (http://www.swissadme.ch/index.php#top)	24
Şekil 11: Sigara dumanı ekstraktının HUVEC ve T98G hücreleri üzerindeki hücre canlılığı % sonuçları	26
Şekil 12: Sesamol’ün HUVEC ve T98G hücreleri üzerindeki hücre canlılığı % sonuçları	27
Şekil 13: Deney gruplarının HUVEC hücre canlılığı üzerine etkileri (****: p<0,0001)28	
Şekil 14: Deney gruplarının T98G hücre canlılığı üzerine etkileri (****: p<0,0001) ...	28
Şekil 15: HUVEC ve T98G hücre hatlarında deney gruplarında IL-8 sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi a) (**: p=0,0003; ****: p<0,0001); b) (*: p=0,0340; **: p=0,0038; ****: p<0,0001).....	29
Şekil 16: HUVEC ve T98G hücre hatlarında deney gruplarında TNF- α sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi b) (**: p=0,0029; ****: p<0,0001).....	30
Şekil 17: HUVEC ve T98G hücre hatlarında deney gruplarında IL-6 sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi a) (**: p=0,0040; ****: p=0,0004); b) (*: p=0,0252).....	31
Şekil 18: FITC-dekstran geçirgenlik grafiği (****: p<0,0001).....	32
Şekil 19: a) KBB modeli; b) KBB + SDE; c) KBB + sesamol + SDE; d) KBB + sesamol	33

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Sesamol molekölü SwissADME sonuçları.....	35
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AMPK: Aktive Edici Protein Kinaz
AP-1: Aktivatör Protein-1
BEAS-2B: İnsan Bronş Epitel Hücresi
cDNA: Tamamlayıcı DNA
CO₂: Karbondioksit
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimetil Sülfokdit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA: Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
FBS: Fetal Sığır Serumu
FITC: Floresan İzotiyosiyanat
GI: Gastrointestinal
GTP: Guanozin Trifosfat
HBMEC: İnsan Beyin Mikrovasküler Endotel Hücreleri
HUVEC: Primer İnsan Göbek Damarı Endotel Hücreleri
IL-1: İnterlökin 1
IL6: İnterlökin 6
IL8: İnterlökin 8
JAM: Birleşme Adezyon Molekülü
KBB: Kan Beyin Bariyeri
KOAİ: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MMP-2: Matris metaloproteinaz-2
MMP-9: Matris metaloproteinaz-9
MTT: 3- (4,5- dimetiazol-2il)- 2,5-difenil tetrazolyum bromür
NF-κB: Nükleer Faktör Kappa B
P-gp: P-glikoprotein
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PECAM-1: Trombosit Endotelyal Hücre Adezyon Molekülü 1
PSS: Periferik Sinir Sistemi
qPCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif Oksijen Türler

SD: Sigara Dumanı
SDE: Sigara Dumanı Ekstraktı
SIRT1: Sirtuin 1
TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü- alfa
T98G: Glioblastoma
TJ: Sıkı Bağlantı
TPSA: Toplam Polar Yüzey Alanı
VCAM-1: Vasküler Adezyon Molekülü 1
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
ZO-1: Zonula Okludens



1. GİRİŞ

Merkezi Sinir Sistemi (MSS) normal işleyişini desteklemek için yüksek düzeyde kontrollü bir mikro ortam gereklidir; bu durum, hücrelerin, moleküllerin ve iyonların kan ve beyin arasında taşınmasının sıkı bir şekilde düzenlenmesini gerektirir. Bu sıkı düzenleme, MSS’de toplu olarak oluşan benzersiz bir anatomik ve fizyolojik bariyer tarafından korunur (Serlin vd., 2015).

Kan-beyin bariyeri (KBB), kan ve serebral dokuyu ayıran yarı geçirgen bir membranöz bariyerdir. Bu yapı, endotel hücre tabakasını, sıkı bağlantı (TJ) proteinleri ve bazal membrandan oluşur. Endotel hücreler, astroglialar ve perisitler, beyin kapillerlerinin abluminal yüzeyinin büyük bir bölümünü oluşturur. Bunlar, ek bir sürekli tabaka oluşturarak kan damarlarını beyin dokusundan ayırır. Astrositler, perisitler, kan damarları, mikrogliya ve nöronlar arasındaki yakın temas ve etkileşimler, nörovasküler ünite adı verilen dinamik bir işlevsel birimi oluşturur. Nörovasküler ünitenin anlaşılması, beyin işlevlerinin anlaşılmasında önemli bir anahtardır. KBB'nin en içteki lüminal bileşeni, beyin kılcal damarlarını kaplayan endotel hücre katmanından oluşur ve KBB'nin seçici geçirgenliği artırmada kritik bir rol oynar. Bazal membran, kollajen, heparan sülfat proteoglikanlar, laminin, fibronektin ve diğer hücre dışı matris proteinlerinden oluşur. TJ proteinleri, integral membran proteinleri, okludin, klaudinler ve birleşme adezyon molekülünü içerir (Serlin vd., 2015; Stamatovic vd., 2016; Zapata-Acevedo vd., 2024).

KBB’nin seçici koruyucu özellikleri, özel yapısal bileşiminden kaynaklanmaktadır. Kan ve MSS arasındaki fiziksel bariyer KBB’nin endotel hücreleri tarafından sağlanır, ancak bu hücreler perisitler, astrositler ve hücre dışı matris bileşenleri ile iş birliği içinde çalışır. Bu etkileşim, nörovasküler ünite olarak bilinen dinamik bir birim oluşturur ve MSS’nin korunmasında kritik rol oynar (Bernardo-Castro vd., 2020).

Sitokinler, KBB’nin yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonunu önemli ölçüde etkileyebilen biyolojik mediyatörlerdir. KBB, MSS ile periferik dolaşım arasında kritik bir arayüz oluşturarak homeostazı sağlar ve beyni potansiyel olarak zararlı maddelere

karşı korur. Proinflamatuvar sitokinlerin KBB üzerindeki etkileri, özellikle TJ proteinlerinde meydana gelen bozulmalarla ilişkilidir (Cottarelli vd., 2023).

Sigara dumanı (SD), nikotin, reaktif oksijen türleri (ROS) ve çeşitli karsinojenler gibi toksik bileşenlerin karışımından oluşur ve bu maddeler oksidatif stres ve inflamasyonu tetikleyerek KBB'nin bozulmasına yol açabilir. Nikotinin tek başına endotel hücrelerinde bariyer hasarına neden olabileceği gösterilmiştir, bu da SD'ye maruz kalmanın ardından KBB'nin zayıflayan bütünlüğüne nikotinin önemli bir katkı sağladığını düşündürmektedir (Ahmad ve ark., 2019). Ayrıca hem nikotin hem de sigara dumanındaki diğer zararlı maddelerin endotel hücrelerindeki sıkı bağlantıları bozarak nörotoksik ajanların beyne geçişini kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Pelgrim ve ark., 2022).

Sigaranın hastalıklara katkıda bulunduğu mekanizmaların anlaşılması önemli bir araştırma odağı olmuştur ve olmaya devam etmektedir. Bu bağlamda, sigara dumanını değerlendirmek için çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır. Bu yaklaşımlardan biri, sigaradan yayılan dumanı sulu bir çözeltilerden geçirerek yakalamaktır. Sigara dumanı ekstraktı (SDE) veya sıvı duman olarak adlandırılan preparatlar, özellikle in vitro deneyler için yaygın olarak kullanılır (Rennard, 2004).

Yapılan çalışmalar sonucunda, kronik ağır sigara içen bir kişinin SDE'nin, KBB maruziyetinin güçlü bir endotelial inflamatuvar yanıt başlattığı bildirilmiştir. (Kaiser vd., 2015). Periferik organlar ve beyindeki mitokondriyal işlev bozukluğu, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet ve kardiyovasküler miyopatiler gibi birçok hastalığın nedeninde kritik rol oynadığı bildirilmiştir (Kim vd., 2015). SD'nin KBB fonksiyonunu bozduğu ve bu durumun beyin sağlığı için önemli bir risk faktörü olduğu açıktır. KBB hasarı, sigara içmenin neden olduğu çeşitli nörolojik hastalıkların gelişimi için kritik bir prodromal (hastalık öncesi verilen belirti) faktör olduğu gösterilmiştir (Naik vd., 2014).

Sesamol kimyasal olarak, 3, 4-metilendioksifenol ($C_7H_6O_3$) moleküler formüle sahiptir (Singh vd., 2023). KBB'ni geçme kabiliyeti özellikle nörodejeneratif hastalıklar ve bilişsel işlev bozukluğu bağlamında terapötik etkinlikleri için gereklidir. Susam tohumlarından elde edilen sesamol, nöroprotektif özellikleri ve KBB'ne nüfuz etme kabiliyeti nedeniyle dikkat çekmiştir (Y. Wang vd., 2023). Ek olarak, sesamolün proinflamatuvar sitokinlerin üretimini engellediği ve mikrogliaların M1 fenotipten M2 fenotipe polarizasyonunu teşvik ederek nöroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Ren

vd., 2020). KBB'nin in vitro modelleri, sesamolün bariyer geçirgenliği üzerindeki etkilerini anlamada önemli bir rol oynamıştır (Schrade vd., 2012).

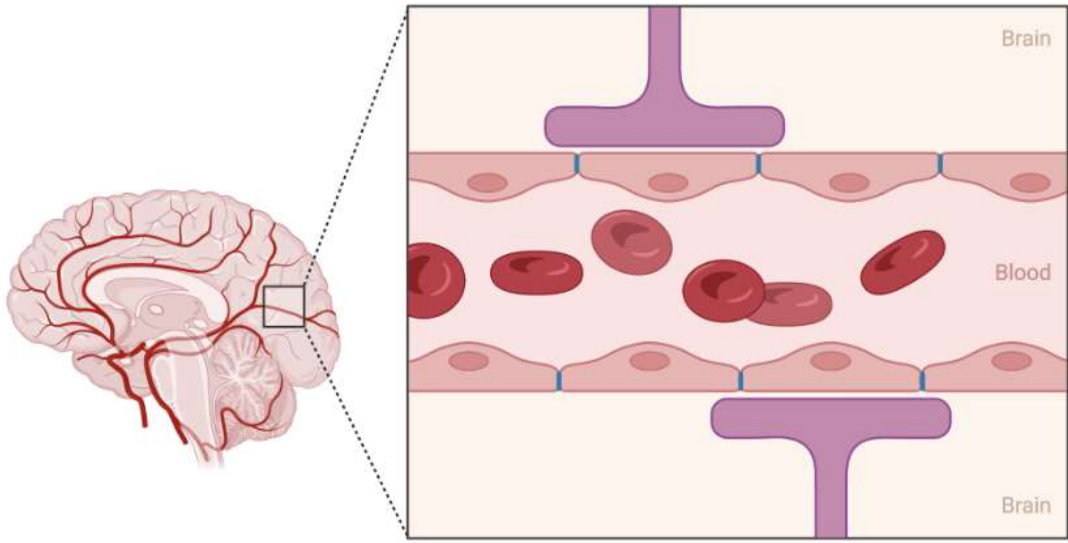
Bu çalışmada, primer insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC) ve glioblastoma hücreleri (T98G) kullanılarak çift tabakalı in vitro bir KBB modeli oluşturulmuş ve bu modele SDE uygulanarak inflamasyon oluşturulmuştur. Çalışmanın temel amacı, sigara dumanının KBB üzerindeki inflamatuvar etkilerini incelemek ve sesamolün bu inflamasyona karşı koruyucu potansiyelini değerlendirmektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kan-Beyin Bariyeri (KBB)

Sinir sistemi iki ana bileşene ayrılır: MSS ve periferik sinir sistemi (PSS). MSS, beyin ve omuriliği kapsar; duyuşal, motor ve bilişsel bilgileri bir araya getirir. PSS, gangliyonlar ve sinirlerden oluşur; motor ve duyuşal sinyallerin iletimi ile istemsiz işlevlerin düzenlenmesinde rol oynar. MSS, periferik kan dolaşımı ile çok kısıtlı bir etkileşime sahiptir. Bu etkileşim, KBB aracılığıyla kontrol edilir. KBB, moleküllerin ve hücrelerin MSS'ye giriş ve çıkışını düzenler ve beyin-omurilik sıvısı bariyeri ile kontrol edilen bir mikro çevre oluşturur (Zapata-Acevedo vd., 2024). MSS'nin işleyişi, yüksek düzeyde kontrollü bir mikro ortam gerektirir; bu durum, hücrelerin, moleküllerin ve iyonların kan ve beyin arasında taşınmasının sıkı bir şekilde düzenlenmesini zorunlu kılar. MSS'deki bu düzenleme, benzersiz anatomik ve fizyolojik bariyerler tarafından sağlanır (Serlin vd., 2015).



Şekil 1: Kan-beyin bariyeri (BioRender.com (2024), tarafından hazırlanan 'Blood Brain Barrier' şablonundan uyarlanmıştır)

Beyni vücudun geri kalanından etkili bir şekilde ayıran kandan beyin arayüzündeki biyolojik bir bariyerin varlığı ilk olarak Paul Ehrlich (1885) tarafından çevresel olarak infüze edilmiş bir boyanın beyin dokusunu lekelemediğini fark etmesiyle keşfedilmiştir (Kadry vd., 2020). KBB, kan ve serebral doku arasındaki arayüzde yer alan yarı geçirgen

bir membranöz bariyer olarak tanımlanır (Bellettato & Scarpa, 2018). KBB bileşenleri, TJ proteinlerine, endotel hücre tabakasına ve bazal membrana sahip bir yapıyı içerir. Endotel hücreleri, astrositler (beyin kapillerlerinin abluminal yüzey alanının %99'una yakını oluşturur), nöronlara gömülü perisitler ve mikroglia gibi destekleyici hücrelerle birlikte çalışarak MSS'yi sistemik dolaşımdan izole eden karmaşık bir bariyer oluşturur. Nörovasküler ünite olarak bilinen bu işlevsel yapı, beyin fonksiyonlarının korunmasında kritik bir rol oynar (Zapata-Acevedo vd., 2024).

Nörovasküler ünitenin en iç katmanı, beyin kılcal damarlarını kaplayan endotel hücre tabakasıdır. Bu hücreler, KBB seçici geçirgenliği artırmada kritik bir rol oynar. Bazal membran, endotel hücrelerini ve perisitleri saran kollajen, laminin ve diğer hücre dışı matris proteinlerinden (heparan sülfat proteoglikanlar ve fibronektin) oluşur. TJ proteinleri arasında okludin, klaudinler (klaudin-1, -3, -5, -12), Zonula Okludens (ZO-1, -2) ve birleşme adezyon molekülünü (JAM) yer alır (Serlin vd., 2015; Stamatovic vd., 2016; Zapata-Acevedo vd., 2024).

Bu karmaşık ve dinamik bariyer, belirli moleküllerin ve iyonların difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, pasif taşıma veya aktif taşıma yoluyla iki bölme arasındaki geçişini titizlikle kontrol eder. Nöronal fonksiyonların homeostazını sağlamak, sistemi toksik etkilere karşı korumak, çevre ile MSS arasındaki iletişimi düzenlemek ve beyne besin temin etmek gibi görevleri üstlenir. Bu süreçler, hidrofilik bileşiklerin paraselüler difüzyonunun engellenmesi, besin maddelerinin aktif olarak beyne taşınması, hidrofobik moleküllerin ve ilaçların beyinden kana geçişinin sağlanması ve dolaşımdaki kan hücreleri ile patojenlerin trans-endotelial göçünün düzenlenmesi ile gerçekleşir (Bellettato & Scarpa, 2018; Gawdi vd., 2024).

KBB'de, hormonlar (amino asitler, tiroit hormonu, glikoz) ve besin maddelerinin beyne erişimine izin verirken, istenmeyen maddelerin girişini engeller. Bu işlevler, fiziksel bariyerler ile pasif taşıma, kolaylaştırılmış difüzyon ve aktif taşıma mekanizmaları aracılığıyla gerçekleşir. Yüksek lipofilik bileşikler, örneğin nikotin, endotel hücrelerinin plazma membranı boyunca kolayca yayılabilir ve bariyeri geçebilirken, büyük ve suda çözünen (polar) maddeler genellikle taşıyıcı olmadan bariyerden geçemez. Küçük ve suda çözünen maddeler ise plazma proteinlerine bağlanarak büyük kompleksler oluşturur ve bu sayede bariyeri aşmaları zorlaşır. Aktif taşıma mekanizmaları, beyinde gerekli besin maddesi düzeylerini sağlamak açısından kritik rol oynar (Saili vd., 2017).

Bu eşsiz hücrenel kompleks, serebral kan damarlarının moleküllerin ve iyonların kan ile beyin arasındaki hareketini düzenlemesini sağlar (Gawdi vd., 2024). Polar maddelerin kandan beyne pasif difüzyonunu sınırlandırarak, besinlerin beyin parankimine taşınmasını ve toksik metabolitler ile ksenobiyotiklerin beyinden uzaklaştırılmasını sağlar. Ayrıca, dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinin göçünü düzenleyerek MSS homeostazını korur (Luissint vd., 2012). KBB, TJ'ler ve metabolik enzim engelleriyle karakterizedir. MSS yapıları, benzersiz yapı ve işlevleri nedeniyle, periferik dolaşımdan farklı bir bileşime sahip, homeostatik bir ortam gerektirir. Bu nedenle, KBB, MSS'nin diğer vücut fonksiyonlarından bağımsız çalışabilmesi için bu homeostatik ortamı koruma amacıyla var olmuştur. (Bellettato & Scarpa, 2018).

KBB, MSS'yi sistemik dolaşımdan izole eden hem fiziksel hem de metabolik bir bariyer oluşturarak optimum nöronal aktivite için benzersiz ve istikrarlı bir ortam yaratır (Correale & Villa, 2009). MSS damarları, kan ile MSS arasındaki moleküllerin, iyonların ve hücrelerin hareketini sıkı bir şekilde düzenlemeye olanak tanıyan bir dizi ek özelliğe sahiptir. Bu kısıtlayıcı bariyer, KBB endotel hücrelerinin uygun nöronal fonksiyonu sürdürmesini sağlar ve MSS'yi toksinler, patojenler, iltihaplanma, yaralanma ve hastalıklardan koruyarak MSS homeostazını titizlikle düzenler. Ancak KBB'nin kısıtlayıcı doğası, MSS'ye ilaç iletimini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, terapötik maddelerin MSS'ye iletilmesini sağlamak için KBB'yi modüle etmek veya aşmak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmesi üzerine büyük çabalar harcanmaktadır. (Daneman, 2012).

KBB düzeyinde ilaç taşınmasını sınırlayan dört ana mekanizma vardır. Bunlar, (i) TJ'ler tarafından düzenlenen kısıtlı paraselüler yol; (ii) düşük seviyede transendotelial veziküler trafik; (iii) beyinden kana geçen metabolitleri taşıyan ve dışarıdan gelen zararlı maddeler ile ilaçların MSS'ye girmesini engelleyen aktif taşıyıcılar ve (iv) ilaç moleküllerini metabolize eden enzimlerdir (Veszelka vd., 2018).

2.1.1. Kan-Beyin Bariyerinin Hücrenel Bileşenleri

2.1.1.1. Endotel Hücreleri

Endotel hücreler, tüm kan damarlarını kaplayan ve kan dolaşımı ile çevre dokular arasındaki alışverişi düzenleyen basit yassı epitel hücrelerdir (Daneman, 2012). KBB, özelleşmiş endotel hücreleri tarafından oluşturulur, ancak astrositlerin KBB'nin bütünlüğü ve işlevi üzerindeki önemli etkisi göz ardı edilemez. Endotel hücreleri ve

astrositler arasındaki etkileşim, KBB'nin geçirgenliğinin düzenlenmesi ve beyni zararlı maddelerden koruma görevinde kilit rol oynar. KBB'deki endotel hücreleri, sıkı bağlantılar sayesinde paraselüler geçirgenliği kısıtlayarak MSS'nin özel ortamını korur. Ayrıca, besinlerin ve atık ürünlerin taşınmasında aktif taşıma mekanizmalarıyla rol alırlar. Endotel hücrelerinde bulunan P-glikoprotein gibi taşıyıcılar, ilaçlar ve zararlı yabancı maddelerin beyinden uzaklaştırılmasını sağlayarak KBB'nin koruyucu fonksiyonuna katkı sağlar (Fu vd., 2021; Haqqani vd., 2013; Sreekanthreddy vd., 2015). Tüm bu özellikler, endotel hücrelerini birbirine bağlayan bağlantı kompleksinin varlığıyla birlikte MSS'ye çözünen maddelerin geçirgenliğini sıkı bir şekilde düzenler (Bernardo-Castro vd., 2020; Gawdi vd., 2024). KBB endotel hücrelerinin benzersiz özellikleri, onları diğer periferik endotel hücrelerinden ayırt eder ve MSS boyunca iyon hareketlerini sıkı bir şekilde düzenlemelerine olanak tanır. Bu hücreler daha fazla sayıda mitokondri içerir, bu da KBB bütünlüğünü korumak ve seçici moleküler geçirgenliği artırmak için gereken biyolojik enerjiyi sağlamalarına izin verir. KBB endotel hücreleri polarize yapıya sahiptir ve sınırlı veziküler taşıma ile çok sayıda iyon kanalı, reseptör ve taşıma proteini içerirler. Ayrıca, bağışıklık hücrelerinin MSS'ye sızmasını engelleyen son derece düşük seviyelerde lökosit adezyon moleküllerine ve negatif yüklü bileşiklere iten negatif bir yüzeye sahiptirler (Bernardo-Castro vd., 2020; Gawdi vd., 2024).

2.1.1.2. Astrositler

Astrositler, beynin kan damarlarını kaplayan hücrelerdir ve MSS ile kan dolaşımı arasında bağlantı kurarak önemli bir rol oynar. Beyinde en çok bulunan glial hücreler olan astrositler, KBB'nin oluşumu ve korunmasında önemli bir rol oynar. Uç ayaklarını kan damarlarının etrafına uzatarak endotel hücrelerine destek olur ve onların işlevlerini etkileyen fiziksel bir bariyer oluştururlar (Shindo vd., 2016). Perisitlerin kasılmasını ve genişlemesini düzenler ve böylece beyin damarlarının daralmasını ve genişlemesini kontrol ederek nöronlara yanıt olarak beyin kan akışını düzenler. Astrositler, endotel hücre fonksiyonunu ve sıkı kavşak oluşumunu etkileyen çeşitli faktörleri salgılayarak KBB'nin yapısal bütünlüğüne katkıda bulunur (Kempuraj vd., 2024). Ayrıca, astrositler, patolojik koşullarda KBB geçirgenliğini değiştirebilen vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF-A) gibi çeşitli sinyal molekülleri salgılar (Chapouly vd., 2015). Aynı zamanda, astrositler sinapslarda enerji sağlama gibi nöronal işlevlere de katkıda bulunur. Bu nedenle, KBB bütünlüğünü korumada önemlidir (Bernardo-Castro vd., 2020).

Astrositlerin, inflamatuvar sinyallere yanıt verebilme ve KBB geçirgenliğini değiştirme yetenekleri, özellikle inme ve travmatik beyin hasarı gibi durumlarda büyük önem taşımaktadır (Verma vd., 2022). Nöroinflamasyon durumunda, yaralanma veya hastalığa yanıt olarak reaktif bir fenotip kazanabilir ve bu durum, KBB üzerinde hem koruyucu hem de zararlı etkiler ortaya çıkarabilir (Suo vd., 2023). Hem bariyerin geçirgenliğini hem MSS içindeki inflamatuvar tepkileri etkileyebilecek çeşitli sitokinlerin üretiminde yer alırlar. Astrositler ile sitokinler arasındaki etkileşim karmaşık ve çok yönlüdür. Nöroinflamatuvar süreçleri ve nöro-koruma üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Astrositler KBB'ye hem koruyucu hem de zararlı etkileri olabilecek sitokinler üreterek çeşitli inflamatuvar uyarılara yanıt verirler. İnterlökin-1 beta (IL-1 β) sitokininin, astrositlerde Sonic Hedgehog sinyalizasyonunu baskılayarak KBB'yi zayıflattığı ve bu durumun inflamatuvar sitokinlerin KBB bütünlüğü üzerindeki etkisini öne çıkardığı gösterilmiştir. (Y. Wang vd., 2014). Benzer şekilde tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) adlı başka bir proinflamatuvar sitokin, KBB geçirgenliğini artıran çeşitli yapışma moleküllerinin ekspresyonunu tetikleyebilir ve bağışıklık hücrelerinin MSS'ye girişini kolaylaştırabilir (Nikolic vd., 2018). Astrositlerin normal koşullarda KBB fonksiyonunun korunmasına katkıda bulunabileceğini, ancak inflamasyon sırasında aktivasyonlarının geçirgenliğin artmasına ve potansiyel nöroinflamasyona yol ağabileceğini göstermektedir. Ayrıca, astrositler sadece sitokinlere yanıt vermekle kalmaz, aynı zamanda bu sinyal moleküllerinin üretimini de üstlenirler. İnterlökin-6 (IL-6) ve TNF- α gibi, diğer glial hücrelerin ve nöronların aktivitesini modüle edebilen çeşitli sitokinler salgırlar (Elain vd., 2014; Habbas vd., 2015).

2.1.1.3. Sıkı Bağlantılar (TJ'ler)

TJ'ler, hücreler arasındaki yapışmayı sağlayan protein kompleksleridir. Bu kompleksler en az 40 farklı protein içerir. Klaudinler ve okludin gibi transmembran proteinler, hücreler arası homofilik ve heterofilik adezyonlar oluştururken; ZO, cingulin gibi diğer proteinler ise hücre içi plak proteinleri olarak bilinir ve transmembran proteinler ile aktin hücre iskeleti arasında bir iskele oluştururlar. Bunun yanı sıra, bu proteinler gen ifadesinin geri bildirim düzenlemesine katılırlar (McNeil vd., 2006). KBB, serebral mikrodamarların endotel hücreleri tarafından oluşturulur ve periferik dolaşım ile MSS arasında dinamik bir arayüz sağlar. Endotel hücreleri arasındaki TJ'ler, kanla taşınan maddelerin beyne girişini engeller (Sandoval & Witt, 2008).

TJ kompleksi, bir dizi çoklu bariyer olarak düzenlenmiş paralel, intramembranöz protein ipliklerine sahip oldukça ayrıntılı bir yapıdır (Stamatovic vd., 2016). Transmembran adezyon proteinleri, iskelet proteinleri ve aktin hücre iskeletinden oluşur. Transmembran proteinleri arasında klaudinler, okludinler ve JAM'ler bulunur. İskelet proteinleri, transmembran proteinleri ile aktin hücre iskeleti arasında bağlantı sağlar. ZO proteinlerinden oluşan bu protein grubu, klaudin iplikçikleri, okludinler ve JAM'ların montajı ve aktin hücre iskeletiyle bağlantı kurmak için gereklidir. JAM'lar, hücreleri bir arada tutar ve transmembran proteinleri olan kaderinler ile sitoplazmik proteinler olan kateninlerden oluşur. Gap junction'lar ise hücrelerarası iletişim için önemlidir ve konneksin ailesinin üyelerinden oluşur. Bu birleşme kompleksinin bozulması, KBB'nin özelliklerini etkileyebilir (Luissint vd., 2012; Serlin vd., 2015).

Okludin, tanımlanan ilk TJ proteinidir ve hücreler arasındaki yapışmayı düzenlemede rol oynar. Okludin, klaudin-5 ile etkileşim kurabilir ve TJ kompleksindeki iskelet proteinleriyle etkileşimi önemlidir. Yapısal olarak iki eşit ekstraselüler halka, bir kısa N-terminali ve bir uzun karboksil (C-) terminali olan bir proteindir (Stamatovic vd., 2016; Yang vd., 2016).

Klaudin ailesinin 27 üyesi tespit edilmiştir. Tüm klaudinler aynı yapısal modele sahiptir; dört membran geçişli integral membran proteinleridir, iki hücre dışı döngü ve iki sitoplazmik terminali bulunur. Bunlar, bir kısa zincir N terminali ve daha uzun bir zincir C ucudur. KBB'de klaudin-5 dominant TJ bileşenidir, ancak klaudin-3 ve klaudin-12 de mevcuttur (Stamatovic vd., 2016).

Zonula Okludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) proteinleri, membrana bağlı guailat-kinaz protein ailesinin üyeleridir. Bu proteinler, TJ'lerin aktin hücre iskeletine bağlanmasında önemli iskelet proteinleridir. ZO-1, F-aktin ile etkileşimi aracılığıyla endotel bariyer oluşumu ve VE-kadherin aracılı hücre gerilimi için gereklidir. ZO proteinleri, transmembran proteinler veya diğer proteinler üzerindeki PDZ domain motiflerine bağlanmak için C ucundan bir PDZ domain motifi içerir. ZO-1, PDZ motifleri ve çeşitli sitoskelet bileşenleri ile etkileşerek klaudinler ve okludinlere bağlanır (Stamatovic vd., 2016).

2.1.1.4. Perisitler

Perisitler, 19. yüzyılda keşfedilmiş, kapiller duvarlarla bağlantılı hücreler olup arteriyollerdeki vasküler düz kas hücrelerine geçiş formlarını içerir. Beyin de dahil olmak

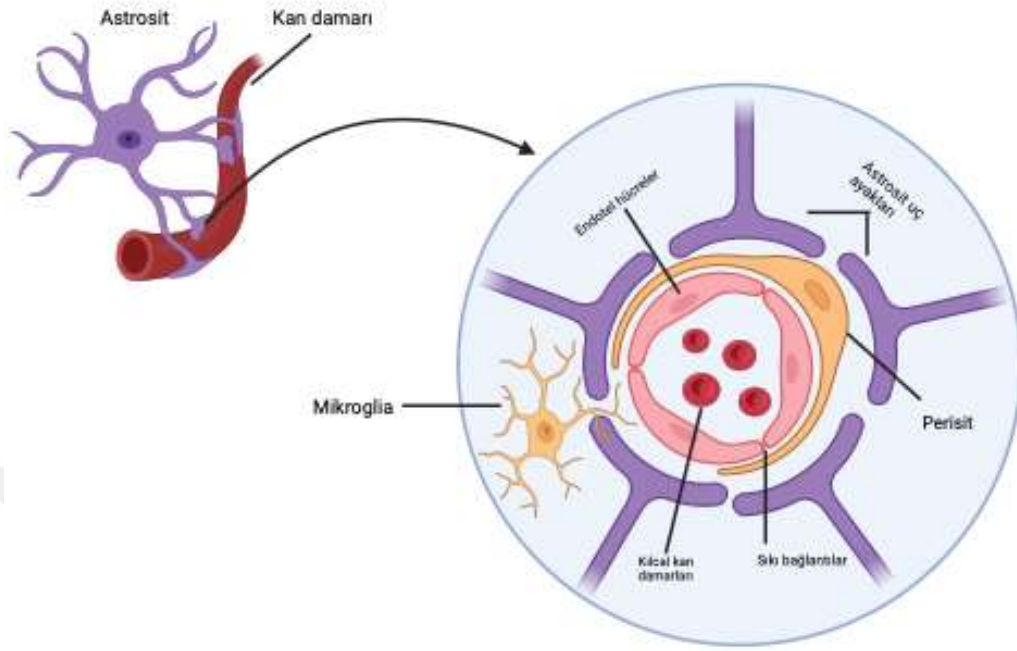
üzere, vücuttaki kılcal damarların duvarlarında yer alan çok işlevli hücrelerdir. Anjiyogenez sürecinde mikrodamarların yapısal bütünlüğünün ve farklılaşmasının yanı sıra endotelial sıkı bağlantıların oluşumunda da kritik bir rol üstlenir. Perisitlerin fonksiyonları buldukları organlara göre farklılık gösterebilir (Brown vd., 2019). Perisitler beyin mikrodamarlarını ve kılcal damarlarını sarar, astrositlere ve nöronlara yakın mesafede bulunurlar. Çoklu sinyal yollarını kullanan perisitler, gelişim sırasında KBB oluşumu ve olgunlaşmasında ve doku sağkalımının düzenlenmesinde kritik bir rol oynuyor gibi görünmektedir (Serlin vd., 2015). Bu hücreler, kan akışının düzenlenmesi, KBB bütünlüğünün korunması ve yeni kan damarlarının oluşumunda önemli rol oynarlar. Son yıllarda yapılan araştırmalar, perisitlerin fonksiyonlarını anlamaya, alt sınıflarını tanımlamaya ve tedavi hedefi olarak kullanmaya odaklanmaktadır. Potansiyel rollerini keşfetmek özellikle nörolojik hastalıklar için önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Brown vd., 2019).

2.1.1.5. Mikroglia

Mikroglia, MSS'de en bol bulunan bağışıklık hücreleridir. Bu hücreler, vücutta doku hasarının ilk belirtilerini tespit eder ve herhangi bir tehdit varlığında fenotiplerini değiştirerek müdahale eder. Ayrıca, mikroglia sürekli olarak MSS içindeki çevreyi tarayarak homeostazın sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir. Mikroglia nöronlarla etkileşime geçerek işlevlerinin desteklenmesinde önemli rol oynar (Serlin vd., 2015).

MSS'nin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglia, bu ortamdaki inflamatuvar tepkileri modüle etmede kilit rol oynar. In vitro çalışmalar, özellikle sitokin üretimi ve nöroinflamatuvar hastalıklar üzerindeki etkileri bağlamında, mikroglia ve KBB arasındaki etkileşimlere yönelik artan bir ilgi göstermektedir. Mikroglia, dinlenme durumundaki (M0) halinden, proinflamatuvar (M1) ve antiinflamatuvar (M2) fenotiplere kadar değişen bir aktivasyon yelpazesi sergiler. Bu fenotipler arasındaki denge, KBB üzerindeki genel etkiyi belirlemede kritik öneme sahiptir. Proinflamatuvar sitokinlerle aktive olan M1 mikroglia, KBB geçirgenliğini artırarak nöroinflamasyonu teşvik etme eğilimindeyken, M2 mikroglia ise doku onarımı ve antiinflamatuvar yanıtlarla ilişkilendirilir. Bu durumlar arasındaki geçiş, inflamatuvar yanıtlar sırasında salınan sitokinler gibi çeşitli uyarılardan etkilenir. Örneğin, lipopolisakkaritlere maruz kalmak mikroglial aktivasyonu tetikleyerek, KBB'nin bütünlüğünü zedeleyebilen TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar

sitokinlerin üretimine neden olabilir (H. Dong vd., 2014; Dudvarski Stankovic vd., 2016; Hoshi vd., 2019; Mizobuchi vd., 2020; Nishioku vd., 2010).



Şekil 2: KBB'nin hüresel bileşenleri (BioRender.com (2024), tarafından oluşturulmuştur.)

2.1.2. Sitokinlerin Kan-Beyin Bariyeri Üzerindeki Etkileri ve Hüresel Yanıt Mekanizmaları

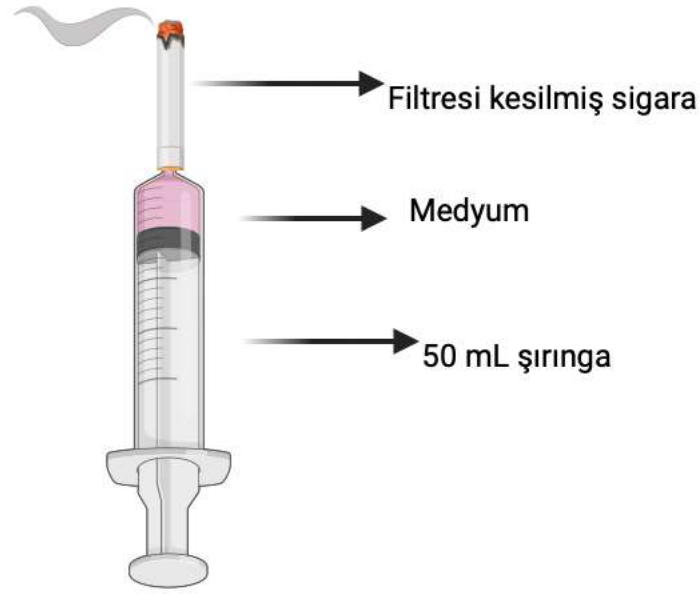
Sitokinler, KBB'nin yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonunu önemli ölçüde etkileyebilen biyolojik mediyatörlerdir. KBB, MSS ile periferik dolaşım arasında kritik bir arayüz oluşturarak homeostazı sağlar ve beyni potansiyel olarak zararlı maddelere karşı korur. Proinflamatuvar sitokinlerin KBB üzerindeki etkileri, özellikle TJ proteinlerinde meydana gelen bozulmalarla ilişkilidir (Cottarelli vd., 2023). Bu bariyer, TJ proteinleri olan okludin ve klaudinler gibi bileşenlerin yer aldığı sıkıca kapatılmış hücreler arası kavşaklarla karakterize edilen beyin mikrovasküler endotel hücrelerinden oluşur. KBB'nin bütünlüğü, normal beyin işlevi için hayati öneme sahiptir ve bozulması çeşitli nörolojik rahatsızlıklara yol açabilir. Bağışıklık tepkilerinde rol oynayan sitokinler, özellikle patolojik durumlarda, KBB geçirgenliğini düzenlemede önemli bir görev üstlenir. TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin, TJ proteinlerinin ekspresyonunu ve lokalizasyonunu etkileyerek KBB geçirgenliğinin artmasına yol açtığı gösterilmiştir. Özellikle TNF- α , bariyer bütünlüğünün bozulmasına ve ardından nöroinflamasyonun gelişmesine katkıda bulunur (Cohen vd., 2013; Nishioku vd., 2010).

Bulgular, çeşitli patolojik koşullarda KBB bozulmasının aracılığı olarak sitokinlerin önemini vurgulamaktadır. Sitokinler ile KBB arasındaki etkileşim, nörovasküler birim içinde astrositler ve perisitler gibi diğer hücresel bileşenlerin varlığı nedeniyle daha da karmaşık hale gelir. Özellikle astrositlerin, KBB işlevini etkileyebilecek çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgıladığı bilinmektedir. Örneğin, aktif astrositler, KBB geçirgenliğini artırabilen ve bağışıklık hücrelerinin MSS'ye göçünü teşvik eden vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) serbest bırakır (Jamieson vd., 2017). Özellikle, bağışıklık hücrelerinden salgılanan sitokinlerin, astrositler ve endotel hücreleri ile etkileşime girerek KBB geçirgenliğini etkilediği bilinmektedir (Broux vd., 2020).

2.2.Sigara Dumanı

“Tütün, tam olarak üreticiler tarafından amaçlandığı gibi kullanıldığında birçok kullanıcıyı öldüren yasal bir ilaçtır”. Bu cümle, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015'ten itibaren tütün içme eğilimlerine ilişkin küresel raporunun başlangıç cümlesidir. Gerçekten de 2019'da WHO, tütünün (tütün sigaraları, pipolar, purolar, nargileler, dumansız tütün ürünleri ve ısıtılmış tütün ürünleri, e-sigaralar dahil değil) kullanıcılarının yarısı kadarını ve her yıl 8 milyondan fazla insanı öldürdüğünü ve bunun 7 milyonunun doğrudan tütün kullanımının sonucu olduğunu, ikinci el dumana maruz kalmanın sigara içmeyenler arasında 1,2 milyon ölüme neden olduğunu duyurdu (Münzel vd., 2020). SD, dünya çapında erken önlenebilir ölümün önde gelen nedenidir (Sandoval & Witt, 2008).

Sigaranın hastalıklara katkıda bulunduğu mekanizmaların anlaşılması önemli bir araştırma odağı olmuştur ve olmaya devam etmektedir. Bu bağlamda, SD'yi değerlendirmek için çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır. Bu yaklaşımlardan biri, sigaradan yayılan dumanı sulu bir çözeltiden geçirerek yakalamaktır. Sigara dumanı ekstraktı (SDE) veya sıvı duman olarak adlandırılan preparatlar, özellikle in vitro deneyler için yaygın olarak kullanılır. SDE kullanılarak yapılan in vitro deneyler, SD kaynaklı toksisitenin değerlendirilmesinde önemli araçlar olmaya devam edecektir. SDE'nin kullanıldığı in vitro çalışmalar faydalı model sistemler olarak kalmaktadır (Rennard, 2004).



Şekil 3: Sigara dumanı ekstraktı elde etmek için oluşturulan düzenek (BioRender.com (2024), tarafından oluşturulmuştur.)

SD, sigaranın yanmasıyla oluşan yüksek seviyelerde nikotin, süperoksit reaktif oksijen türleri (ROS) dahil olmak suretiyle 4.000`den fazla kimyasal içerir (Bernard vd., 2019; Kaisar vd., 2015; Mazzone vd., 2010). Bu oksijen türleri hücrelerde hasara neden olarak makromoleküllerde değişikliklere yol açar. Sigara dumanını vasküler etkileri, hücrelerin oksidatif strese maruz kalmasının bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. SD'nin toksisitesi, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA hasarı, RNA oksidasyonu, mitokondriyal depolarizasyon ve apoptoz gibi ROS kaynaklı değişikliklerle ilişkilidir. Ayrıca, sigara dumanında bulunan kanserojen maddelerin doğrudan DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Mazzone vd., 2010).

Sigarada bulunan ve ana kimyasal madde olan nikotin, nikotinik kolinerjik reseptörleri aktive ederek nörol aktivitede değişikliğe neden olabilir (K. Wang vd., 2014). Sigara içmek, çok sayıda ölümcül ve zayıflatıcı hastalığın gelişimine katkıda bulunan önemli bir faktördür (Rennard, 2004). Kronik sigara içiminin insan beyni üzerindeki etkisini değerlendirmek araştırmacıların büyük bir ilgi kaynağı haline gelmiştir. Kronik sigara içimi, talamus, medial frontal korteks, insular korteks, perietal korteks, ön ve orta singulat korteks dahil olmak üzere birçok önemli beyin bölgesinde yapısal değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, sigara içenlerde çalışma belleği, gecikmeli ödül gibi bilişsel görevleri tamamlamada çeşitli zorluklar yaşamaktadır (K. Wang vd., 2014).

Carnevali vd. (2023)'nin oksidatif strese yanıt olarak akciğer hücrelerinde yaptıkları in vitro deney sonucunda nötrofil alımını ve aktivatör protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu indükleyebilen inflamatuvar mediatörler ve sitokinleri (TNF-α IL-1 ve IL-8) serbest bıraktığını göstermişlerdir (Carnevali vd., 2003).

Başka bir çalışma sonunda SD'ye maruz kalan sıçanların nazal mukozal bariyer fonksiyonunun bozulduğunu ve TJ'lerle ilişkili proteinlerin azaldığını, IL-6, IL-8, TNF-α gibi inflamatuvar faktörlerin seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını bildirilmiştir (Guo vd., 2023).

Tagawa vd. (2008) yaptığı bir çalışmada, 24 saat boyunca %7,5-10 SDE'ye maruz bırakılan insan bronş epitel hücrelerinin (BEAS-2B) hücre canlılığının %88,7 ile %24,6 arasında değiştiği tespit edilmiş (Tagawa vd., 2008).

2.2.1. Sigara Dumanı ve Kan-Beyin Bariyeri İlişkisi

Nikotinin tek başına endotel hücrelerinde bariyer hasarına neden olabileceği gösterilmiştir, bu da SD'ye maruz kalmanın ardından KBB'nin zayıflayan bütünlüğüne nikotinin önemli bir katkı sağladığını düşündürmektedir (Ahmad vd., 2019). Ayrıca, hem nikotin hem de sigara dumanındaki diğer zararlı maddelerin endotel hücrelerindeki TJ'leri bozarak nörotoksik ajanların beyne geçişini kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Pelgrim vd., 2022).

Yapılan çalışmalar sonucunda, kronik ağır sigara içen bir kişinin SDE'nin KBB maruziyetinin güçlü bir endotelyal inflamatuvar yanıt başlattığı bildirilmiştir. (Kaisar vd., 2015). Periferik organlar ve beyindeki mitokondriyal işlev bozukluğu, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet ve kardiyovasküler miyopatiler gibi birçok hastalığın etiolojisinde kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Beyin hücrelerinin, nikotin, çözünmeyen katran ve uçucu dumanlar gibi toksik bileşenlere karşı hassas olduğu belirlenmiştir (Kim vd., 2015).

SD'nin içerdiği nikotin ve diğer bileşenlerin neden olduğu zararlı etkiler bazı yollarla açıklanabilir ancak SD tarafından aktive edilen kesin zararlı mekanizmalar belirsizliğini koruyor. Bu nedenle, sigara içmenin nöro-patolojisi ve altta yatan patolojik yollar büyük ölçüde bilinmemektedir. Ancak SD'nin KBB fonksiyonunu bozduğu ve bu durumun beyin sağlığı için önemli bir risk faktörü olduğu açıktır. KBB hasarı, sigara içmenin neden

olduğu çeşitli nörolojik hastalıkların gelişimi için kritik bir prodromal (hastalık öncesi verilen belirti) faktör olduğu gösterilmiştir (Naik vd., 2014).

SD'nin TJ proteinlerinin modifikasyonu ve proinflamatuvar yolların aktivasyonu yoluyla oksidatif hasarı ve KBB bozulmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Kaisar vd., 2015; Prasad vd., 2015). KBB endotel hücreleri, IL-6 ve matris metaloproteinaz-2 (MMP-2) salınımı yoluyla vasküler inflamatuvar yanıtı indükleyebilir. Bu süreç, vasküler adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve trombosit endotelial hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1) gibi adezyon moleküllerini yukarı regüle edebilir. Tüm bu olaylar, KBB'nin bütünlüğünü ve işlevini ciddi şekilde bozabilir ve tehlikeye atabilir (Naik vd., 2015). Dahası, SD'nin KBB üzerindeki etkileri yalnızca hücrel hasarla sınırlı kalmamaktadır. Yapılan çalışmalar, SD'nin nöroinflamasyonu artıran sinyal yollarını da aktive edebileceğini ortaya koymuştur. Bu sinyal yollarının aktive edilmesi, inflamatuvar yanıtların şiddetlenmesine ve KBB bütünlüğünün daha fazla bozulmasına neden olabilmektedir (Krishnan vd., 2022).

Yapılan bir çalışmada ağır sigara içenlerin fizyolojik konsantrasyonlarını taklit etmek için SDE kullanan çeşitli çalışmalar, sigara içmenin oksidatif ve inflamatuvar mekanizmalar yoluyla in vitro olarak kan KBB bozulmasını tetiklediğini göstermiştir (Kaisar vd., 2015).

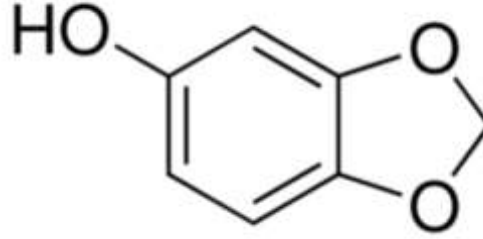
Dobric vd. (2022) yaptıkları çalışmada SD'ye maruz kalmanın KBB proteinlerine zarar verip vermediğini anlamak için immünoiblota deneyi yapmışlardır. Yapılan deney sonucunda TJ proteini olan ZO-1, SD'ye maruz kalan farelerde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Dobric vd., 2022).

2.3.Sesamol

Susam yağının sağlığa faydalı etkileri binlerce yıldır bilinmekte ve araştırılmaktadır. "Yağlı tohumların kraliçesi" olarak da bilinir. Susam, aromatik bir koku ve yumuşak bir tat ile karakterizedir. Hem Hint hem de Çin tıbbi sistemlerinde tıbbi değeri ile ön plana çıkar. Özellikle Afrika, Asya, Güney Amerika gibi bölgelerde, Etiyopya, Nijerya, Tanzania, Hindistan, gibi ülkelerde yetiştirilir (Singh vd., 2023).

Sesamol terimi, 1903 yılında Hans Kreis tarafından keşfedilmiştir (Andargie vd., 2021). Sesamol, Pedaliaceae familyasından (*Sesamum indicum*) doğal olarak izole edilen bir fenolik kimyasaldır. Genellikle kavrulmuş susam tohumları ve işlenmiş yağdan elde edilir (Singh vd., 2023). Susam yağı, sesamolin, sesamin ve sesamol içerir. Kavrulmuş

tohumlarda ve işlenmiş yağda daha yüksek miktarda sesamol bulunur. Susam tohumlarının kavrulması, sesamolin miktarını azaltırken sesamol miktarını artırır. Ham susam yağında sesamol içeriği düşüktür. Sesamol, sesamolinin hidroksilasyonu ile oluşur (Andargie vd., 2021; Dilek vd., 2020). Kimyasal olarak, sesamol 3, 4-metilendioksifenol ($C_7H_6O_3$) moleküler formüle sahip ve molar kütle 138.12 g/mol'dür (Singh vd., 2023).



Şekil 4: Sesamolün kimyasal yapısı

Susam yağında bulunan doğal bir antioksidan olan sesamolün, susam yağında bulunan diğer antioksidan lignanlardan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (VanGilder & Huber, 2014). Birkaç araştırmanın sonucunda, sesamolün çok sayıda hastalığı ve tıbbi durumu önlemek için yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Sesamol, antikanser, nöroprotektif, kardiyoprotektif, antiinflamatuvar, hipolidemik, radyoprotektif, antiaging, antidepresan ve antikonvülsan etkiler gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir. Tıbbi ajan potansiyeli nedeniyle kapsamlı incelenmiş ve inflamasyon, kanser ve serbest radikallerin önlenmesinde avantajları olan bir metabolik düzenleyici olarak çalıştığına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Singh vd., 2023).

KBB'yi geçme kabiliyeti özellikle nörodejeneratif hastalıklar ve bilişsel işlev bozukluğu bağlamında terapötik etkinlikleri için gereklidir. Sesamol, nöroprotektif özellikleri ve KBB'ye nüfuz etme kabiliyeti nedeniyle dikkat çekmiştir (Y. Wang vd., 2023). Sesamolün nöroprotektif etkilerini ortaya koyan mekanizmalar oldukça çeşitlidir. Özellikle, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan AMPK/SIRT1/NF- κ B sinyal yolunu düzenleyerek inflamatuvar süreçleri modüle ettiği kanıtlanmıştır (Feng vd., 2022). Ek olarak, sesamolün proinflamatuvar sitokinlerin üretimini engellediği ve mikrogliaların M1 fenotipten M2 fenotipe polarizasyonunu teşvik ederek nöroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Bağışıklık tepkisinin bu şekilde modüle edilmesi, kronik inflamasyonun nöronal hasara yol açan bir faktör olduğu nörodejeneratif hastalıklar açısından özellikle büyük bir önem taşır (Ren vd., 2020).

Sesamolün nöroinflamasyonu ve oksidatif stresi azaltma yeteneği, lipid peroksidasyonunu azaltarak ve beyindeki antioksidan enzimlerin işlevini artırarak nöroprotektif etkisini güçlendirmektedir. Vangilder ve Huber'in çalışmaları, bu özelliklerin sesamolün nöroprotektif profilini daha da pekiştirdiğini göstermektedir (VanGilder & Huber, 2014). KBB'nin in vitro modelleri, sesamolün KBB geçirgenliği üzerindeki etkilerini anlamada önemli bir rol oynamıştır. Örneğin, insan beyin mikrovasküler endotel hücrelerini (HBMEC) kullanan çalışmalar, sesamolün, KBB bütünlüğünü korumak için kritik olan TJ proteinlerinin ekspresyonunu artırabildiğini ortaya koymuştur (Schrade vd., 2012). Bu bulgular, sesamolün sadece KBB'ye nüfuz etmekle kalmayıp aynı zamanda yapısal bileşenlerini güçlendirerek zararlı maddelerin beyne geçişini engelleyebileceğini düşündürmektedir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1.Kullanılan Materyal

Kullanılacak hücreler primer insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC) ve glioblastoma (T98G) hücreleridir. HUVEC ve T98G hücreleri %5 CO₂ konsantrasyonuna sahip 37°C'lik inkübatörde Dulbecco's Modified Eagled Medium (DMEM) içerisine %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L- Glutamin eklenmesi ile elde edilen besiyerinde hücreler büyütülmüştür. %70-80 hücre yoğunluğunda ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasaj gerçekleştirilmiştir (Kim vd., 2015).

3.2. Kullanılan Metot

3.2.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması

HUVEC (ATCC ® CRL-1730TM) ve T98G (ATCC ® CRL-1690TM) hücrelerinin kültürlenebilmeleri için %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM içinde kültürlenmiştir.

3.2.2. Hücrelerin Kültürlenmesi

Dondurulmuş hücreler laminar kabin içerisinde soğuk medyum ile pipetajla çözdürülür. Çözdürülen hücreler 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilir. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 37°C'lik su banyosunda ısıtılmış olan medyum eklenir ve pellet çözdürülür. Tekrar santrifüj edilir. Üçüncü santrifüj sonunda süpernatant tekrar uzaklaştırılır ve hücre pelleti medyum ile çözdürülerek petriye aktarılır. Yapılan santrifüj işlemleri sonucunda hücrelerin dondurma medyumu içerisinde bulunan DMSO'dan arındırılması amaçlanmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Mikroskopla kontrol edilen HUVEC ve T98G hücreleri %70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra petri içerisindeki medyum tamamen çekilir ve serumsuz medyum ile yıkama yapılır. Yapışan hücreleri kaldırmak için petriye 37°C'lik su banyosunda ısıtılmış olan tripsin eklenir ve hücre morfolojisine göre 1-3 dk inkübe edilir. Sonrasında hücreleri kaldırmak için petriye serumsuz medyum eklenir ve pipetaj yapılarak hücreler kaldırılır.

15 ml'lik falkona alınan hücreler 5 dk 100 rpm'de 3 kez santrifüj edilir. Santrifüj işlemi hücreleri tripsinden arındırmak için tekrarlanır. Sonrasında deneylerde kullanılmak üzere hücreler sayılır.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Pasaj işlemi sonunda süpernatant çekilir ve pellet üzerine %10 DMSO + %90 FBS ile oluşturulan dondurma medyumu eklenir. Pellet pipetaj ile çözdürülerek kriyo tüp içine alınır. DMSO hücrelerin kristalleşmesini engelleyerek hücre kaybını azaltır.

3.2.5. Hücre Canlılık Testi

Sesamol (#533-31-3, Sigma) ve SDE'nin uygun dozunu belirlemek için öncelikle maddenin HUVEC ve T98G hücrelerindeki sitotoksik etkileri araştırıldı. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) sitotoksosite testi yapıldı. Sesamol ve SDE için altı farklı konsantrasyon hazırlandı. Sesamol için 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM ve SDE için 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM konsantrasyonlar kullanıldı.

HUVEC ve T98G hücreleri mililitrede 1×10^5 hücre olacak şekilde ayarlandı. Hücreler 96 kuyucuklu plakaya kontrol grupları hariç her kuyucuğa 90 µl hücre ve 10 µl madde ekildi. Kontrol gruplarına ayrı şekillerde HUVEC ve T98G hücreleri ekildi. Hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon sonunda formazan kristallerini oluşturmak amacıyla her kuyucuğa 10 µl MTT sıvısı eklendi ve 3 saat boyunca aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuktan 70 µl süpernatant çekildi ve diğer deneylerde kullanılmak üzere -20'de saklandı. Oluşan formazan kristallerini çözmesi için 100 µl DMSO eklendi ve ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyoya sarılarak karanlık ortamda 1-2 saat inkübe edildi. Sonrasında spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol olarak sadece besiyeri ile inkübe edilen hücreler kullanılmıştır. Ekstraktın hücre canlılığı üzerindeki etkileri kontrol ile karşılaştırılarak sitotoksosite değerleri hesaplandı. (Atasever Arslan vd., 2023).

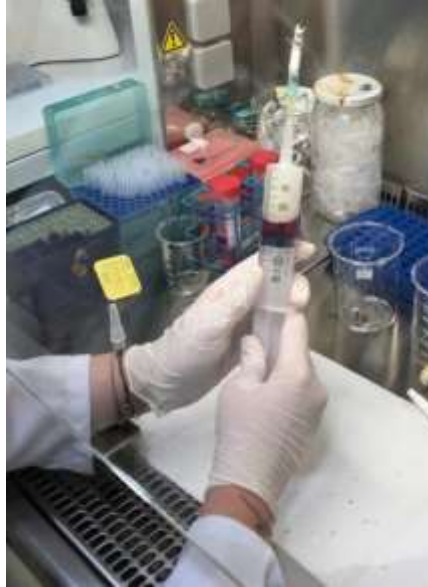
3.2.6. Deney Gruplarının Oluşturulması

HUVEC ve T98G ile oluşturulan KBB sigara dumanına maruz bırakıldı. Daha sonra uygun konsantrasyonu belirlenen sesamol etkisinin araştırılması için dört farklı grup oluşturuldu.

- I. Kontrol grubu (HUVEC + T98G (KBB))
- II. KBB + SDE
- III. KBB + Sesamol
- IV. KBB + Sesamol + SDE

3.2.7. Sigara Dumanı Ekstraktının (SDE) hazırlanması

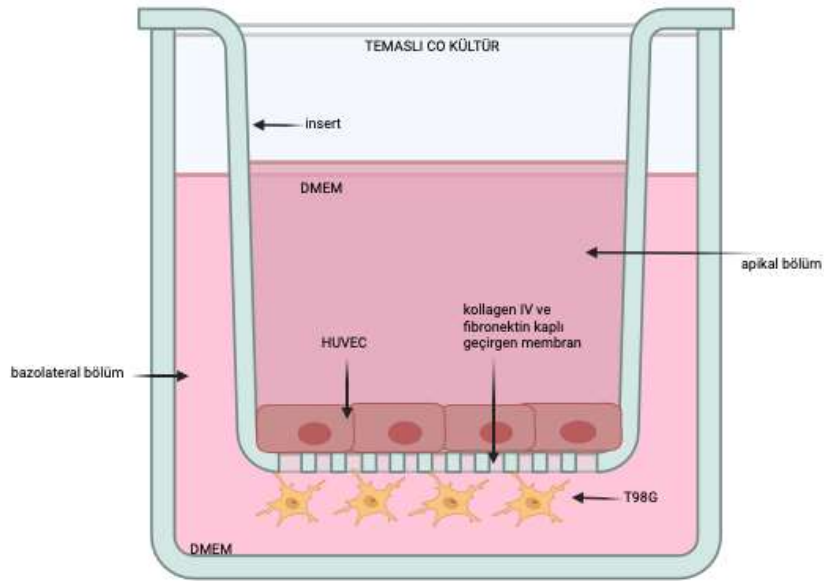
Deney düzeneğinin oluşturulması için; 60 ml'lik şırınga içerisine 10 ml serumsuz DMEM çekildi. 1000 ul'lik pipet ucunun sivri tarafı şırınganın ucuna takıldı. Ticari marka sigaranın filtre kısmı kesilerek pipet ucunun ucuna yerleştirildi. Sonrasında 40 mililitre sigara dumanı çekildi ve 30 saniye boyunca çalkalanarak karıştırıldı. Sigara tamamen bitene kadar işlem tekrarlandı. Elde edilen ekstrakt 0.22 mikronluk steril filtre ile steril bir falkona alındı. Ekstrakt deneylerden en fazla 30 dakika önce taze olarak hazırlandı (Li vd., 2020).



şekil 5: Sigara dumanı ekstraktının hazırlanması

3.2.8. Kan Beyin Bariyeri Modellemesi

İki tabakalı in vitro KBB deneylerinde 0,4 µm gözenek boyutuna ve 0,33 cm² büyüme alanına sahip, 6 kuyulu filtrelili polikarbonat membran içeren trans-well plaka kullanıldı. Trans-well plaka 2 kısımdan oluşmaktadır. Üst kısmı daha küçük alt kısmı daha büyüktür. Deneye başlamadan önce, trans-well'in üst kısmı önce ters çevrilerek kapiller bazal membranların ve ekstraselüler matriksin önemli üyeleri olan kollajen IV (10µg / cm², #C5533, Sigma) ve fibronektin (1 µg / cm², #PKSH032450, Elabscience) ile kaplandı ve hücre dışı matriks oluşturuldu. Kaplandıktan sonra trans-well'in alt tarafına 5x10⁴ T98G hücreleri eklendi. Hücreler yapışana kadar 37°C`de %5 CO₂ de inkübe edildi. T98G hücreleri yapıştıktan sonra kuyu tekrar düze çevrilerek oturtuldu ve 5x10⁴ HUVEC endotel hücreleri ekildi. Hücreler yapışana kadar 37°C`de %5 CO₂ de inkübe edildi. Bu şekilde in vitro KBB modeli oluşturuldu (Kuruca vd., 2017).



Şekil 6: KBB modeli (BioRender.com (2024), tarafından oluşturulmuştur.)

3.2.9. Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Deney gruplarında inflamasyon uygulamasından sonra IL-6, IL-8, TNF-α düzeyleri sırasıyla Human IL-6 ELISA Kit (#E0090Hu), Human IL-8 ELISA Kit (#E0089Hu), Human TNF-α ELISA Kit (#E0082Hu) (BT LAB) kitleriyle analiz edildi. Deneyler kitlerin protokollerine göre yapıldı. Uygulamalar 3 tekrarlı yapıldı (Prasad vd., 2015).

3.2.10. FITC (Floresan İzotiyosiyanat)- Dekstran Geçirgenlik Ölçümü

Geçirgenlik ölçümleri, 70 kDa'lık bir FITC-dekstranın apikalden bazolaterale hareketi ölçülerek gerçekleştirildi.

Apikal bölüme FITC-dekstran solüsyonu (1 mg/mL) eklenerek %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra insertler çıkarıldı ve altta kalan sıvı çekilerek 96 kuyulu bir well'e aktarıldı. Absorbans değerleri bir mikropilaka okuyucu ile floresan yoğunluğu 492 nm uyarma dalga boyunda ve 518 nm emisyon dalga boyunda ölçülmüştür (Bernard vd., 2019).

FITC-dekstran hücre geçirgenliğini hesaplamak için bu işlem kullanıldı;

Geçirgenlik (cm/s) = (bazal bölmedeki konsantrasyon x bazal bölmenin hacmi) / (geçirgenlik için mevcut yüzey alanı x apikal bölmedeki konsantrasyon) (Veszelka vd., 2018)

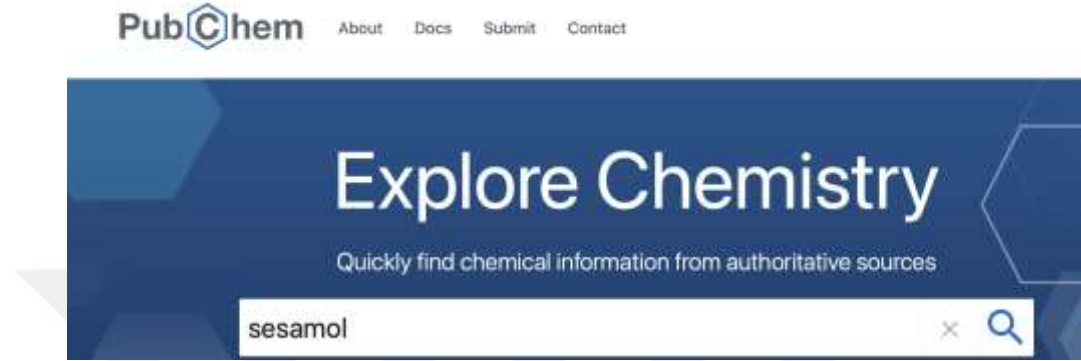
3.2.11. Tripın Mavisı Hücre Canlılığı

Tüm gruplarda önce apikal bölmedeki süpernatantlar atıldı. Daha sonra serumsuz DMEM ile insertlere değmeden çok dikkatli bir şekilde yıkandı. Ardından tripan mavisı ile 5 dakika inkübe edildi. Hücreler daha sonra DMEM ile üç kez yıkandı ve mavi boyanan ölü hücreler mikroskop altında gözlemlendi (Arslan vd., 2021).

3.2.12. Sesamolün In Silico Farmakokinetik Parametreleri

İlacın etkili olabilmesi için, güçlü bir molekülün vücuttaki hedefine yeterli konsantrasyonda ulaşması ve beklenen biyolojik olayların gerçekleşebilmesi için biyoaktif formda yeterince uzun süre kalması gereklidir. İlaç geliştirme süreci, keşfin giderek daha erken aşamalarında, düşünülen bileşiklerin sayısının fazla ancak fiziksel örneklere erişimin sınırlı olduğu bir dönemde emilim, dağılım, metabolizma ve atılımın (ADME: Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Eliminasyon) değerlendirilmesini içerir. 2D çizimler üzerinden tahmin etmek için kullanılan bir web tabanlı araçtır. Bu çerçevede, bilgisayar modelleri deneylere geçerli alternatifler sunmaktadır (Daina vd., 2017).

Molekölü manuel olarak çizmek yerine, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanında bulunan SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) kodu elde etmek için önce arama kutusuna “sesamol” yazıp aratıldı.



Şekil 7: PubChem veritabanı (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Sesamol; 533-31-3; 1,3-Benzodioxol-5-ol; 3,4-Methylenedioxyphenol; 3,4-(Methylenedioxy)phenol; ...

Compound CID: 68289
MF: C₇H₆O₃ MW: 138.12g/mol
IUPAC Name: 1,3-benzodioxol-5-ol
Isomeric SMILES: C1OC2=C(O1)C=C(C=C2)O
InChIKey: LUSZGTFNYDARNI-UHFFFAOYSA-N
InChI: InChI=1S/C7H6O3/c8-5-1-2-6-7(3-5)10-4-9-6/h1-3,8H,4H2
Create Date: 2005-03-26

[Summary](#) [Similar Structures Search](#) [Related Records](#)

Şekil 8: PubChem sesamol molekölü (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Sesamol>)

Seçilen moleköl için SMILES kodunu elde ettikten sonra SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) web sitesine yüklendi.

2.1.4 Canonical SMILES



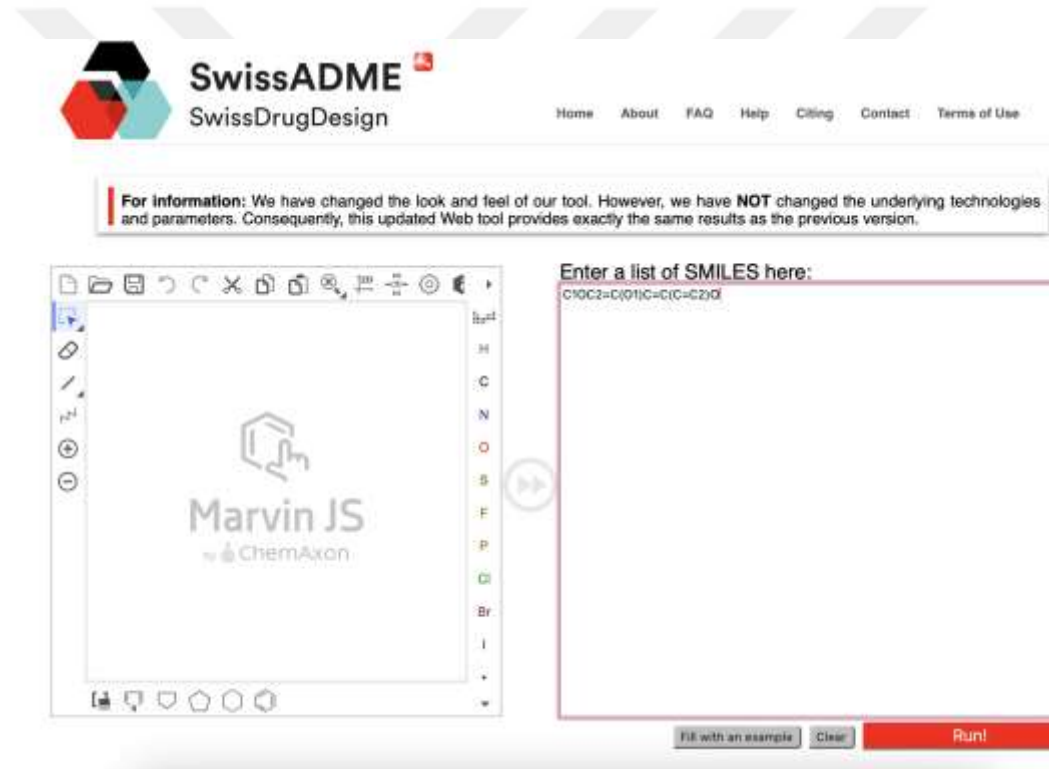
C1OC2=C(O1)C=C(C=C2)O

Computed by OEChem 2.3.0 (PubChem release 2021.10.14)

► PubChem

Şekil 9: Sesamol molekülünü SMILES kodu (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68289>)

Soldaki bölüm, çeşitli elementler kullanılarak ve MarjinJS aracılığı ile çizilen moleküllerin farmakokinetik özelliklerinin tahmin edilmesi için olanak tanır. Sağdaki bölüm ise, moleküllerin SMILES formatında girilerek sorgulanmasını sağlar. PubChem'den kopyalanan SMILES kodu sağdaki bölüme yapıştırıldı. "Run" düğmesine tıklayarak hesaplamalar başlatıldı.



Şekil 10: SwissADME arayüzü (<http://www.swissadme.ch/index.php#top>)

Sorgulanan molekülün fizikokimyasal özellikler başlığı altında; moleküler formülü, moleküler ağırlığı, ağır atom sayısı, Csp3 fraksiyonu, hidrojen bağı alıcısı sayısı, molar reaktivite ve toplam polar yüzey alanı (TPSA) gibi bilgiler sunulmaktadır. Farmakokinetik özellikler başlığı altında ise gastrointestinal (GI) emilim, KBB geçirgenliği, P-glikoprotein (P-gp) substratı olup olmadığı ve deri geçirgenliği hakkında detaylar verilmektedir. Ayrıca, ilaç benzerliği başlığı altında Lipinski, Ghose, Veber, Egan ve Muegge olmak üzere 5 farklı filtrenin yanı sıra biyoyararlanım skoru da

bulunmaktadır. Bu 5 filtre, adını bu kuralları oluşturan bilim insanlarından almakta ve her biri çeşitli moleküler özellikler içermektedir. Sonuçları inceleyerek molekülün ilaç geliştirme süreci için uygun olup olmadığını değerlendirebiliriz.

Lipinski'nin beş kuralına göre, bir ilaç adayı molekülün, moleküler ağırlığı ≤ 500 g/mol, lipofilisite katsayısı (LogP) ≤ 5 , hidrojen bağ vericisi ≤ 5 , hidrojen bağı alıcısı ≤ 10 ve molar kırılma değerinin 4-130 arasında olması gerekmektedir (Göktaş vd., 2023).

3.2.13. İstatiksel Analiz

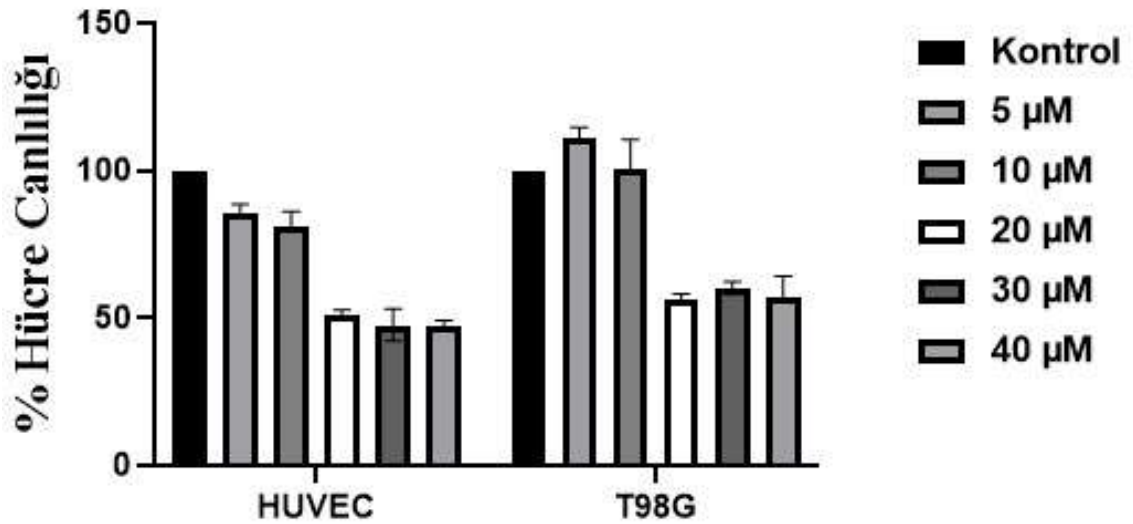
İstatistiksel analiz için Graphpad Prism V8.0 (Graphpad Prism Software, San Diego, CA) sürümü kullanıldı. 4 deney grubundaki değerlerde önemli değişiklikleri tespit etmek için Student's t-testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak p değerinin $< 0,05$ olması anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sigara Dumanı Ekstraktının ve Sesamolün HUVEC ve T98G Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

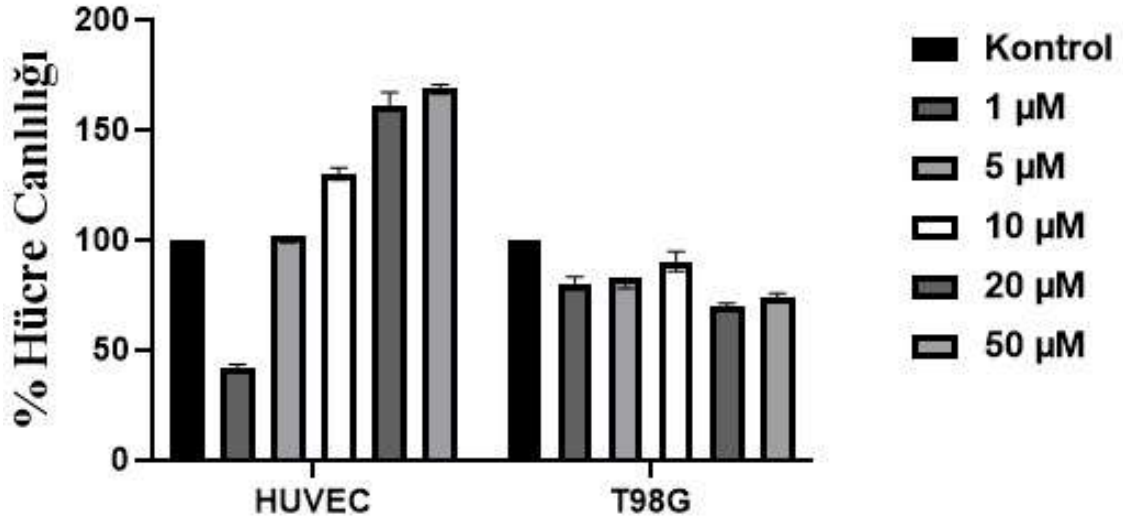
MTT deneyi, hazırlanan SDE ve sesamolün HUVEC ve T98G hücreleri üzerindeki uygun konsantrasyon aralığını belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Uygun konsantrasyon aralığı belirlendikten sonra HUVEC ve T98G hücrelerinde deney grupları ile tekrar MTT deneyi gerçekleştirilmiştir.

HUVEC ve T98G hücreleri için MTT canlılık testi uygulanarak SDE için 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M için konsantrasyonlarında hücre canlılığına bakılmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre SDE'ye maruz bırakılan HUVEC ve T98G hücrelerinde doz artışı oldukça toksisitenin de arttığı gözlemlenmiştir. HUVEC hücrelerinde 20 μ M'lik dozun %51.34 \pm 1,36, T98G hücrelerinde ise %55.94 \pm 2,24 canlılık gösterdiği için uygun konsantrasyon olarak seçilmiştir.



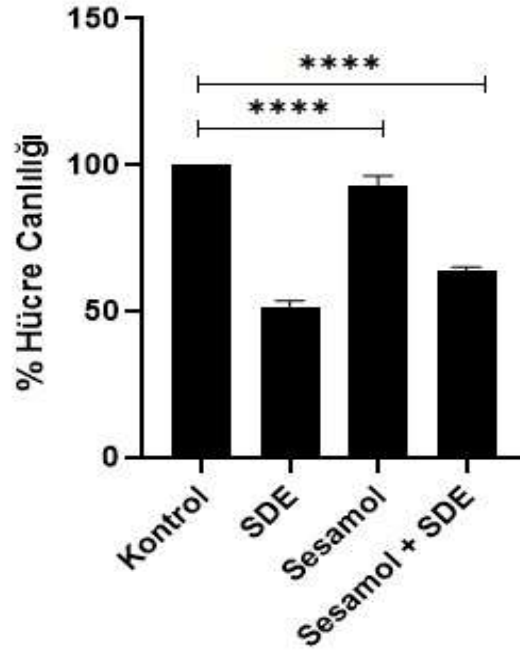
Şekil 11: Sigara dumanı ekstraktının HUVEC ve T98G hücreleri üzerindeki hücre canlılığı % sonuçları

HUVEC ve T98G hücrelerinde gerçekleştirilen MTT canlılık testinde, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M ve 50 μ M konsantrasyonları kullanılarak hücre canlılığı incelenmiştir. Elde edilen MTT sonuçları, HUVEC hücrelerinde sesamol maddesi için %130.12 \pm 2,83 canlılık oranı, T98G hücrelerinde ise %90.39 \pm 4,46 canlılık oranı ile kontrol grubuna en yakın sonuç veren 10 μ M uygun ve ortak konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

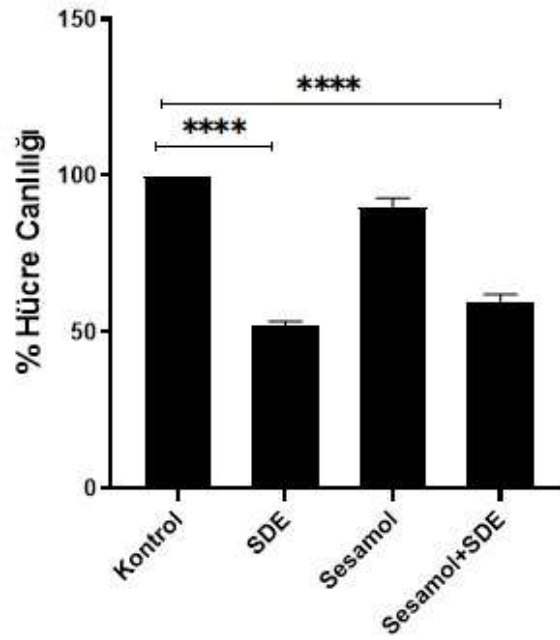


Şekil 12: Sesamol'un HUVEC ve T98G hücreleri üzerindeki hücre canlılığı % sonuçları

HUVEC ve T98G hücre hatlarında, deney gruplarında hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MTT sitotoksosite testi uygulanmıştır. 10 μ M sesamol ve 24 saat sonra 20 μ M SDE uygulanan HUVEC ve T98G hücrelerinde deney grupları kontrol, SDE, sesamol ve sesamol+ SDE ile birlikte oluşturulmuş ve bu grupların hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sesamol+ SDE uygulanan HUVEC hücrelerinde hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,0001$). Bununla beraber sadece sesamol olan grupta da anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,0001$). SDE uygulanan T98G hücrelerinde hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,0001$). Yine aynı şekilde sesamol+ SDE uygulanan T98G hücrelerinde anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,0001$).



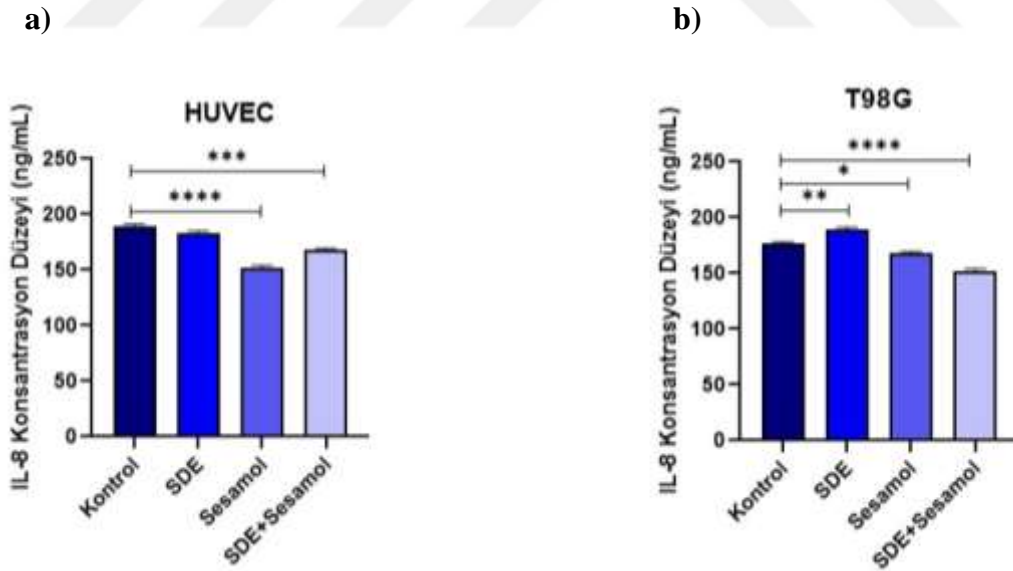
Şekil 13: Deney gruplarının HUVEC hücre canlılığı üzerine etkileri (****: $p < 0,0001$)



Şekil 14: Deney gruplarının T98G hücre canlılığı üzerine etkileri (****: $p < 0,0001$)

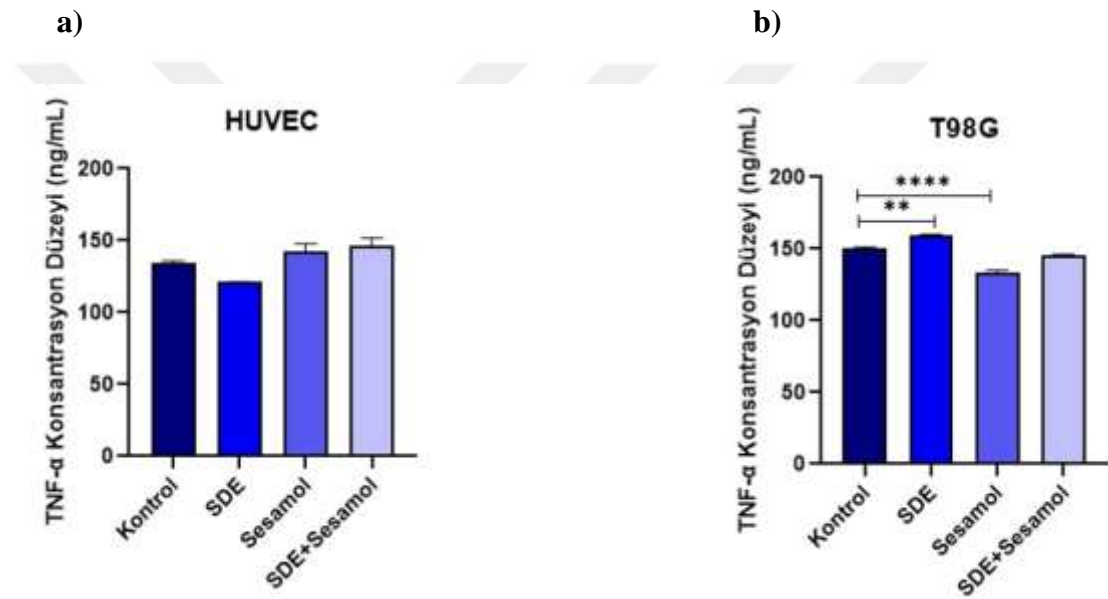
4.2. Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, HUVEC ve T98G hücre hatlarında farklı tedavi gruplarının IL-8 sitokin düzeyleri üzerinde etkileri protein konsantrasyon ölçümü ile değerlendirilmiştir. Deney kapsamında hücre hatlarında sırayla kontrol, SDE, sesamol ve sesamol+ SDE grupları oluşturularak, IL-8 düzeylerinin bu koşullara nasıl tepki verildiği incelenmiştir. İstatistiksel analizler, gruplar arasındaki anlamlı farkları göstermek için yapılmıştır. HUVEC hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sesamol ($p<0,0001$) ve sesamol+ SDE ($p=0,0003$) gruplarında IL-8 seviyesi anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bununla beraber yalnızca sesamol uygulanan grupta SDE grubuna kıyasla bir azalma olduğu ancak anlamlı bir değişiklik olmadığı bulunmuştur. Ayrıca koruyucu olarak sesamol uygulanan sesamol+ SDE grubunda yalnızca SDE uygulanan gruba kıyasla bir azalma olduğu ancak anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. T98G hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla SDE ($p=0,0038$), sesamol ($p=0,0340$) ve sesamol+ SDE ($p<0,0001$) gruplarında IL-8 seviyesi anlamlı bir fark göstermiştir.



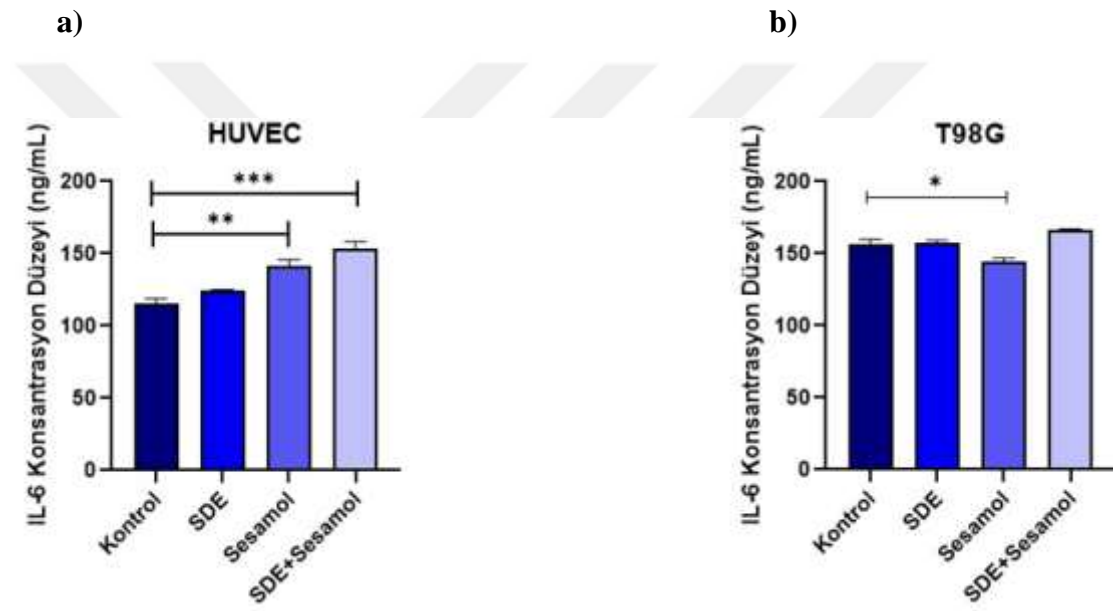
Şekil 15: HUVEC ve T98G hücre hatlarında deney gruplarında IL-8 sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi **a)** (***: $p=0,0003$; ****: $p<0,0001$); **b)** (*: $p=0,0340$; **: $p=0,0038$; ****: $p<0,0001$)

Bu çalışmada, HUVEC ve T98G hücre hatlarında farklı tedavi gruplarının TNF- α sitokin düzeyleri üzerinde etkileri protein konsantrasyon ölçümü ile değerlendirilmiştir. Deney kapsamında hücre hatlarında sırayla kontrol, SDE, sesamol ve sesamol+ SDE grupları oluşturularak, TNF- α düzeylerinin bu koşullara nasıl tepki verdiği incelenmiştir. HUVEC hücrelerinde TNF- α seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı bulunmuştur. T98G hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla SDE ($p=0,0029$) ve sesamol ($p<0,0001$) gruplarında TNF- α seviyesi anlamlı bir fark göstermiştir. Bununla beraber sesamol+ SDE uygulanan grupta anlamlı bir değişiklik olmadığı bulunmuştur.



Şekil 16: HUVEC ve T98G hücre hatlarında deney gruplarında TNF- α sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi
b) (**: $p=0,0029$; ****: $p<0,0001$)

Bu çalışmada, HUVEC ve T98G hücre hatlarında farklı tedavi gruplarının IL-6 sitokin düzeyleri üzerinde etkileri protein konsantrasyon ölçümü ile değerlendirilmiştir. Deney kapsamında hücre hatlarında sırayla kontrol, SDE, sesamol ve sesamol+ SDE grupları oluşturularak, IL-6 düzeylerinin bu koşullara nasıl tepki verdiği incelenmiştir. HUVEC hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sesamol ($p=0,0040$) ve sesamol+ SDE ($p=0,0004$) gruplarında IL-6 seviyesi anlamlı bir artış göstermiştir. T98G hücrelerinde sesamol ($p=0,0252$) grubunda anlamlı bir azalma göstermiştir. SDE ve sesamol+ SDE gruplarında anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 17: HUVEC ve T98G hücre hatlarında deney gruplarında IL-6 sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi a) (**: $p=0,0040$; ***: $p=0,0004$); b) (*: $p=0,0252$)

4.3.FITC-Dekstran Geçirgenlik Ölçümü

Bu deneyde, HUVEC ve T98G hücre hatlarıyla oluşturulan KBB modelinde FITC-dekstran kullanılarak, deney gruplarında bariyer geçirgenliği üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. KBB modelinde FITC-dekstran apikalden bazolaterale hareketi ölçülerek geçirgenlik hesaplanmış ve grafiksel olarak sunulmuştur.

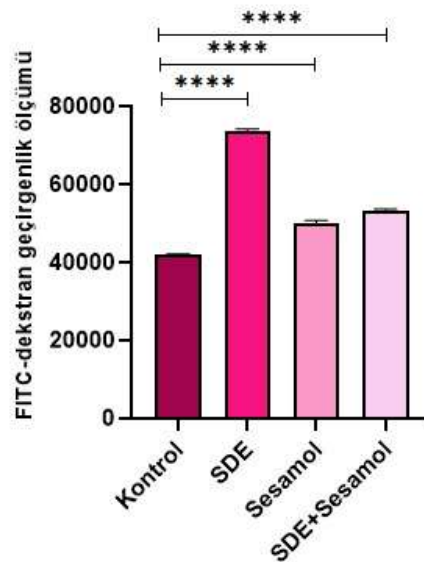
Geçirgenlik grafiği in vitro KBB modellerinde hücre katmanlarının geçirgenliğini değerlendirmek için kullanılır. Grafiği yorumlamak hücre bariyer fonksiyonunu ve

maddelerin bariyer üzerindeki etkisini anlamak için önemlidir. KBB (kontrol) grubuyla diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$).

SDE uygulanan grupta geçirgenlik kontrole kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Bu SDE'nin hücre bariyerine zarar vererek FITC-dekstran'ın geçişini kolaylaştırdığını gösterir. Bu durum SDE'nin hücre bariyerini zayıflattığını ve geçirgenliği artırdığını gösterir. SDE ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,0001$).

Sesamol uygulandığında geçirgenlik kontrole kıyasla yakın seviyelerdedir. Bu durum sesamolün hücre bariyerini koruyucu bir etki yarattığını ve geçirgenliği azaltmayı yardımcı olduğunu gösterir. Kontrole kıyasla sesamol grubunda anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,0001$).

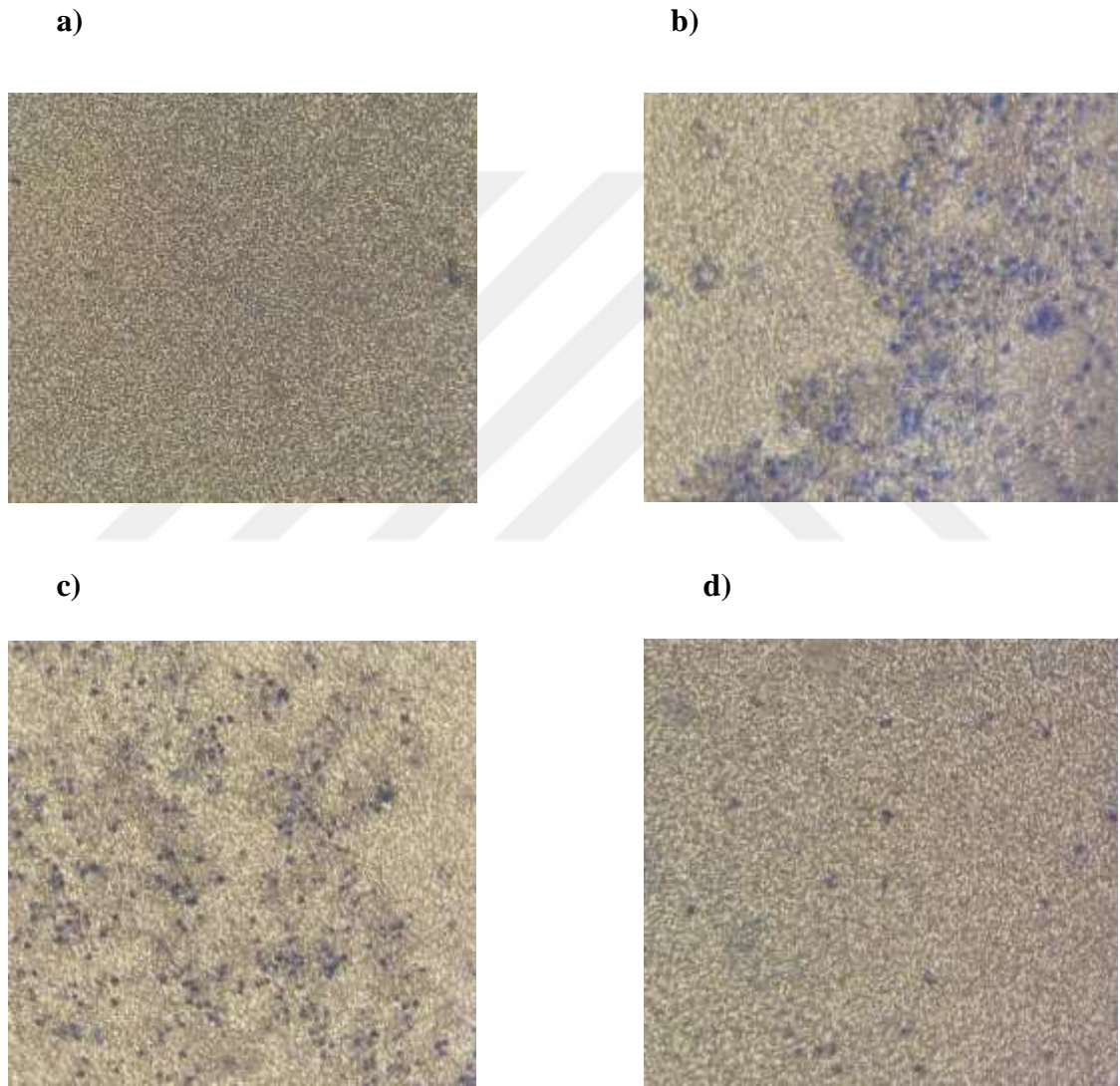
Sesamol+ SDE grubunda ise, SDE'nin zarar verici etkisinin sesamol tarafından dengelendiği bulunmuştur. Geçirgenlik SDE grubundan düşük ancak kontrol grubundan daha yüksektir. Bu durum SDE'nin zarar verici etkisini tam olarak engelleyemediğini ancak azaltabildiği bulunmuştur. Kontrol grubu ile sesamol+ SDE arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,0001$).



Şekil 18: FITC-dekstran geçirgenlik grafiği (****: $p<0,0001$)

4.4.Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı

KBB modeline verilen hasarı ve tedavi yöntemi olarak kullanılan sesamolün görsel olarak etkisi gözlemlendi. Sadece hücrelerin olduğu kontrol KBB modelinde ölü hücreler gözükmez iken, SDE ile inkübe edilen KBB modelinde %50'ye yakın tripan mavisi ile boyanmış ölü hücreler gözlemlenmektedir. Aynı şekilde SDE ile inkübe edilen KBB modeli ve sesamol+ SDE ile inkübe edilen KBB modelini karşılaştırdığımızda ise tedavi amacıyla kullanılan sesamolün büyük ölçüde ölü hücreleri iyileştirdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 19: a) KBB modeli; b) KBB + SDE; c) KBB + sesamol + SDE; d) KBB + sesamol

4.5. Sesamolün In Silico Farmakokinetik Parametreleri

İncelenen sesamolün, fizikokimyasal özellikleri, farmakokinetik özellikleri, lipofilikliği, farmokokinetikliği ve ilaç benzerliği değerlendirilmiştir; özellikle KBB'yi geçebilme yeteneği ve (GI) emilim kapasitesi, nörolojik hastalıklar için potansiyel bir tedavi ajanı olarak değerlendirilebilir.

Molekül formülü; $C_7H_6O_3$, molekül ağırlığı ise 138,12 g/mol. Bu, hafif bir molekül olduğunu gösterir. Molar reaktivite; 34.53'tür ve TPSA 38.69 Å², molekülün polarite seviyesini ve hidrofobik bölgelerini yansıtır. Hidrojen bağları; 3 hidrojen bağı alıcısı bu da molekülün çözünürlük ve biyolojik bağlanma yeteneğini etkileyebilir. Sesamol için logP değeri verilmiştir (Consensus $P_{o/w}$ (yağ/su dağılım katsayısı): 1.57). logP değerlerinin ortalamasını temsil eden bir değerdir. Genel olarak, logP değeri 1-3 aralığında olduğunda molekül lipofilik kabul edilir ve hücre zarından geçiş yeteneği yüksek anlamına gelmektedir (Daina vd., 2017). GI yüksek çıkmıştır, bu da molekülün oral yolla alındığında iyi emileceğini gösterir. Ayrıca KBB'yi geçebildiği gösterilmiştir. Bu, sesamolün potansiyel olarak MSS üzerindeki etkileri açısından önemlidir. Sesamol molekülü SwissADME sonuçları incelendiğinde Lipinski filtresinden geçtiği görülmüştür. Bu da ilaç benzerliği kurallarına uygun olduğunu, yani iyi biyoyararlanım potansiyeline sahip olduğunu belirtir. Sesamol, sentetik erişebilirlik puanı 2.27 olarak gösterilmektedir. Bu puanlar 1 ile 10 arasında değişmektedir. Sentetik erişebilirlik puanı 1'e ne kadar yakınsa laboratuvar ortamında sentezlenmesinin daha kolay sentezlenebileceğini, daha yüksek puanların ise sentezin karmaşık ve zor olduğunu göstermektedir (Daina vd., 2017).

Tablo 1: Sesamol molekülü SwissADME sonuçları

Fizikokimyasal Özellikler	
Formül	C7H6O3
Moleküler Ağırlık	138.12 g/mol
Ağır Atom Sayısı	10
Csp3	0.14
H bağ alıcıları	3
H bağ vericisi	1
Molar Reaktivite	34,53
TPSA	38,69 Å ²
Lipofiliklik	
Log $P_{o/w}$	1,19
Farmokokinetik	
GI Emilimi	Yüksek
KBB Geçirgenliği	Evet
P-gp substrat	Hayır
Log K_p (cilt geçirgenliği)	-6.27 cm/s
İlaç Benzerliği	
Lipinski	Evet; 0 ihlal
Biyoyararlanım puanı	0,55
Tıbbi Kimya	
Kurşun Benzerliği	Hayır; 1 ihlal: MW<250
Sentetik Erişebilirlik	2.27

5. TARTIŞMA

Yapılan çalışma sonucunda, SDE uygulanan HUVEC ve T98G hücrelerinde, özellikle HUVEC hücrelerinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücre ölümü gözlemlenmiştir. T98G hücrelerinde ise 20 µM, 30 µM ve 40 µM'lık konsantrasyonlarda hücre ölümü gözlemlenmiştir. In vitro KBB modeli için ortak doz 20 µM olarak belirlenmiştir. Sesamolün HUVEC ve T98G hücreleri için 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığına bakılmıştır. HUVEC ve T98G hücrelerinde 10 µM'lık konsantrasyon kontrole en yakın ve iki hücre için de ortak konsantrasyon olarak belirlenmiştir. T98G ve HUVEC hücrelerinde sesamol+ SDE grubunda hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,0001$).

Çeşitli kimyasal bileşiklerin farklı hücre hatlarında sitokin ekspresyonu üzerindeki etkilerini analiz etmek ve tedavi yöntemlerinin hastalık modelleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için IL-6 seviyelerindeki değişimler gözlemlendiği bildirilmiştir (Dong vd., 2021; Landau Albrecht vd., 2021). MSS'de; TNF- α ve IL-6 seviyelerinin yükselmesi nöro inflamasyonun başlangıcını gösteren bir işarettir (Soltani Khaboushan vd., 2022). Ayrıca IL-6'nın in vitro endotel hücre katmanlarının geçirgenliğini artırabildiği ve bu yolla inflamatuvar aracılardan MSS'ye girişini kolaylaştırdığı için KBB işlev bozukluğunda önemli bir faktör olarak bildirilmiştir (Zhang vd., 2015). Ancak IL-6, antiinflamatuvar ve metabolik etkilerle de ilişkilidir (Villar-Fincheira vd., 2021). Bir miyokin olarak IL-6, antiinflamatuvar ve metabolik süreçlere aracılık etmek için endokrin hormon benzeri bir şekilde etki eder (Pedersen, 2013). Yapılan bir çalışmada, IL-6'nın kültürlenmiş insan monositlerinde lipopolisakkarit kaynaklı TNF- α 'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (Villar-Fincheira vd., 2021). Aynı zamanda sağlıklı bireylerde rekombinant IL-6 infüzyonunun LPS kaynaklı TNF- α 'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (Starkie vd., 2003). T hücre aktivasyonu ile ilişkili hepatik hasar modelinde, rekombinant IL-6 uygulamasının TNF- α üretimini azaltarak koruyucu bir etki gösterdiği belirtilmiştir. IL-6, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) ve IL-10 gibi antiinflamatuvar moleküllerin üretimini artırarak ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayarak antiinflamatuvar bir yanıtı tetikleyebilir. IL-6'nın antiinflamatuvar ve rejeneratif aktiviteleri ile proinflamatuvar etkilerinin farklı sinyal

yolakları aracılığıyla oluştuğu bildirilmiştir (Villar-Fincheira vd., 2021). IL-6 sinyallemede, IL-6 reseptörü (IL-6R) bir ligand bağlayıcı reseptör olarak görev yaparken, gp130 ise JAK/STAT, MAPK ve PI3K yolunun aktivasyonu yoluyla hücre içi aşağı akış sinyallemesini başlatan bir sinyal reseptörü olarak görev yapar. Gp130'un bireysel IL-6 ve IL-6R'ye karşı afinitesi yoktur ve yalnızca IL-6-IL-6R kompleksine bağlanır. İki tip IL-6R vardır; klasik sinyallemeyi aktive eden membrana bağlı IL-6R (mIL-6R) ve trans-sinyallemeyi aktive eden çözümlü IL-6R (sIL-6R). IL-6'nın antiinflamatuvar etkileri esas olarak klasik sinyalleme yoluyla gerçekleştirilir. gp130 çoğunlukla nöronlar ve glial hücrelerde ifade edildiğinden, IL-6 sIL-6R'ye bağlandığında, esas olarak IL-6'nın proinflamatuvar rollerini yönlendiren trans-sinyallemeyi aktive edebilir. Ancak, kan dolaşımında gp130'un çözümlü bir formu (sgp130) bulunur ve IL-6-IL-6R kompleksine bağlanarak trans-sinyallemeyi inhibe eder, böylece IL-6'nın proinflamatuvar aktivitelerini düzenler (Soltani Khaboushan vd., 2022). Farklı hücre tiplerinde IL-6'nın proinflamatuvar ve antiinflamatuvar etkilerinde rol oynayan mekanizmayı tam olarak açıklamak için daha fazla çalışma gerekmektedir.

Kaisar vd. (2015) yaptıkları çalışma sonucunda SDE'nin IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımının artırdığını ve hücre yapışma molekülleri olan PECAM-1 ve VCAM-1'in ekspresyonunu tetiklediği belirtilmiştir. Bu moleküllerin artışı inflamasyon sürecinin bir parçası olarak kabul edilmiştir. SDE'ye maruz kalmanın hem inflamasyonu hem de oksidatif stresi tetikleyeceği bildirilmiştir (Kaisar vd., 2015). Bir çalışmada SDE'ye maruz kalan endotel hücrelerinde IL-6 salınımında önemli bir artış olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca, TNF- α seviyesinin okuma sınırlarının altında olduğu belirtilmiştir (Lim vd., 2019).

Sesamolün, farklı hücre hatları üzerinde serbest radikalleri süpürme etkisi olduğu bildirilmiştir (Ali vd., 2021; Liou vd., 2020; Liu vd., 2017; Wu vd., 2019). Ayrıca hücre hatlarında oluşturulan inflamasyon modellerinde antiinflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır (Cao vd., 2014; Wang vd., 2021). Sesamolün beyinde IL-6 seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (Y. Wang vd., 2023). Ayrıca, sesamolün TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek deneysel inflamasyon modellerinde inflamasyonu azaltabildiği bildirilmiştir (Afroz vd., 2019; Hemshekhar vd., 2013; Khorrami vd., 2018).

Yapılan çalışma doğrultusunda HUVEC hücrelerinde IL-6 seviyesinin kontrol grubuna kıyasla sesamol ($p=0,0040$) ve sesamol+ SDE ($p=0,0004$) gruplarında artarken, T98G hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sesamol ($p=0,0252$) grubunda azaldığı bulunmuştur. Yapılan literatür taraması, farklı hücre hatlarında elde edilen farklı sonuçların klasik ve trans sinyal yollarına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bir glia hücresi olan T98G hücrelerinde IL-6 seviyesinin sesamol uygulamasıyla azalmış olması burada trans-sinyalleme yolunun aktif olduğunu düşündürürken, HUVEC hücrelerinde ise sesamol uygulamasıyla IL-6 seviyesinin artmış olması bu hücrelerde klasik sinyalleme yolunun aktif olduğunu düşündürmektedir.

TNF'in, TNF reseptörü 1'e (TNFR1) bağlanması NF- κ B ve MAPK sinyal yollarını aktive ederek doğrudan inflamasyonu teşvik eder; bu da sitokinler ve kemokinler gibi proinflamatuvar mediyatörleri kodlayan genlerin ekspresyonunun artışına yol açar. TNFR1 aktivasyonu ayrıca hücre ölümünü tetikleyerek dolaylı olarak inflamasyonu teşvik eder. Apoptozis kaynaklı sekonder nekroz, piroptozis ve nekroptozis gibi hücre ölümünün litik formları, hücrelerde proinflamatuvar gen ekspresyonunu aktive eden DAMP salgılar (van Loo & Bertrand, 2023).

Yapılan çalışma doğrultusunda T98G hücrelerinde TNF- α seviyesinin kontrol grubuna kıyasla SDE ($p=0,0029$) grubunda arttığı, sesamol ($p<0,0001$) grubunda azaldığı, ancak HUVEC hücrelerinde gruplar arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). T98G hücresinde kontrol grubuna kıyasla SDE ile oluşturulan inflamasyon modelinde TNF- α düzeyinin artış göstermesi SDE'nin inflamasyonu tetiklediğini ifade etmektedir. Ayrıca sesamol uygulanan grupta TNF- α seviyesinin azalması sesamolün antiinflamatuvar etkisini destekler niteliktedir. Ancak, HUVEC hücrelerinde TNF- α seviyesinde gruplar arasında bir değişim görülmemiş olması, kullanılan sesamol konsantrasyonunun HUVEC hücrelerinde TNF- α seviyesi üzerinde bir etki göstermediğini bununla beraber farklı konsantrasyonların araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

IL-8 (CXCL8), bağışıklık ve diğer hücre tipleri tarafından inflamasyon koşulları altında üretilen CXC kemokin ailesinin bir üyesi olan proinflamatuvar bir kemokindir. IL-8, oksidatif metabolizmayı bozarak ve ROS oluşumunu artırarak oksidatif strese yol açar.

IL-8, G-protein bağı reseptörler olan CXCR1 ve CXCR2 ile etkileşime girerek PKB, MAPK, PKC inflamatuvar yolların aktivasyonu ile indüklenir (Matsushima vd., 2022).

Yapılan çalışma doğrultusunda, HUVEC hücrelerinde IL-8 seviyesinin kontrol grubuna kıyasla sesamol ($p<0,0001$) ve sesamol+ SDE ($p=0,0003$) gruplarında azaldığı, bununla beraber T98G hücrelerinde IL-8 seviyesinin kontrol grubuna kıyasla SDE grubunda arttığı ($p=0,0038$), sesamol ($p=0,0340$) ve sesamol+ SDE ($p<0,0001$) gruplarında azaldığı bulunmuştur. Sesamol uygulanmasının IL-8 düzeyini azaltması, sesamolün antiinflamatuvar etkisi olduğunu göstermektedir.

KBB, beyin ve periferik dolaşım arasında yer alan, endotel hücrelerden oluşan bir arayüzdür. Beyinde homeostazın korunması zararlı maddelerin girişinin engellenmesi açısından hayati bir öneme sahiptir. Bu bariyerin bütünlüğü, TJ'ler aracılığıyla sağlanır (Megra vd., 2018; Natarajan vd., 2017). KBB'nin önemli bir özelliği, endotel hücreleri arasında bulunan TJ'lerdir. Bu bağlantılar, çözünür maddelerin hücreler arası geçişini engelleyerek bir bariyer oluşturur. TJ'ler, çeşitli sinyal yolları ve faktörler tarafından düzenlenen dinamik yapılardır ve TJ proteinlerinin ekspresyonunu ve lokalizasyonundaki değişiklikler, KBB geçirgenliğini etkiler. Ayrıca bu proteinlerin düzenlenmesi, hücreler arası etkileşimler ve beyin fonksiyonlarını etkilediği bildirilmiştir (VanGilder & Huber, 2014). KBB'nin artan geçirgenliği, normale göre beyne zararlı ajanların erişimini sağlayarak, dolaşım sisteminden beyne normalde geçemeyen maddelerin zararlı etkilere neden olabileceği durumları içerir. KBB'nin bütünlüğünü doğru bir şekilde değerlendirmek için moleküler ağırlığı 4 ila 70 kDa arasında değişen FITC ile işaretlenmiş dekstran gibi, normalde KBB'yi geçemeyen büyük floresan molekülün periferik perfüzyonu ve beyindeki ölçümü, KBB'nin olası bir hasarının bir göstergesi olarak belirtilmiştir (Natarajan vd., 2017). Bir örnek çalışmada FITC-dekstran, KBB boyunca ilaç geçirgenliğini taramak için mikroakışkan modellerde kullanılmış ve artan moleküler boyut ile geçirgenlikte bir azalma olduğu gösterilmiştir (Jin vd., 2018; Natarajan vd., 2017). KBB'nin FITC-dekstran geçirgenliği inflamasyon halinde değişim gösterir (Megra vd., 2018; Natarajan vd., 2017). FITC-dekstranın KBB'yi geçme mekanizması hem transselüler hem de paraselüler yolları içerir. Transselüler yol, FITC-dekstranın endositoz ile alınıp beyin parankimine salınmasını, paraselüler yol ise endotel hücreleri arasından geçmesini kapsar. Normalde TJ'ler bu hareketi engellerken, inflamasyon bu bağlantıların bozulmasına yol açarak KBB'nin geçirgenliğini artırabilir.

Özellikle TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar araçlar, sıkı bağlantıların açılmasına ve FITC-dekstran geçişinin artmasına neden olabilir (Lu vd., 2023; Natarajan vd., 2017). Nöroinflamasyonun tetiklenmesi ile TNF- α , IL-6 ve IL-8'in konsantrasyonlarının arttığı, ROS üretiminin yükseldiği ve hücrelerde kalsiyum iyonlarının biriktiği bildirilmiştir. Bu süreçlerin MMP-9'un transkripsiyonunu ve ekspresyonunu artırarak KBB'nin geçirgenliğini ve doku hasarını artırabileceği bildirilmiştir (Du & Wang, 2020).

Bir çalışmada sesamolün KBB'yi geçerek nöroprotektif etkiler gösterdiği ve sesamolün KBB'yi etkili bir şekilde geçerek doğrudan beyin hücrelerini koruyabildiğini aynı zamanda vücutta oluşan diğer bileşiklere göre beyin dokusunda çok daha yüksek konsantrasyonlara ulaştığı gösterilmiştir (Y. Wang vd., 2023).

Prasad vd. (2013) yaptıkları tek tabakalı in vitro KBB çalışmasında, SDE maruziyetinin KBB endotel hücrelerinde işlev bozukluğuna ve güçlü bir inflamatuvar yanıtının tetiklenmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun, TJ proteinlerinin ifadesinde bir azalma meydana getirdiği bildirilmiştir. Bu değişikliklerin, KBB'nin bütünlüğünde bozulmalara ve inflamatuvar süreçlerin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Prasad vd., 2015).

Naik vd. (2014) yaptıkları çalışmada özellikle nikotinin ve ROS'un nasıl oksidatif stresi artırabileceğini ve böylece çeşitli hücre ve dokularda, özellikle MSS ve KBB üzerinde oksidatif hasara yol açabileceğini açıklamıştır. Ayrıca endotel hücrelerin, oksidatif strese karşı özellikle savunmasız olduğunu ve bu durumun TJ komplekslerinin ifadesinde değişikliklere yol açarak KBB'nin bütünlüğünü ve fonksiyonunu bozacağı belirtilmiştir. Çalışma sonucunda okludin proteininin membran ekspresyonu önemli ölçüde azaldığını belirtmiştir (Naik vd., 2014).

Yapılan in vitro çalışmada ve önceki çalışmalar doğrultusunda, SDE'nin kısa süreli maruz kalması halinde bile serebral endotel hücrelerde KBB'nin bütünlüğünde bozulmalar gözlemlenmiştir. Bu bozulmalar, özellikle hücreler arası geçişleri artırarak, KBB'nin sızdırmazlık özelliğinin zayıflamasına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmadaki önemli noktalardan biri ise SDE konsantrasyonlarının endotel hücrelerinde açık bir şekilde ölüme yol açmadığıdır. Bu konsantrasyonlar hücrelerin canlılığını

korurken, KBB'nin işlevsellik düzeyinde belirgin değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Bernard vd., 2019).

Biz de bu çalışmalardan yola çıkarak çift tabakalı in vitro KBB modelinde SDE ile oluşturduğumuz inflamasyon ile sesamolün koruyucu etkisini inceledik. Yapılan çalışma sonucunda SDE verilen grupta en yüksek değer elde edilmiştir. Bu da SDE'nin bariyere zarar vererek geçirgenliği önemli ölçüde artırdığını gösterir. Bu da çalışmamız amacını karşılamaktadır. Sesamol ile inkübe edilen grupta ise bariyeri koruyucu etki göstermiş ve geçirgenliği kontrol seviyesine yakın çıkmıştır. Geçirgenliğin azalması bariyerin daha sıkı hale gelmiş olmasını gösterir. Bu da bariyerin zarar görmediğini aksine daha koruyucu hale geldiğini gösterir. Farklı bir deyişle de bariyerin moleküllerin geçişini daha etkin bir şekilde engellediği anlamına gelir. Kontrol grubuna göre geçirgenliğin azalması bariyer fonksiyonunun daha iyi çalıştığını göstermektedir. Sesamol+ SDE grubunda ise, SDE'nin bariyere verdiği zarar sesamol tarafından tam olarak engelleyemediğini ancak azaltabildiği bulunmuştur. KBB (kontrol) grubuna kıyasla diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Tripan mavisi ile boyama, hücre zarı bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. İn vitro KBB modelinde bu boyama yöntemi, hücre sağlığı ve bariyer fonksiyonu değerlendirme açısından önemlidir. Tripan mavisi, yalnızca zarar görmüş veya ölü hücrelerin sitoplazmasından geçebilen bir boyadır. Bu nedenle, KBB modeline koruyucu olarak kullanılan sesamolün etkilerini görsel olarak incelemek mümkündür. Kontrol KBB modelinde, ölü hücreler gözükmez iken, SDE uygulanan KBB modelinde %50 oranında tripan mavisi ile boyanmış ölü hücreler tespit edilmiştir. Ayrıca SDE uygulanan KBB modeli ile sesamol+ SDE ile inkübe edilen KBB modelini karşılaştırdığımızda, koruyucu olarak uygulanan sesamolün ölü hücrelerin miktarını belirgin bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir.

Geeth vd. (2015) tarafından yapılan in vivo deneysel çalışmada, sesamolün farmokinetik etkileri araştırılmış ve lipofilik yapısı nedeniyle KBB'den kolayca geçebildiği tespit edilmiştir (Geetha vd., 2015). Sesamolün SwissADME gibi araçlarla incelenen farmakokinetik özellikleri, bu bileşiğin tedavi amaçlı kullanımını destekleyen iyi emilim ve dağılım özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle, sesamolün KBB dahil olmak üzere biyolojik bariyerlere nüfuz edebilme kapasitesi, onu

nöroinflamatuvar bozuklukların tedavisi için umut verici bir aday olarak konumlandmaktadır (Javed vd., 2024; Xia vd., 2022). Sesamol önemli sinyal yollarını inhibe etme, oksidatif stresin modülasyonu ve uygun farmakokinetik profillere sahip olma özellikleriyle öne çıkan, çok yönlü ve etkili bir antiinflamatuvar bileşiktir. Sesamol, nöroinflamasyonun azaltılması ve KBB fonksiyonlarının korunması açısından potansiyel bir aday olarak öne çıkmaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada, SDE'nin KBB geçirgenliğini arttırdığını ve proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-8'i arttırdığını gösterdik. Çalışmada, sesamolün de koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MSS'nin görevini gerçekleştirebilmesi için kontrollü bir mikro ortam gereklidir. Bu ortam, kan ve beyin arasında hücrelerin, moleküllerin ve iyonların taşınmasının sıkı bir şekilde düzenlenmesiyle sağlanır. KBB'nin yapısal bütünlüğü ve fonksiyonu, biyolojik mediyatörler olan sitokinler tarafından korunmaktadır. KBB, MSS ile periferik dolaşım arasında bir arayüz oluşturarak gerekli homeostazı sağlar. Ancak sigara dumanı, endotelial inflammatuar yanıtı tetikleyerek KBB'ye zarar verir. Bu hasarı onarmak için KBB'yi geçebilecek terapötik hedefler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Son yıllarda, KBB'yi geçebilme özelliğine sahip olan sesamol, araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Sesamol, antiinflammatuar, antitümör, antioksidatif gibi birçok farklı farmakolojik özelliğe sahiptir. Bu nedenle, çalışmamızda SDE ile inflamasyon modeli oluşturulmuş ve sesamolün antiinflammatuar etkisi incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, SDE ile oluşturulan inflamasyon modelinde sesamolün, protein düzeyinde antiinflammatuar bir etki etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlarımız, literatürle uyumlu olarak, sesamolün inflamasyonun tetiklendiği modellerde antiinflammatuar etkiler sergileyebileceğini doğrulamakta ve bu etki mekanizmasının aydınlatılması için ön veri sağlamaktadır. Gelecekteki araştırmalara bu bağlamda ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Afroz, M., Zihad, S. N. K., Uddin, S. J., Rouf, R., Rahman, M. S., Islam, M. T., ... & Sarker, S. D. (2019). A systematic review on antioxidant and antiinflammatory activity of Sesame (*Sesamum indicum* L.) oil and further confirmation of antiinflammatory activity by chemical profiling and molecular docking. *Phytotherapy Research*, 33(10), 2585-2608.
- Ahmad, S., Zafar, I., Mariappan, N., Husain, M., Wei, C. C., Vetat, N., ... & Ahmad, A. (2019). Acute pulmonary effects of aerosolized nicotine. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(1), L94-L104.
- Ali, R., Tabrez, S., Akand, S. K., Rahman, F., Husein, A., Arish, M., ... & Rub, A. (2021). Sesamol induces apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 749420.
- Andargie M, Vinas M, Rathgeb A, Möller E, Karlovsky P. Lignans of Sesame (*Sesamum indicum*L.): A Comprehensive Review. *Molecules*. 2021 Feb 7;26(4):883.
- Arslan, B. A., Satici, İ., Arslan, E. F., Yanık, A., & Gültekin, S. K. (2021). Protective effects of Folic acid and Vitamin C against iron overload at the in vitro blood-brain barrier. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(3), 353-359.
- Atasever Arslan, B., Kaya, B., & Ülküseven, B. (2023). Synthesis, SARS-CoV-2 3CL main protease inhibitor, anti-inflammatory, and wound-healing effects of a zinc (II)-thiosemicarbazone complex. *Applied Organometallic Chemistry*, 37(4), e7030.
- Bellettato CM, Scarpa M. Possible strategies to cross the blood-brain barrier. *Ital J Pediatr*. 2018 Nov 16;44(Suppl 2):131.
- Bernard A, Ku JM, Vlahos R, Miller AA. Cigarette smoke extract exacerbates hyperpermeability of cerebral endothelial cells after oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *Sci Rep*. 2019 Oct 30;9(1):15573.
- Bernardo-Castro S, Sousa JA, Brás A, Cecília C, Rodrigues B, Almendra L, Machado C, Santo G, Silva F, Ferreira L, Santana I, Sargento-Freitas J. Pathophysiology of Blood-Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Front Neurol*. 2020 Dec 9; 11:594672.

- Broux, B., Zandee, S., Gowing, E., Charabati, M., Lécuyer, M. A., Tastet, O., ... & Prat, A. (2020). Interleukin-26, preferentially produced by TH17 lymphocytes, regulates CNS barrier function. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 7(6), e870.
- Brown LS, Foster CG, Courtney JM, King NE, Howells DW, Sutherland BA. Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Neurosci*. 2019 Jun 28; 13:282.
- Cao, Y., Liu, F., Huang, Z., & Zhang, Y. (2014). Protective effects of Guanxin Shutong capsule drug-containing serum on tumor necrosis factor- α -induced endothelial dysfunction through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and the nitric oxide pathway. *Experimental and therapeutic medicine*, 8(3), 998-1004.
- Carnevali, S., Petruzzelli, S., Longoni, B., Vanacore, R., Barale, R., Cipollini, M., ... & Giuntini, C. (2003). Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(6), L955-L963.
- Chapouly C, Tadesse Argaw A, Horng S, Castro K, Zhang J, Asp L, Loo H, Laitman BM, Mariani JN, Straus Farber R, Zaslavsky E, Nudelman G, Raine CS, John GR. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain*. 2015 Jun;138(Pt 6):1548-67.
- Cohen, S. S., Min, M., Cummings, E. E., Chen, X., Sadowska, G. B., Sharma, S., & Stonestreet, B. S. (2013). Effects of interleukin-6 on the expression of tight junction proteins in isolated cerebral microvessels from yearling and adult sheep. *Neuroimmunomodulation*, 20(5), 264-273.
- Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem Res*. 2009 Dec;34(12):2067-77.
- Cottarelli, A., Shahriar, S., Arac, A., Glendinning, M., Tuohy, M. C., Prochilo, G., ... & Agalliu, D. (2023). Rab7a activation promotes degradation of select tight junction proteins at the blood-brain barrier after ischemic stroke. *bioRxiv*.
- Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017 Mar 3; 7:42717.
- Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. 2012 Nov;72(5):648-72.

- Dilek, M. E., Gurel, A., Dogantekin, A., Sahin, K., Ozercan, I. H., Ilhan, N., & Celiker, H. (2020). Effects of Sesamol on Experimental Cisplatin Nephrotoxicity Model. *Kafkas Journal of Medical Sciences, Kafkas Tip Bilimleri Dergisi*, 10(3).
- Dobric A, De Luca SN, Seow HJ, Wang H, Brassington K, Chan SMH, Mou K, Erlich J, Liong S, Selemidis S, Spencer SJ, Bozinovski S, Vlahos R. Cigarette Smoke Exposure Induces Neurocognitive Impairments and Neuropathological Changes in the Hippocampus. *Front Mol Neurosci*. 2022 May 17; 15:893083.
- Dong H, Zhang X, Qian Y. Mast cells and neuroinflammation. *Med Sci Monit Basic Res*. 2014 Dec 21; 20:200-6.
- Dong Y, Zhang X, Yao C, Xu R, Tian X. Atractylodin attenuates the expression of MUC5AC and extracellular matrix in lipopolysaccharide-induced airway inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway. *Environ Toxicol*. 2021 Sep;36(9):1911-1922.
- Dotiwala, A. K., McCausland, C., & Samra, N. S. (2018). Anatomy, head and neck, blood brain barrier.
- Du H, Wang S. Omarigliptin Mitigates Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation and Dysfunction of the Integrity of the Blood-Brain Barrier. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Dec 16;11(24):4262-4269.
- Dudvarski Stankovic, N., Teodorczyk, M., Ploen, R., Zipp, F., & Schmidt, M. H. (2016). Microglia–blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta neuropathologica*, 131(3), 347-363.
- Elain, G., Jeanneau, K., Rutkowska, A., Mir, A. K., & Dev, K. K. (2014). The selective anti-IL17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) attenuates IL17A-induced levels of IL6 in human astrocytes. *Glia*, 62(5), 725-735.
- Feng, X., Chen, X., Zaeem, M., Zhang, W., Song, L., Chen, L., ... & Ye, K. (2022). Sesamol attenuates neuroinflammation by regulating the AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway after spinal cord injury in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(1), 8010670.
- Fu, J., Li, L., Huo, D., Zhi, S., Yang, R., Yang, B., ... & Wang, X. (2021). Astrocyte-derived TGF β 1 facilitates blood–brain barrier function via non-canonical hedgehog signaling in brain microvascular endothelial cells. *Brain Sciences*, 11(1), 77.
- Gawdi R, Shumway KR, Emmady PD. Physiology, Blood Brain Barrier. 2023 Mar 17. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32491653.

- Geetha, T., Singh, N., Deol, P. K., & Kaur, I. P. (2015). Biopharmaceutical profiling of sesamol: physicochemical characterization, gastrointestinal permeability and pharmacokinetic evaluation. *RSC advances*, 5(6), 4083-4091.
- Göktaş, F., Karataş, M., Tuncer, S. Ç., & Karacaer, N. T. (2023). Doğal Biyoaktif Bileşenlerin iNOS Aktivitesi Üzerine Etkisinin in-Sliko Olarak İncelenmesi. *Aksaray Üniversitesi Tıp Bilimleri Dergisi*, 4(1), 12-17.
- Guo J, Meng X, Zheng YM, Zhao SK, Qiang C, Zhou LB. Cigarette Smoke Mediates Nasal Epithelial Barrier Dysfunction via TNF- α . *Am J Rhinol Allergy*. 2023 Nov;37(6):646-655.
- Habbas, S., Santello, M., Becker, D., Stubbe, H., Zappia, G., Liaudet, N., ... & Volterra, A. (2015). Neuroinflammatory TNF α impairs memory via astrocyte signaling. *Cell*, 163(7), 1730-1741.
- Haqqani, A. S., Delaney, C. E., Tremblay, T. L., Sodja, C., Sandhu, J. K., & Stanimirovic, D. B. (2013). Method for isolation and molecular characterization of extracellular microvesicles released from brain endothelial cells. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10, 1-13.
- Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Jnaneshwari, S., Devaraja, S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2013). Attenuation of adjuvant-induced arthritis by dietary sesamol via modulation of inflammatory mediators, extracellular matrix degrading enzymes and antioxidant status. *European journal of nutrition*, 52, 1787-1799.
- Hoshi, T., Toyama, T., Naganuma, A., & Hwang, G. W. (2019). Methylmercury causes neuronal cell death via M1-microglial activation in organotypic slices prepared from mouse cerebral cortex. *Fundamental Toxicological Sciences*, 6(5), 167-170.
- Javed, H., Meeran, M. F. N., Jha, N. K., Ashraf, G. M., & Ojha, S. (2024). Sesamol: A Phenolic Compound of Health Benefits and Therapeutic Promise in Neurodegenerative Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 24(9), 797-809.
- Jamieson, J. J., Searson, P. C., & Gerecht, S. (2017). Engineering the human blood-brain barrier in vitro. *Journal of biological engineering*, 11, 1-11.
- Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS*. 2020 Nov 18;17(1):69.

- Kaisar MA, Prasad S, Cucullo L. Protecting the BBB endothelium against cigarette smoke-induced oxidative stress using popular antioxidants: Are they really beneficial? *Brain Res.* 2015 Nov 19; 1627:90-100.
- Kempuraj, D., Aenlle, K. K., Cohen, J., Mathew, A., Isler, D., PANGENI, R. P., ... & Klimas, N. G. (2024). COVID-19 and long COVID: disruption of the neurovascular unit, blood-brain barrier, and tight junctions. *The Neuroscientist*, 30(4), 421-439.
- Khorrami, S., Daneshmandi, S., & Mosayeb, G. (2018). Sesame seeds essential oil and Sesamol modulate the pro-inflammatory function of macrophages and dendritic cells and promote Th2 response. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 32, 98.
- Kim JH, Cho MH, Choi KC, Lee K, Kim KS, Shim SM. Oxidative Stress Induced by Cigarette Smoke Extracts in Human Brain Cells (T98G) and Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMEC) in Mono- and Co-Culture. *J Toxicol Environ Health A.* 2015;78(15):1019-27.
- Krishnan, J., Farhat, S. K., & Anbalagan, R. (2022). Hypoxia and Cigarette Smoke-A Combined Threat to the Brain: Role of Toll-like Receptor 4 in Neuroinflammatory Changes. *Journal of Communicable Diseases*, 54(3), 67-74.
- Kuruca, S. E., Karadenizli, S., Akgun-Dar, K., Kapucu, A., Kaptan, Z., & Uzum, G. (2017). The effects of 17 β -estradiol on blood brain barrier integrity in the absence of the estrogen receptor alpha; an in-vitro model. *Acta histochemica*, 119(6), 638-647.
- Landau Albrecht C, Sperling LE, Iglesias Braghirolli D, Pranke P. Characterization, Cytotoxicity and Anti-Inflammatory Effect Evaluation of Nanocapsules Containing Nicotine. *Bioengineering (Basel).* 2021 Nov 3;8(11):172.
- Li T, Fanning KV, Nyunoya T, Chen Y, Zou C. Cigarette smoke extract induces airway epithelial cell death via repressing PRMT6/AKT signaling. *Aging (Albany NY).* 2020 Dec 1;12(23):24301-24317.
- Lim HJ, Park JH, Jo C, Yoon K, Koh YH. Cigarette smoke extracts and cadmium induce COX-2 expression through γ -secretase-mediated p38 MAPK activation in C6 astroglia cells. *PLoS One.* 2019 Feb 22;14(2): e0212749.
- Liou, C. J., Chen, Y. L., Yu, M. C., Yeh, K. W., Shen, S. C., & Huang, W. C. (2020). Sesamol alleviates airway hyperresponsiveness and oxidative stress in asthmatic mice. *Antioxidants*, 9(4), 295.

- Liu, Z., Ren, B., Wang, Y., Zou, C., Qiao, Q., Diao, Z., ... & Liu, X. (2017). Sesamol induces human hepatocellular carcinoma cells apoptosis by impairing mitochondrial function and suppressing autophagy. *Scientific Reports*, 7(1), 45728.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Lu, H., Ashiqueali, R., Lin, C. I., Walchale, A., Clendaniel, V., Matheson, R., ... & Shehadah, A. (2023). Histone deacetylase 3 inhibition decreases cerebral edema and protects the blood–brain barrier after stroke. *Molecular Neurobiology*, 60(1), 235-246.
- Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS*. 2012 Nov 9;9(1):23.
- Matsushima, K., Yang, D., & Oppenheim, J. J. (2022). Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine*, 153, 155828.
- Mazzone P, Tierney W, Hossain M, Puvenna V, Janigro D, Cucullo L. Pathophysiological impact of cigarette smoke exposure on the cerebrovascular system with a focus on the blood-brain barrier: expanding the awareness of smoking toxicity in an underappreciated area. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Dec;7(12):4111-26.
- Megra, B. W., Eugenin, E. A., & Berman, J. W. (2018). Inflammatory mediators reduce surface PrPc on human BMVEC resulting in decreased barrier integrity. *Laboratory Investigation*, 98(10), 1347-1359.
- McNeil E, Capaldo CT, Macara IG. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2006 Apr;17(4):1922-32.
- Münzel T, Hahad O, Kuntic M, Keaney JF, Deanfield JE, Daiber A. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes. *Eur Heart J*. 2020 Nov 1;41(41):4057-4070.
- Naik P, Fofaria N, Prasad S, Sajja RK, Weksler B, Couraud PO, Romero IA, Cucullo L. Oxidative and pro-inflammatory impact of regular and denicotinized cigarettes on blood brain barrier endothelial cells: is smoking reduced or nicotine-free products really safe? *BMC Neurosci*. 2014 Apr 23; 15:51.

- Naik P, Sajja RK, Prasad S, Cucullo L. Effect of full flavor and denicotinized cigarettes exposure on the brain microvascular endothelium: a microarray-based gene expression study using a human immortalized BBB endothelial cell line. *BMC Neurosci.* 2015 Jun 23; 16:38.
- Natarajan R, Northrop N, Yamamoto B. Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran Extravasation as a Measure of Blood-Brain Barrier Permeability. *Curr Protoc Neurosci.* 2017 Apr 10; 79:9.58.1-9.58.15.
- Nikolic L, Shen W, Nobili P, Virenque A, Ulmann L, Audinat E. Blocking TNF α -driven astrocyte purinergic signaling restores normal synaptic activity during epileptogenesis. *Glia.* 2018 Dec;66(12):2673-2683.
- Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci.* 2010;112(2):251-4.
- Nyawira Maranga D, Kagira JM, Kinyanjui CK, Muturi Karanja S, Wangari Maina N, Ngotho M. IL-6 is upregulated in late-stage disease in monkeys experimentally infected with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013:320509.
- Pelgrim, C. E., Wang, L., Peralta Marzal, L. N., Korver, S., van Ark, I., Leusink-Muis, T., ... & Kraneveld, A. D. (2022). Increased exploration and hyperlocomotion in a cigarette smoke and LPS-induced murine model of COPD: Linking pulmonary and systemic inflammation with the brain. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 323(3), L251-L265.
- Pedersen, B. K. (2013). Muscle as a secretory organ. *Compr. Physiol.* 3, 1337–1362.
- Prasad S, Sajja RK, Park JH, Naik P, Kaiser MA, Cucullo L. Impact of cigarette smoke extract and hyperglycemic conditions on blood-brain barrier endothelial cells. *Fluids Barriers CNS.* 2015 Jul 24; 12:18.
- Ren, B., Yuan, T., Zhang, X., Wang, L., Pan, J., Liu, Y., ... & Liu, X. (2020). Protective effects of sesamol on systemic inflammation and cognitive impairment in aging mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(10), 3099-3111.
- Rennard, S. I. (2004). Cigarette smoke in research. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(5), 479-480.

- Rochfort, K. D., Collins, L. E., McLoughlin, A., & Cummins, P. M. (2016). Tumour necrosis factor- α -mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *Journal of neurochemistry*, 136(3), 564-572.
- Saili KS, Zurlinden TJ, Schwab AJ, Silvin A, Baker NC, Hunter ES 3rd, Ginhoux F, Knudsen TB. Blood-brain barrier development: Systems modeling and predictive toxicology. *Birth Defects Res.* 2017 Dec 1;109(20):1680-1710.
- Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 2008 Nov;32(2):200-19.
- Schrade, A., Sade, H., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B. B., & Niewoehner, J. (2012). Expression and localization of claudins-3 and-12 in transformed human brain endothelium. *Fluids and Barriers of the CNS*, 9, 1-5.
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., & Friedman, A. (2015, February). Anatomy and physiology of the blood–brain barrier. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 38, pp. 2-6). Academic Press.
- Shindo, A., Maki, T., Mandeville, E. T., Liang, A. C., Egawa, N., Itoh, K., ... & Arai, K. (2016). Astrocyte-derived pentraxin 3 supports blood–brain barrier integrity under acute phase of stroke. *Stroke*, 47(4), 1094-1100.
- Singh, N., Vishwas, S., Kaur, A., Kaur, H., Kakoty, V., Khursheed, R., ... & Abdel-Daim, M. M. (2023). Harnessing role of Sesamol and its nanoformulations against neurodegenerative diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, 115512.
- Soltani Khaboushan, A., Yazdanpanah, N., & Rezaei, N. (2022). Neuroinflammation and proinflammatory cytokines in epileptogenesis. *Molecular neurobiology*, 59(3), 1724-1743.
- Sreekanthreddy, P., Gromnicova, R., Davies, H., Phillips, J., Romero, I. A., & Male, D. (2015). A three-dimensional model of the human blood-brain barrier to analyse the transport of nanoparticles and astrocyte/endothelial interactions. *F1000Research*, 4.
- Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M., & Pedersen, B. K. (2003). Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *The FASEB Journal*, 17(8), 1-10.
- Suo Q, Deng L, Chen T, Wu S, Qi L, Liu Z, He T, Tian HL, Li W, Tang Y, Yang GY, Zhang Z. Optogenetic Activation of Astrocytes Reduces Blood-Brain Barrier Disruption via IL-10 In Stroke. *Aging Dis.* 2023 Oct 1;14(5):1870-1886.

- Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2022; 2508:115-134.
- Tagawa, Y., Hiramatsu, N., Kasai, A., Hayakawa, K., Okamura, M., Yao, J., & Kitamura, M. (2008). Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP). *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1), 50-59.
- VanGilder RL, Huber JD. Sesamol: a Treatment for Diabetes-Associated Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Postdoc J.* 2014 Jul;2(7):13-22.
- Verma, S. D., Passerat de la Chapelle, E., Malkani, S., Juran, C. M., Boyko, V., Costes, S. V., & Cekanaviciute, E. (2022). Astrocytes regulate vascular endothelial responses to simulated deep space radiation in a human organ-on-a-chip model. *Frontiers in Immunology*, 13, 864923.
- Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front Mol Neurosci.* 2018 May 22; 11:166.
- Villar-Fincheira, P., Sanhueza-Olivares, F., Norambuena-Soto, I., Cancino-Arenas, N., Hernandez-Vargas, F., Troncoso, R., ... & Chiong, M. (2021). Role of interleukin-6 in vascular health and disease. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 641734.)
- Wang K, Yang J, Zhang S, Wei D, Hao X, Tu S, Qiu J. The neural mechanisms underlying the acute effect of cigarette smoking on chronic smokers. *PLoS One.* 2014 Jul 22;9(7): e102828.
- Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One.* 2014 Oct 14;9(10):e110024.
- Wang Y, Zhang Y, Wang X, Li Q, Zhao Y, Jiang Y, Guo R, Liu X, Yuan T, Liu Z. Sesamol Mitigates Chronic Iron Overload-Induced Cognitive Impairment and Systemic Inflammation via IL-6 and DMT1 Regulation. *Mol Nutr Food Res.* 2023 Sep;67(17):e2300012.
- Wang YI, Abaci HE, Shuler ML. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnol Bioeng.* 2017 Jan;114(1):184-194.

- Wang, J. S., Tsai, P. H., Tseng, K. F., Chen, F. Y., Yang, W. C., & Shen, M. Y. (2021). Sesamol ameliorates renal injury-mediated atherosclerosis via inhibition of oxidative stress/IKK α /p53. *Antioxidants*, *10*(10), 1519.
- Wu, M. S., Aquino, L. B. B., Barbaza, M. Y. U., Hsieh, C. L., De Castro-Cruz, K. A., Yang, L. L., & Tsai, P. W. (2019). Anti-inflammatory and anticancer properties of bioactive compounds from *Sesamum indicum* L.—A review. *Molecules*, *24*(24), 4426.
- Xia, B., Liu, X., Li, X., Wang, Y., Wang, D., Kou, R., ... & Liu, X. (2022). Sesamol ameliorates dextran sulfate sodium-induced depression-like and anxiety-like behaviors in colitis mice: the potential involvement of the gut–brain axis. *Food & Function*, *13*(5), 2865-2883.
- Yang F, Zhao K, Zhang X, Zhang J, Xu B. ATP Induces Disruption of Tight Junction Proteins via IL-1 Beta-Dependent MMP-9 Activation of Human Blood-Brain Barrier *In Vitro*. *Neural Plast*. 2016; 2016:8928530.
- Zapata-Acevedo JF, Mantilla-Galindo A, Vargas-Sánchez K, González-Reyes RE. Blood-brain barrier biomarkers. *Adv Clin Chem*. 2024; 121:1-88. doi: 10.1016/bs.acc.2024.04.004. Epub 2024 Apr 22. PMID: 38797540.
- Zhang, J., Sadowska, G. B., Chen, X., Park, S. Y., Kim, J. E., Bodge, C. A., ... & Stonestreet, B. S. (2015). Anti-IL-6 neutralizing antibody modulates blood-brain barrier function in the ovine fetus. *The FASEB Journal*, *29*(5), 1739.