

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

SEPSİS MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
KURKUMİN VE KUERSETİN POLİFENOL
KOMBİNASYONUNUN NÖROİNFLAMASYON VE KAN-BEYİN
BARIYERİ ÜZERİNE ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. BURAK GÜNDOĞDU

İZMİR 2025

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

SEPSİS MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
KURKUMİN VE KUERSETİN POLİFENOL
KOMBİNASYONUNUN NÖROİNFLAMASYON VE KAN-BEYİN
BARIYERİ ÜZERİNE ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. BURAK GÜNDOĞDU

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. Ayşe Semra Koçtürk

(Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi BAP komisyonu tarafından desteklenmiştir.)

İçindekiler

TEŞEKKÜR.....	i
TABLOLAR LİSTESİ.....	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Sepsis Tanımı ve Tarihçesi	2
2.2 Sepsis İlişkili Ensefalopati	5
2.2.1 Sepsis İlişkili Ensefalopatinin Patofizyolojisi.....	5
2.3 Sepsis İlişkili Ensefalopatide Kan-Beyin Bariyerinin Bozulması	13
2.4 Sepsis İlişkili Ensefalopatinin Tedavisi	15
2.5 Polifenoller ve Flavonoidler.....	15
2.6 Kurkuminin Terapötik Etkileri ve Sepsis Üzerindeki Etki Mekanizmaları	17
2.7 Kuersetinin Terapötik Etkileri ve Sepsis Üzerindeki Etki Mekanizmaları.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1 Deney Hayvanları.....	23
3.2 Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi	23
3.3 Deney Grupları ve Deney Modelinin Oluşturulması	23
3.4 Deneyin Yapılışı.....	24
3.4.1 Sepsis modelinin oluşturulması	24
3.4.2 KBB bütünlüğünün bozulduğunun doğrulanması.....	26
3.4.3 Deney Hayvanlarına Uygulanacak Polifenol Çözeltilerinin Hazırlanması	27
3.4.4 Deney Hayvanlarının Tartılması, Gruplandırılması ve İşaretlenmesi.....	28
3.4.5 Deney Modelinin Oluşturulması ve Dokuların Toplanması	28
3.5 Biyokimyasal Ölçümler	29
3.5.1 Doku Homojenatının Hazırlanması.....	29
3.5.2 ELİSA Yöntemiyle Biyokimyasal Ölçümlerin Yapılması.....	30
3.5.2.1 ZO-1 ELİSA Test Prosedürü.....	30

3.5.2.2 Claudin-5 ELİSA Test Prosedürü	31
3.5.2.3 TNF- α ELİSA Test Prosedürü	31
3.5.2.4 IL-1 β ELİSA Test Prosedürü	32
3.5.2.5 NF- κ B ELİSA Test Prosedürü	33
3.5.2.6 NLRP-3 ELİSA Test Prosedürü.....	33
3.5.2.7 BCA Protein Ölçümü Test Prosedürü	34
3.6 İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1 Ön Deneyler	35
4.1.1.Gözlemsel bulgular	35
4.1.2. Biyokimyasal bulgular	38
4.2 Deney modelinde polifenollerin etkinliğinin değerlendirilmesi	39
4.2.1 Gözlemsel bulgular	39
4.2.2 Biyokimyasal Bulgular.....	46
4.2.2.1 ZO-1 Sonuçları.....	46
4.2.2.2 Claudin-5 Sonuçları	47
4.2.2.3 TNF- α Sonuçları	48
4.2.2.4 IL-1 β Sonuçları	49
4.2.2.5 NF- κ B Sonuçları	50
4.2.2.6 NLRP-3 Sonuçları.....	51
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
7.KAYNAKLAR	59
8.EKLER.....	71

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması ve çalışmalarımdaki katkılarından dolayı tez hocam Prof. Dr. A. Semra Koçtürk'e, hayvan deneylerindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Osman Yılmaz, Prof. Dr. Ali Necati Gökmen ve Prof. Dr. Elvan Ömen'e teşekkür ediyorum. Tezimin istatistiksel analiz kısmındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Pembe Keskinoglu'na teşekkür ediyorum.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Sezer Uysal'a, eğitimin süresince emeği geçen tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve tez jürisi hocalarıma teşekkür ediyorum.

Ayrıca tezimin ve eğitiminin her aşamasında bana desteğini hiçbir şekilde esirgemeyen sevgili eşime sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Burak Gündoğdu

İzmir, 2025

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. SIRS Kriterleri

Tablo 2. Sofa Skorlaması

Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar

Tablo 4. Ön Deney Grupları

Tablo 5. Deney grupları

Tablo 6. Kitlerin Marka ve Yöntemleri

Tablo 7. LPS Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

Tablo 8. Kurkumin Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

Tablo 9. Kuersetin Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

Tablo 10. Kombinasyon Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

Tablo 11. ZO-1'in deney grupları arası karşılaştırılması

Tablo 12. Claudin-5'in deney grupları arası karşılaştırılması

Tablo 13. TNF- α 'nın deney grupları arası karşılaştırılması

Tablo 14: IL-1 β 'nin deney grupları arası karşılaştırılması

Tablo 15: NF- κ B'nin deney grupları arası karşılaştırılması

Tablo 16: NLRP3'ün deney grupları arası karşılaştırılması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kurkuminin Sepsisteki Etki Mekanizmaları

Şekil 2. Kuersetinin Sepsisteki Etki Mekanizmaları

Şekil 3. Rat Grimace Skorlama

Şekil 4. Perfüzyon Aşaması (Sol ventrikülden SF verilmesi)

Şekil 5. LPS verilmeden hemen öncesi orbital daralma yok (Ön deney)

Şekil 6. LPS verildikten 6 saat sonra belirgin orbital daralma mevcut (Ön deney)

Şekil 7. Evans blue boyası sonrası uç uzuvların mavi renk alması

Şekil 8. Evans blue sonrası iç organların görünümü

Şekil 9. Peyer Plakları

Şekil 10. Evans Blue Düzeyleri (Hipokampus+Prefrontal Korteks)

Şekil 11. LPS grubu

Şekil 12. Kurkumin grubu

Şekil 13. Kuersetin grubu

Şekil 14. Kombinasyon grubu

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BCA: Bicinchoninic Acid (Bikinkoninik Asit)

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor (Beyinden-Türeyen Nörotrofik Faktör)

CCL: C-C Motif Chemokine Ligand

CD: Cluster Of Differentiation (Yüzey Farklılaşma Antijenleri)

COX: Cyclooxygenase (Siklooksijenaz)

CREB: Camp Response Element-Binding Protein

CRP: C Reaktif Protein

CXCL: C-X-C Motif Chemokine Ligand

ÇLP: Çekal Ligasyon Ve Perforasyon

DAMP: Damage Associated Molecular Pattern (Hasar İlişkili Moleküler Patern)

DD: Death Domain (Ölüm Domaini)

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiriboz Nükleik Asit

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (İmmünoenzimatik Yöntem)

ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase (*Ekstraselüler Sinyal-Ayarlanmış Kinaz*)

FADD: Fas-Associated Death Domain Protein (Fas-İlişkili Ölüm Alanı Proteini)

Foxg1: Forkhead Box Transcription Factor G1

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör)

GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor (Guanin Nükleotid Değişim Faktörü)

HRP: Horseradish Peroksidaz

IFN- Γ : İnterferon Gamma

IKK: Inhibitory Kappa Kinase (İnhibitör Kappa Kinaz)

IL: İnterlökin

Ikb: I-Kappa B

İnos: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

JNK: C-Jun N-Terminal Kinaz

KBB: Kan Beyin Bariyeri

LPS: Lipopolisakkarit

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitojen-Aktive Protein Kinaz)

MEK: *MAPK* Extracellular Signal-Regulated Kinase(*MAPK* Ekstraselüler Sinyal-Ayarlanmış Kinaz)

MMP: Matriks Metalloproteinaz

MPO: Miyeloperoksidaz

Myd88: Myeloid Diferansiyasyon Faktörü 88

NEMO: NF-Kb Esansiyel Modülatörü

NF-Kb: Nükleer Faktör Kappa B

NK: Natural Killer

NLR: (NOD-Like Receptor) NOD Benzeri Reseptörler

NLRP3: NOD-Like Receptor Protein (Nod Benzeri Reseptör Proteini 3)

NLS: Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

NRF: NF-E2-Related Factor (NF-E2-İltili Faktör)

Paco2: Parsiyel Karbondioksit Basıncı

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern (Patojen İlişkili Moleküler Patern)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)

Ppar γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama)

PRR: Pattern Recognition Receptor (Patern Tanıyan Reseptör)

Rho: Ras Homolog

SAA: Serum Amiloid A

SIRS: Systemic İnflammatory Response Syndrome (Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu)

SİE: Sepsis İlişkili Ensefalopati

SODD: Silencer Of Death Domain (Ölüm Alanı Susturucu Protein)

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment (Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirmesi)

TAD: Transaktivasyon Domaini

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)

TLR: Toll Like Receptor (Toll Benzeri Reseptör)

TNFR: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü

TNF-A: Tümör Nekroz Faktörü Alfa

TRADD: TNFR1 Associated Death Domain Protein (TNFR İlişkili Ölüm Alanı Proteini)

ZO: Zonula Okludens



ÖZET

Amaç: Sepsiste kurkumin, kuersetin ve kombinasyonunun inflamatuvar yolaklar, inflamazom aktivasyonu ve hücreler arası sıkı bağlantı protein düzeyleri üzerindeki koruyucu ya da tedavi edici etkilerinin deney hayvan modelinde beyin dokusunda incelenmesi.

Gereç ve Yöntem: Araştırmanın ön deney kısmında 6 Wistar Albino erkek deney hayvanı ile (n=3, 2 grup) sepsis modeli oluşturuldu ve doğrulandı. Polifenollerin etkinliğinin değerlendirilmesi için 5 grup (n=6) toplamda 30 deney hayvanı kullanıldı. LPS grubundaki deney hayvanlarına 5 mg/kg LPS (i.p) verilerek sepsis modeli oluşturuldu. Taşıyıcı kontrol grubundaki deney hayvanlarına DMSO (i.p) uygulandı. Polifenol gruplarındaki hayvanlara ise sırasıyla 50 mg/kg kurkumin, 100 mg/kg kuersetin ve 25 mg/kg kurkumin+50 mg/kg kuersetin (kombinasyon grubu) verildi. LPS uygulanmasından 6 saat sonra deney hayvanları sakrifiye edilerek hipokampus ve prefrontal korteksleri ayrıldı ve -80 °C saklandı. Dokular homojenat haline getirildikten sonra TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, NLRP-3, ZO-1 ve claudin-5 ölçümleri ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi.

Bulgular: LPS grubundaki ZO-1 ve Claudin-5 düzeyi, taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı. Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan grupların ZO-1 ve claudin-5 düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı. Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon grupları arasında ise ZO-1 ve Claudin-5 düzeyleri yönünden anlamlı bir fark saptanmadı. LPS grubundaki TNF- α , IL-1 β , NF- κ B ve NLRP-3 düzeyi taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan grupların TNF- α , IL-1 β , NF- κ B ve NLRP-3 düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı. Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon gruplarının TNF- α , IL-1 β , NF- κ B ve NLRP-3 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Sonuç: Bu çalışmada, sepsiste kurkumin, kuersetin ve kurkumin-kuersetin kombinasyon uygulanmalarının beyinde oluşan inflamasyonu baskıladığı ve sıkı bağlantı proteinlerini koruduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte polifenollerin etkinlikleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: beyin, inflamasyon, kuersetin, kurkumin, sepsis

ABSTRACT

Objective: To investigate the protective or therapeutic effects of curcumin, quercetin, and their combination in a sepsis animal model by inflammatory pathways, inflammasome activation, and tight junction protein levels in brain tissue.

Materials and Methods: In the preliminary study, a sepsis model was established and validated in 6 male Wistar Albino rats (n=3, 2 groups). To evaluate the efficacy of polyphenols, a total of 30 experimental animals were divided into 5 groups (n=6). Sepsis was induced by administering 5 mg/kg LPS (i.p.) for the LPS group. In the vehicle control group, the rats were treated with DMSO (i.p.). The polyphenol groups were administered 50 mg/kg curcumin, 100 mg/kg quercetin, and 25 mg/kg curcumin + 50 mg/kg quercetin (combination group), respectively. Six hours after LPS administration, the rats were sacrificed, and their hippocampus and prefrontal cortex were isolated and stored at -80 °C. After tissue homogenization, measurements of TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, NLRP-3, ZO-1, and claudin-5 were performed using the ELISA method.

Results: ZO-1 and Claudin-5 levels were found significantly lower in the LPS group compared to the vehicle control group. The levels of ZO-1 and Claudin-5 in the curcumin, quercetin, and combination treatment groups were significantly higher than in the LPS group. No significant differences were observed between the curcumin, quercetin, and combination groups in terms of ZO-1 and Claudin-5 levels. TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, and NLRP-3 levels in the LPS group were significantly higher compared to the vehicle control group. In contrast, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, and NLRP-3 levels in the curcumin, quercetin, and combination treatment groups were significantly lower than those in the LPS group. No significant differences were observed between the curcumin, quercetin, and combination groups in terms of TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, and NLRP-3 levels.

Conclusion: This study demonstrates that curcumin, quercetin, and the curcumin-quercetin combination suppress brain inflammation and preserve tight junction proteins in sepsis. However, no significant difference was found in the effectiveness between the polyphenol treatments.

Key Words: brain, curcumin, inflammation, quercetin, sepsis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yoğun bakım ünitelerindeki morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biri olan sepsis, çoklu organ yetmezliği ve ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Tedavisi maliyetli ve yönetimi zor olan sepsis, sağlık sistemi üzerinde hem iş gücü hem de maddi baskı oluşturmaktadır (1).

Sepsis ilişkili ensefalopati (SİE), merkezi sinir sisteminde herhangi bir enfeksiyon odağı olmamasına rağmen merkezi sinir sisteminde gelişen kontrolsüz inflamasyonun beyinde oluşturduğu tahribat sonucunda gerçekleşmektedir (2). Sepsis ve sepsis ilişkili ensefalopatinin gelişmesinde birçok mekanizma görev almaktadır. Bu mekanizmaların başında proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ve buna bağlı olarak hücre, doku ve organ düzeyinde hasarlanmalar oluşmaktadır. Vücuda patojen girişi sonucunda hücrelerin ölüme sürüklenmesine ve organ yetmezliğine neden olan mekanizma; dolaşımda bulunan patojen ilişkili moleküler paternlerin (PAMP) ve hasar ilişkili moleküler paternlerin (DAMP) hücrelerde bulunan ve bu moleküler paternleri tanıyan PRR (patern tanıyan reseptör)'leri tetiklemesi ile hücrelerden TNF-alfa, IL-1 β , IL-6 ve interferon- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına bağlı oluşan sitokin fırtınası olmaktadır (3).

Sepsis tedavisine genel olarak bakıldığında hemodinamik durumun kontrolü, enfeksiyonun kontrolü ve konağın immün yanıtının kontrolü temel tedavi yaklaşımı olarak karşımıza çıkmaktadır. Konağın immün yanıtını spesifik olarak düzenleyebilecek anti-inflamatuvar bir tedavi geliştirilmesi güncel araştırma konusudur (4). Sepsis tedavisi ve önlenmesine yönelik yapılan tüm çalışmalara bakıldığında genelde sitokin fırtınasının tetiklenmesini önleyici yaklaşımlar olduğu görülmektedir. Bu noktada sepsis patofizyolojisinde etkili oksidatif stresi önleyen ve sitokin fırtınasına karşı koruyucu etkiye sahip moleküller arasında öne çıkanların büyük bir bölümü polifenolik ve antioksidan yapıları olan doğal bileşikler olduğu görülmektedir. Bu bileşikler arasında kurkumin ve kuersetin üzerinde yapılan birçok çalışma bu iki polifenolün inflamatuvar yollar üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde her iki polifenolün de antinflamatuvar etki gösterdiği ve bunu inflamatuvar yanıtta etkili bir çok yolağın baskılanması ile gerçekleştirdiği gözlenmektedir (5,6). Vachharajani ve ark. 2010 yılında yaptığı çalışmada

hayvanlarda ÇLP (Çekal Ligasyon ve Perforasyon) ile tetiklenen sepsis modelinde kurkuminin KBB (Kan Beyin Bariyeri) üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (7). Lee ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise kuersetinin KBB’de koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (8).

Yapılan çalışmalar ile bu iki polifenolün sepsisteki anti inflamatuvar etkileri ve KBB üzerindeki koruyucu etkileri gösterilmesine rağmen, bu iki polifenolün kombinasyonunun kullanılması ile sepsis ilişkili ensefalopatindeki etkinliklerini gösteren bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Yapılan bu tez çalışmasında deney hayvanlarında oluşturulacak sepsis modelinde:

Antinflatuar etkisi olduğu öne sürülen kurkumin, kuersetin ve kombinasyonunun inflamatuvar yolak, inflamazom aktivasyonu ve KBB’nin geçirgenliğini düzenleyen sıkı bağlantı proteinlerinin düzeyleri üzerindeki etkileri beyin dokusunda incelenerek değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sepsis Tanımı ve Tarihçesi

Sepsis, organizmanın enfeksiyon ajanlarına karşı verdiği kontrolsüz cevap sonucunda gelişen hayatı tehdit eden organ disfonksiyonu olarak tanımlanmaktadır (9). Sepsis patogenezinde proinflamatuvar ve anti-inflatuar faktörlerin dengesinde bozulmanın etkin olduğu belirtilmektedir ve bu dengenin bozulmasına bağlı olarak multiple organ disfonksiyonu ve organ kaybı gerçekleşmektedir (10). Sepsis insidansı yüksek olan önemli bir halk sağlığı sorunudur ve dünya genelinde yoğun bakım ünitelerindeki morbidite ve mortalitenin en yaygın nedenlerinden birisi olarak kabul edilmektedir (11–13). Sepsisin dünya genelindeki ölümlerin yaklaşık olarak 6 milyondan sorumlu olduğu ve en çok etkilenen ülkelerin ise düşük ve orta gelirli ülkeler olduğu belirtilmektedir (13). Dünya Sağlık Örgütü sepsis farkındalığının özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde yetersiz düzeyde olduğunu ve global düzeyde sepsis yükünü azaltma yolundaki en önemli adımlardan birisinin sağlık çalışanları ve toplumun sepsis farkındalığının artırılması olduğunu belirtmiştir. Bu amaçla Dünya Sağlık Örgütü sepsisi küresel sağlıkta öncelikli olarak kabul etmiştir (1).

Sepsis 1992 yılında enfeksiyona karşı verilen uyumsuz sistemik yanıt olarak tanımlanmıştır ve tanısında sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) kriterleri kullanılmıştır (Tablo 1). Bu kriterler vücut ısısı, solunum sayısı, kalp hızı ve beyaz küre sayısını içermektedir. Bu kriterlerin 2 ya da daha fazlasının bir enfeksiyona eşlik etmesi durumu sepsis olarak tanımlanmıştır. Aynı yıl akut organ disfonksiyonu gelişen sepsis, şiddetli sepsis; hiperlaktateminin ya da sıvı tedavisine rağmen düzelmeyen hipotansiyonun eşlik ettiği durum ise septik şok olarak tanımlanmıştır (14).

Tablo 1: SIRS Kriterleri^a

SIRS Kriterleri	2 ya da daha fazlası
Vücut sıcaklığı	>38°C ya da <36°C
Kalp Hızı	>90/dk
Solunum Hızı	>20/dk ya da Paco ₂ <32 mm Hg (4.3 kPa)
Beyaz Hücre Sayısı	>12 000/mm ³ ya da <4000/mm ³ ya da >10% band nötrofil

^a: Bone ve ark.modifiye edilmiştir (14)

Günümüzde ise sepsis spesifik bir hastalıktan öte enfeksiyonu olduğundan şüphelenilen bir hastada olan klinik bulgular ve semptomlar bütünü olarak değerlendirilmektedir. Altın standart bir tanı testi olmaması nedeniyle, sepsis tanısında klinik bulgular önemli bir yer tutmaktadır. Avrupa Yoğun Bakım Derneği (ESICM) ve Kritik Bakım Derneği (SCCM) tarafından 2016 yılında yayınlanan sepsis-3 isimli makalede, SIRS kriterlerinin sepsis tanısı için düşük seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğu belirtilmiştir. Organ disfonksiyonu ya da yetersizliğinin tanısı için objektif kriterlerin değerlendirilmesini temel alan bir skorlama sistemi olan SOFA skorlaması (Sequential Organ Failure Assessment, Ardışık Organ Yetmezliği Değerlendirmesi) günümüzde en yaygın kullanılan skorlama sistemidir (Tablo 2). Yüksek SOFA skoru yüksek mortalite oranlarına işaret etmektedir. Bir enfeksiyonu takiben, SOFA skorunda toplamda iki puan ya da üzerinde bir artış gerçekleşmesi organ disfonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Önceden bilinen bir organ disfonksiyonu olmayan hastalar sıfır puan olarak kabul edilmektedir(9).

Tablo 2: SOFA Skorlaması^a

Sistem	Skorlama				
	0	1	2	3	4
Solunum PaO ₂ /FIO ₂ , mmHg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) solunum desteği ile	<100 (13.3) solunum desteği ile
Koagülasyon Platelet, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Karaciğer Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2–1.9 (20–32)	2.0–5.9 (33–101)	6.0–11.9 (102–204)	>12.0 (204)
Kardiyovasküler	OAB ^b ≥ 70 mmHg	OAB<70 mmHg	Dopamin <5 ya da dobutamin (herhangi bir doz) ^c	Dopamin 5.1–15 ya da epinefrin ≤ 0.1 ya da norepinefrin≤ 0.1 ^c	Dopamin> 15 ya da epinefrin> 0.1 ya da norepinefrin> 0.1 ^c
Merkezi Sinir Sistemi Glasgow Koma Skoru	15	13–14	10–12	6–9	<6
Böbrek					
Kreatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2–1.9 (110– 170)	2.0–3.4 (171–299)	3.5–4.9 (300–440)	>5.0 (440)
İdrar Çıkışı, mL/d				<500	<200

^a: Vincent ve ark. modifiye edilmiştir (15)

^b: Ortalama Arteriyel Basınç

^c: Katekolamin dozları en az bir saat için μg/kg/dk cinsinden verilmiştir

2.2 Sepsis İlişkili Ensefalopati

Merkezi sinir sistemi sepsiste tetiklenen inflamatuvar ve oksidatif hasarlara karşı oldukça hassastır ve buna bağlı olarak gelişen SİE deliryum, koma ve bilişsel disfonksiyon gibi durumlarla kendini gösterebilmektedir. Sepsisli hastaların yüzde 53'ünde SİE geliştiği gösterilmiştir (16–19). Fritz ve ark. 2020 yılında yaptığı bir çalışma sepsis geçiren hastaların demans riskinin, normal popülasyona göre 2.22 kat yüksek olduğunu ortaya koymuştur (20). Sepsis ilişkili ensefalopatinin doğrudan merkezi sinir sistemini etkileyen bir enfeksiyon kaynaklı olmadığı, enfeksiyona verilen sistemik inflamatuvar cevabın beyni etkilemesi sonucunda geliştiği düşünülmektedir. Sepsis ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisinde birçok faktör etkili bulunmuştur. Endotelial hücre hasarı ve sıkı bağlantı proteinlerinin kaybı, kan beyin bariyeri geçirgenliğinde artış ve sonuçta da TNF-alfa, IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerde artış bunlar arasında sayılabilmektedir (21–23).

Sepsis ilişkili ensefalopati eğer yalnızca sepsis esnasında mevcutsa ve sepsisin kontrolünden sonra iyileşme gerçekleşiyorsa bu durumda akut olarak değerlendirilmektedir. Semptomlar haftalar, aylar sürüyorsa subakut ve bir yıl sürüyorsa kronik olarak değerlendirilmektedir. Subakut ve kronik SİE'de yakın takibin gerekli olduğu ve SİE'den etkilenen hastalarda rehabilitasyon ve evde bakım hizmetlerinin gerekli olabileceği belirtilmektedir. Sepsiste hastaların nörolojik disfonksiyonları hafif mental konfüzyondan komaya kadar gidebilmektedir. Bazı hastalarda kaslarda katılık, titreme ve nöbetler olabilmektedir. Sepsis ilişkili ensefalopati reversible bir hastalık olarak düşünülmesine rağmen hafıza kaybı, depresyon, anksiyete ve kognitif bozukluklar hastaların %20-40 kadarında taburculuk sonrasında da 1 yıldan uzun bir süre devam edebilmektedir(10).

2.2.1 Sepsis İlişkili Ensefalopatinin Patofizyolojisi

Sepsis ilişkili ensefalopati, merkezi sinir sisteminde primer bir enfeksiyon olmaksızın vücudun sistemik bir enfeksiyona karşı verdiği kontrolsüz cevap sonucunda gerçekleşmektedir. Sepsis beynin farklı bölgelerini farklı düzeylerde etkileyebilmektedir. İnflamasyon, iskemi ve hipoksiden ciddi anlamda etkilenmesi nedeniyle hipokampus sepsise karşı beynin en hassas bölgesidir. Hipokampus

öğrenme ve hafıza ile ilgili süreçlerde önemli görevler üstlenen, beyin medial temporal lobunda bulunan bir yapıdır. Hipokampus özellikle kısa süreli hafıza ve uzaysal yön bulmada önemli bir rol üstlenmektedir. Bu nedenle bilişsel bozukluk, SİE ile ilişkili önemli bir semptom olarak karşımıza çıkmaktadır. Beynin etkilenen diğer bölümleri arasında korteks, serebellum ve beyin sapı öne çıkmaktadır. Beyin sapı etkilenen hastalarda ise kardiyovasküler ve immün sistem problemleri gözlenebilmektedir (24) Sepsis ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisinde birçok faktör suçlanmaktadır. Bunlar arasında KBB'de bozulma, beyin kan akımında bozulma, glial hücre aktivasyonu, lökosit göçü ve nörotransmitter düzeylerindeki bozulma sayılabilmektedir (25).

Kan-beyin bariyeri sepsiste etkilenen önemli yapılardan bir tanesidir. Sepsis esnasında IL-1 β ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin düzeylerinde bir artış yaşanmakta ve buna bağlı olarak sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda azalma, KBB'de bir bozulma meydana gelmektedir. Sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda azalma ve KBB'deki bozulma sepsisin şiddetiyle korele olarak hareket etmektedir (26).

Beynin oksijen ve enerji ihtiyacını karşılayan beyin kan akımı birçok faktör tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Bunlar arasında serebral perfüzyon basıncı ve kalp debisi önemli bir tutmaktadır. Sepsis esnasında gerçekleşen hipotansif epizodlarda beyin kan akımında en çok serebral korteksin etkilendiği bir bozulma meydana gelmektedir. Bu bozulmanın sonucunda beyin oksijenlenmesinde bir azalma meydana gelmekte, sonuç olarak nöronal anoksi ve apoptozis gerçekleşmektedir (27–29). Beynin perfüzyonundaki azalma sonucunda ayrıca PaCO₂ düzeylerinde bir artış yaşanmakta ve ekstraselüler alandaki pH düzeyinde bir düşüş meydana gelmektedir. Asit algılayan iyon kanalı-1 A ekstraselüler alanda gelişen asidoz sonucunda aktive olmaktadır. Bu aktivasyon sonucunda da NO (Nitrik Oksit) sentezi artmakta ve vazodilatasyon gelişmektedir. Sonuç olarak beyne gelen kan akımında bir artış yaşanmaktadır. Beyin kan akımındaki artışla beraber vasküler yatakta hidrostatik basınç artışı olmaktadır. Bu durum beyin ödemi ve beyin hasarı ile sonuçlanmaktadır (30).

Sepsis ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisi hücresele düzeyde incelendiğinde mikrogliyal aktivasyon önemli faktörlerden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Merkezi sinir sistemine herhangi bir patojen maruziyeti olduğunda ilk cevap veren hücrelerin mikrogliyal hücreler olduğu ve nörodejenerasyon, inflamasyon ile de ilişkili oldukları belirtilmiştir (31). Mikrogliyal hücreler merkezi sinir sisteminde bulunan ve intraserebral inflamatuvar cevaptan sorumlu hücrelerdir. Bu hücreler serebral homeostaz için temel hücrelerdir ve kan beyin bariyerinin bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunarak beyin dokusunun enfeksiyon ajanlarına karşı savunmasına katkı sağlamaktadırlar. Bunun dışında bu hücreler intraserebral iletişimden sorumlu olan sinapsların modülasyon ve sürekliliğinin sağlanmasında önemli roller üstlenmektedirler. Bu yüzden bu hücrelerin aktivitelerindeki değişiklik sinaptik disfonksiyona ve beynin hafıza, bilinç dikkat gibi fonksiyonlarında soruna yol açmaktadır (32). Sepsis gibi patolojik durumlarda aktive olan mikrogliyal hücreler hızlı ve çarpıcı morfolojik, fenotipik, biyoenerjetik ve fonksiyonel bir değişim geçirmektedirler ve bu değişim mikrogliyal aktivasyon olarak tanımlanmaktadır. Beynin iskemik ya da travmatik yaralanmalarında inflamatuvar yanıtı oluşturan hücreler makrofajlar ve beyne infiltre olan lökositler olmasına rağmen, SİE'nin inflamatuvar yanıtı temel olarak mikrogliyal hücreler tarafından gerçekleşmektedir. Mikrogliyal aktivasyonda, mikrogliyal hücrelerin homeostatik durumlarından farklılaşarak sekretuar özellik kazandıkları ve fagositik aktivitelerini artırarak geçici bir cevap oluşturdukları gözlenmiştir. Mikrogliyal aktivasyonun, sepsis hastalarında ve deney hayvanı modellerinde akut olarak gözlenen bir durum olduğu belirtilmiştir. Mikrogliyal aktivasyonun kanda yükselen sitokin seviyeleri, hastaların vital bulgularındaki değişiklik ve hastaların semptomlarıyla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (31)

Mikrogliyal hücreler, merkezi sinir sisteminde antijen sunan hücreler olarak görev yapmakta ve birçok reseptörü yapısında bulundurmaktadır. Bu reseptörler arasında TLR (Toll like receptor, Toll benzeri reseptör), CX3CR1 kemokin reseptör ve CD11b/CD45 gibi reseptörler yer almaktadır (33). Mikrogliyal aktivasyon moleküler düzeyde incelendiğinde PAMP ve DAMP önemli yer tutmaktadır. Mikrogliyal hücrelerde bulunan TLR'ler bu molekülleri tanıyan reseptörlerdir. Özellikle TLR-2 ve TLR-4'ün sepsis ile ilişkili nöroinflamasyonda görevli en önemli

reseptörler oldukları düşünülmektedir. Gram negatif bakterilerin yapısında bulunan lipopolisakkaritlerin (LPS), TLR-4 tarafından tanınması sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasıyla sonuçlanacak olan bir dizi sinyal yolağı hücre içerisinde aktive olmaktadır. Aktive olan bu sinyal yolları inflamatuvar yanıtta görevli bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B nin, sitoplazmadan nükleusa geçişini sağlayan sinyal sistemini aktive etmektedir. NF- κ B sinyal sistemi 5 transkripsiyonel monomer, 2 prekürsör protein, 3 I κ B (İnhibitör-kappa B) proteini, 3 uyarıya cevap veren inhibitör kinaz molekülü ve ankrin tekrarı içeren regülatör proteinlerden oluşmaktadır. Uyarıya cevap veren inhibitör kinazı olan IKK (Inhibitory Kappa Kinase, İnhibitör Kappa Kinaz) kompleksi, IKK- α , IKK- β ve IKK- γ isimli 3 proteinden oluşmaktadır. Homodimer ya da heterodimer olarak görev yapan NF- κ B monomerlerinden yalnızca p65, C-rel ve RelB transkripsiyonel aktiviteyi uyarabilen TAD (transaktivasyon domaini) yapısına sahiptir. Uyarı olmadığı zamanlarda NF- κ B dimerleri, I κ B inhibitör proteinleriyle kompleks oluşturarak sitoplazmada inaktif formda bulunmaktadır. I κ B inhibitör proteinleri, dimerlerin yapısındaki nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) kapatarak, onların nükleusa geçmelerini engellemektedirler. NF- κ B aktivasyonu, kanonik (geleneksel) ve kanonik olmayan sinyal yolları şeklinde olabilmektedir. Kanonik sinyal yolağında NEMO (NF- κ B esansiyel modülatörü) içeren IKK kinazları görev almakta iken kanonik olmayan sinyal yolağında ise NEMO bağımsız IKK kinazları görev almaktadır. NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonu MyD88 (Myeloid Diferansiyasyon Faktörü 88) ve GEF-H1 (Guanine Nucleotide Exchange Factor H1, Guanin Nükleotid Değişim Faktörü H1)-RhoA (Ras homologueA, Ras HomologA) sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sonuç olarak aktive olan IKK kinazlar, I κ B inhibitör proteinlerini fosforilleyerek yıkımını sağlamaktadır. Kanonik sinyal yolağında en fazla aktive olan NF- κ B p65: p50 heterodimer yapısıdır. I κ B proteinlerinin yıkımı sonucu onlardan ayrılan p65: p50 heterodimerinde NLS bölgeleri açığa çıkmakta ve p50 subüniti, importin α/β heterodimer ile etkileşime girmektedir ve bunun sonucunda p65 nükleusa geçmektedir. Nükleusa geçen p65 molekülü hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Nükleusa geçen NF- κ B p65 ; TNF- α , IL-1, IL-6 ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin genlerinin transkripsiyonunu uyarmaktadır (31,34–36).

Sitokinler vücuttaki çekirdekli birçok hücre tarafından salgılanabilmesine rağmen ağırlıklı olarak yardımcı T hücresi ve makrofajlar tarafından salgılanan yapısal olmayan küçük proteinlerdir (37,38). Bu sitokinler arasında yer alan ve kaşektin olarak da adlandırılan TNF- α hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozis sırasında da önemli rol üstlenmektedir. TNF- α hem membran yüzeyinde hem de salgılanmış olarak bulunabilen tip 2 transmembran proteinleri arasında yer almaktadır. TNF- α salgılanması temel olarak makrofaj ve T hücrelerinden olmasına rağmen, B hücresi, NK (Natural Killer) hücresi, adiposit, düz kas hücresi vb. vücuttaki birçok hücre TNF- α üretebilmektedir. Bakteriyel LPS'nin TNF- α üretimini sağlayan en önemli uyaranlardan olduğu düşünülmektedir. Ancak TNF- α üretiminde LPS tek stimulan olarak görev almamaktadır. Enterotoksin, C5a anaflatoksin, IL-1, IFN- γ , TGF- β , süperantijen ve viral, mikotik, paraziter antijenler de TNF- α üretimine neden olabilmektedir. Enfeksiyon, inflamasyon, astım, beyin hasarı, travma ve yanık gibi patofizyolojik durumlar da TNF- α üretimine neden olmaktadır. TNF- α hücreler tarafından depolanmak yerine üretimini tetikleyen bir faktör varlığında de novo olarak sentezlenmektedir (39).

TNF- α 'nın TNFR1 ve TNFR2 isimli iki reseptörü bulunmaktadır. TNF- α , TNFR1 reseptörüne bağlandığında 2 ayrı sinyal yolağı tetiklenmektedir. Bunlardan ilki proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu ve hücre sağ kalımı sinyali ile ilişkilidir. İkicisi ise apoptozis ve hücre ölümü ile ilişkilidir. Bu sinyal yollarının son etkisi, sinyal yolları oluşurken görev alan proteinlere bağlıdır (40,41). TNFR1, DD (Death domain, ölüm domaini) olarak isimlendirilen hücre içi bir yapıya sahiptir. TNF- α yokluğunda DD, hücre içi bir diğer protein olan SODD (silencer of death domain, ölüm domaini susturucu protein) ile etkileşim halindedir. SODD, DD nin aktive hale gelmesini önlemekte ve böylece TNF- α sinyal yolağını durdurmaktadır. Sinyal yolağı 1'in oluşumunda; TNFR1, TNF- α ile aktive olunca SODD, DD den serbestleşmekte ve bunun sonucunda DD, TRADD (TNFR1 Associated Death Domain Protein, TNFR1 İlişkili Ölüm Alanı Proteini) ile etkileşime geçmektedir. TRADD, RIP-1 (Receptor Interacting Protein-1, Reseptör Etkileşimli Protein-1) ve TRAF-2'nin (TNF Receptor Associated Factor-2, TNF Reseptör-İlişkili Faktör-2) birleşmesini sağlamaktadır. Bu proteinler proinflamatuvar sitokin salınımı ve anti-apoptotik süreçlerde önemli görevler üstlenen proteinlerdir. Sonuç olarak sinyal yolağı 1'de NF-

κ B aktivasyonunun da yer aldığı hücre sağ kalımı yönünde bir dizi sinyal yolağı tetiklenmektedir (42,43). Sinyal yolağı 2 de ise hücre doğrudan apoptozise yönlendirilmektedir. Sinyal yolağı 1 ile tetiklenen NF- κ B aktivasyonunun başarısız olması durumunda sinyal yolağı 2 devreye girmektedir. Bu yolakta TNFR1, TRADD-RIP1-TRAF-2 kompleksinden ayrılmakta FADD (Fas-associated death domain protein, Fas-ilişkili ölüm alanı proteini) ve prokaspaz 8/10 ile etkileşime girmektedir. Sonuç olarak hücre ölümü tetiklenmektedir (39).

İnflamasyonun başlangıç aşamasından itibaren sentezlenen IL-6; CRP, SAA, fibrinojen ve haptogloblin gibi akut faz proteinlerinin sentezini sağlamaktadır. Ayrıca fibronektin, albümin ve transferrin gibi proteinlerin sentezini azaltmaktadır. IL-6 ayrıca bağırsaklardaki demir emilimini sağlayan ferroportin-1'i in etkinliğini azaltan hepsidin salgılanmasını tetiklemektedir. Böylece serum demir seviyelerinde bir düşüş gerçekleştirmektedir (44). Yapılan çalışmalarda IL-6'nın nöron hasarına giden nöronal reaksiyona neden olduğu ortaya konulmuştur (45). IL-6 mikrogial ve astrosit aktivasyonunda ayrıca nöronal nöropeptid salgılanmasının düzenlenmesinde görev almaktadır (46).

Sepsis patofizyolojisinde rol alan moleküler yapılardan olan inflamazomlar, DAMP ve PAMP uyarısının PRR tarafından algılanması sonucunda oluşan sitoplazmik protein yapılarıdır. Sepsisin yanısıra, Multiple Sklerozis, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde görev almaktadırlar (47). Doğal bağışıklık sisteminde, PRR'ler, DAMP ve PAMP'ları tanıyarak immün yanıtın başlamasında görev almaktadırlar. PRR'lerin uyarılması sonucunda interferon- α , interferon- β ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımı tetiklenmektedir (48). NLR'lerin de (NOD-like receptor, NOD benzeri reseptörler) içerisinde bulunduğu bazı PRR aileleri inflamazom kompleksini oluşturan önemli yapılar arasında yer almaktadırlar. Belirli bir uyarı sonucunda NLR'ler, inaktive olan prokaspaz-1'in oligomerizasyonunu sağlamaktadırlar. Bu oligomerizasyon sonucunda pro-kaspaz-1 proteinleri, proteolitik bir parçalanma sonucunda aktif form olan kaspaz-1'e dönüşmektedirler (49). Aktive olan kaspaz-1; pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i parçalayarak, bu moleküllerin aktif formu olan IL-1 β ve IL-18'e dönüşmesini sağlamaktadır. Aktif kaspaz-1 ayrıca inflamatuvar bir hücre ölüm şekli olan piroptozu da tetikleyebilmektedir (50).

Sepsis ilişkili ensefalopati esnasında piropitozisi ve inflamasyonu tetikleyen NLRP3 inflamazomu geniş çeşitliliğe sahip uyarılarla tetiklenebilmektedir. Hatta NLRP3 inflamazomu farklı agonist maddelerle uyarıldığında dahi benzer hücre içi yollar aktive olmaktadır (47). NLRP3 aktivasyonunda bazı süreçler etkili olmaktadır. Bunlar arasında potasyum iyonunun (K^+) hücre dışına akışı, mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimi, NLRP3'ün mitokondriye translokasyonu, mitokondriyal DNA ya da kardiyolipin salınımı ve lizozomal bozulma sonucunda katepsinlerin sitoplazmaya salınımı yer almaktadır (51,52). Birçok hücrede NLRP3'ün aktive olması için bir hazırlık aşaması gerekmektedir. Bu hazırlık aşaması LPS'nin , TLR4 bağlanmasıyla başlamaktadır. Bu uyarı sonrasında NF- κ B sinyal dizisi aktive olmaktadır. NF- κ B, nükleusta pro-IL-1 β , pro-IL-18 ve NLRP3'ün gen transkripsiyonunu sağlamaktadır (47). İnaktif durumda olan NLRP3'ün aktif formuna dönüşebilmesi için bir sinyal daha gerekmektedir. Bu sinyalin oluşumunda birçok faktörün etkili olduğu düşünülmektedir. Bu faktörler arasında potasyum iyonunun (K^+) hücre dışına akışı, kalsiyum iyonunun (Ca^{+2}) mobilizasyonu, klor iyonunun (Cl^-) hücre dışına akışı ve sodyum iyonunun (Na^+) hücre içine akışı gibi iyonik akışlar önemli bir yer tutmaktadır (53).

Piropitoziste görevli bir diğer molekül olan IL-1 β , sepsis sonrası merkezi sinir sistemi üzerinde etki gösteren en önemli sitokinlerden birisidir. Yapılan çalışmalarda merkezi sinir sisteminde gerçekleşen mikroglia ve astrosit hasarı sonrasında IL-1 β ekspresyonunda artış gerçekleştiği gösterilmiştir (54). IL-1 β hücredeki reseptörüne bağlandığında, adhezyon faktörlerinin ekspresyonunu arttırmakta ayrıca lökositlerin inflamasyon bölgesine kemotaksisini kolaylaştırmaktadır. Bunların sonucunda immün reaksiyon cevabını güçlendirmektedir (55). IL-1 β , immün yanıtın yanı sıra merkezi sinir sisteminde öğrenme ve hafıza ile ilgili süreçlerde de rol oynamaktadır. IL-1 β ve IL-1 β reseptörü, hipokampüste normal fizyolojik koşullarda eksprese edilmektedir ve IL-1 β 'nın bu fizyolojik düzeyleri hipokampüsün hafıza ile ilgili etkinliğinde önem arz etmektedir (56–58). Yapılan bazı çalışmalar, IL-1 β 'nın sinyal yolağındaki bir bozulmanın ya da IL-1 β reseptörünün genetik delesyonunun hipokampüs ile ilişkili hafızada bozulmaya yol açtığını göstermektedir (57). Bunun yanında IL-1 β 'nın yüksek düzeyleri de hipokampüs ile ilişkili hafıza üzerinde bozucu bir etkiye neden olmaktadır (55,57). Yapılan bir çalışmada IL-1 β , p38-MAPK sinyal yolağı aracılığıyla akson

gelişimini ve sinaps oluşumunu baskılayabilmektedir. Bu durumun IL-1 β 'nin hafıza ile ilgili bozucu etkilerinden birisi olduğu düşünülmektedir (59). Periventriküler beyaz madde hasarı, birçok nörolojik hastalık patofizyolojisindeki en önemli olaylardan birisidir (60,61). Periventriküler beyaz madde hasarı, mikroglial aktivasyon, proinflamatuvar sitokinlerdeki artış, oligodentrosit progenitör hücre kaybı ve aksonal miyelin kaybı gibi birçok olay sonucunda gelişmektedir. Oligodentrisit progenitör hücreler sepsis esnasında üretimi artan proinflamatuvar sitokinler tarafından hedef alınmaktadır. Neonatal sıçanlar ve oligodentrisit progenitör hücre kültürü üzerinde yapılan bir çalışmada IL-1 β 'nin , oligodentrosit progenitör hücrelerin olgunlaşmasında ve farklılaşmasında etkili olan FYN-MEK-ERK fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (62). Mikroglial aktivasyonu ve sitokin fırtınasını tetikleyen LPS ile TLR-4 etkileşiminde ayrıca glutamat sekresyonunda da bir artış olmaktadır. Bu durum kalsiyumun hücre içerisine akışını bozmakta ve sonuç olarak nöronal disfonksiyon gelişmektedir (63). Mikroglial hücre aktivasyonunda ayrıca CD40 ve ligandı da görev almaktadır. CD40 ve ligandının ekspresyonu ile IL-1 β ve IL-6 sentezi tetiklenmektedir (64).

Beyinde en fazla bulunan glial hücreler olan astrositler beynin patojenlere karşı olan immün yanıtında temel rolü oynayan diğer bir hücre grubudur. Astrositlerin, KBB'nin bütünlüğünün korunmasında görevli temel hücreler olduğu belirtilmiştir. Astrositler doku hasarını takiben aktive duruma geçmekte ve hasar bölgesine göçmektedirler, bu esnada bir takım morfolojik değişiklikler ve inflamatuvar mediyatörlerin salınımı gerçekleşmektedir. Astrositlerin beyin dokusunda gerektiği durumlarda glial skar (astrogliazis) oluşturabilme özellikleri vardır. Astrogliazis biyoenerjetik ve trofik destek sağlayarak nöronal sağ kalımı artırıcı yönde katkı sağlamaktadır. Astrositler nörotoksik bir fenotipe dönüşerek SİE'nin patofizyolojisine katkı sağlamaktadırlar (31). 2016 yılında yapılan bir çalışmada sistemik LPS uygulanmasından 4 saat sonra astrositlerin hücre iskeletinde yapısal değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Hücre iskeletindeki bu değişikliklerin, sitokin sinyallerini algılayıp kendi sitokinleri olan CXCL10, CCL11 ve G-CSF salgılamak için bir hazırlık aşaması olduğu düşünülmektedir. Astrositler kendi ürettikleri sitokinler vasıtasıyla hipokampal mikroçevreyi değiştirmektedirler (65). Astrositlerin ürettiği CCL11 eozinofil kemoatraktanı olarak görev yapmaktadır. CCL11, ayrıca beyinde nörojenez

azaltarak öğrenme ve hafızada bozulmaya yol açmaktadır (66). Yapılan bir başka çalışmada mikrogliaların CCL11 reseptörünü eksprese ettiği ortaya konulmuştur. Aktive olan astrositlerden salgılanan CCL11'in mikrogliaların göçüne ve mikroglialardan reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olduğu bunun sonucu olarak da nöronal ölümü tetiklediği ortaya konulmuştur (67).

Sepsis ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisinde etkili olan lökosit göçü doğal bağışıklık sisteminin önemli bileşenlerinden birisidir. İlerleyen inflamasyonda dokularda gelişen hasar sonrasında baskın hücre haline gelen nötrofiller normal beyin dokusunun parankimasında bulunmamaktadır (68). Sepsis esnasında kanda üretilen proinflamatuvar mediyatörler endotel hücrelerin aktive olarak adhezyon molekülleri eksprese etmelerini sağlamaktadır. Bu mediyatörler arasında endotel kökenli CXCR2 ve astrosit kaynaklı CXCL1 bulunmaktadır. Bu moleküller sayesinde nötrofil adezyonu gerçekleşmekte ve nötrofiller beynin kapiller sistemine göç etmektedir (69). Beyin dokusunda artan nötrofiller proinflamatuvar sitokinleri ve reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikleyerek inflamatuvar yanıtı artırmaktadır. Nötrofiller ayrıca Matriks metalloproteinazlar(MMP), miyeloperoksidaz(MPO), elastaz ve katepsinlerle beyin parankimine zarar vermektedir (25).

2.3 Sepsis İlişkili Ensefalopatide Kan-Beyin Bariyerinin Bozulması

Kan-beyin bariyeri, beyin dokusu ve onun periferi arasında bulunan yüksek seçici geçirgen bir yapıdır. Bu yapının bileşenleri arasında temel olarak mikrovasküler endotel hücreler, astrosit uzantıları, perisitler ve kapiller bazal membran yer almaktadır. Bunların dışında zonula okludens-1 (ZO-1), claudin-5 ve okludin proteinleri KBB'deki sıkı bağlantıları oluşturmada görevli proteinlerdir. Bu proteinlerdeki kayıp veya azalma KBB'nin geçirgenliğini artırmaktadır ve buna bağlı olarak inflamatuvar hücreler beyin dokusuna geçebilmektedirler. Bu bariyerin bütünlüğünün korunması beynin fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilmesi için kilit öneme sahiptir. Bu yüzden KBB serebral homeostazın temel unsurlarından biri olarak kabul edilmektedir. Sepsis, merkezi sinir sistemindeki etkisini özellikle KBB'deki bir takım akut ve kronik değişiklikleri tetikleyerek yapmaktadır. Kan-beyin bariyerindeki bu değişiklikleri tetikleyen bazı ajanlar mevcuttur. Bunlar arasında TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler, LPS'ler gibi

bakteriyel endotoksinler ve KBB'ye etki eden bazı reaktif oksijen türleri sayılabilir. Bu ajanlar, kan-beyin bariyerinde hücrel fonksiyon bozukluğuna ve bunun sonucunda da geçirgenlik artışına neden olmaktadır (22).

Endotelial hücrelerde LPS ile TLR-4 etkileşimi sonucunda NF-κB aktivasyonu gerçekleşmektedir. Aktive olan NF-κB; TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri kodlayan genlerin aktive olmasını sağlamaktadır (34,35). Hücrelerin LPS ile uyarılması sonucunda üretimi artan proinflamatuvar sitokinler, p38MAPK/JNK sinyal yolağı aracılığıyla okludin ekspresyonunu azaltarak hücrelerin yapısında ve sonuç olarak geçirgenliğinde bir değışime neden olabilmektedirler (70). Ayrıca bu ajanlar Matrix metalloproteinazı olan MMP-9'un kan-beyin bariyerinde aktivasyonuna da neden olmaktadır. Normal şartlarda MMP-9'un endotel hücrelerindeki ekspresyonu düşüktür ve inaktif zimojenler şeklinde bulunmaktadır. Lökositler, inflamatuvar mediatörler tarafından uyarıldığı zaman MMP-9 salgılayabilmektedirler. Endotel hücrelerindeki artmış MMP-9 proteinleri kan-beyin bariyerinin ekstraselüler matriks komponentlerine özellikle tip 4 kollajene hasar vermektedirler. Kan-beyin bariyerindeki bu yapısal hasar, geçirgenlik artışına neden olur ve bu durum beyin ödemi, toksik maddelerin kan-beyin bariyerinden geçişi ve beyin dokusunun zarar görmesiyle sonuçlanmaktadır. Sitokin fırtınası ve inflamazom oluşumunda etkili olan NF-κB, MMP-9'un transkripsiyonunu da düzenlemektedir ve NF-κB'nın inhibisyonu, MMP-9'un ekspresyonunu azaltmaktadır. MMP-9'un endotelial hücrelerindeki azalmış ekspresyonu hem inflamasyonun hem de kan-beyin bariyeri hasarının azalmasını sağlamaktadır (71).

Mitokondriyal bütünlükteki bozulma, reaktif oksijen türlerinin üretimini, protein ve lipid oksidasyonunu, DNA hasarını ve hücre ölümünü tetiklemektedir. Bu nedenle mitokondriyal yapıda meydana gelen herhangi bir hasar birçok hastalığın patogeneğinde rol almaktadır. Yapılan bir çalışmada LPS tarafından tetiklenen mitokondriyal bozulmanın sıkı bağlantı proteinlerinde hasarı ve KBB geçirgenliğinde artışı tetiklediğı ortaya konulmuştur (72,73). Dinamin-1 ilişkili protein (dynamin-1-related protein, Drp-1) sitoplazmada bulunan ve çeşitli uyarılar sonucunda mitokondri yüzeyine tutunan bir moleküldür. Drp-1'in mitokondriyal yüzeyde GTPaz aktivasyonunu tetikleyerek mitokondriyal parçalanmaya neden olduğu düşünülmektedir. Drp-1'in inhibitörü olan P110 ile yapılan bir çalışmada, Drp-1

inhibisyonu sonucunda nöronal hücrelerde mitokondriyal disfonksiyonun ve parçalanmanın engellenerek hücrelerin ölümden kurtulduğu gösterilmiştir (72). Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada LPS'nin tetiklediği ZO-1 ve okludin sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonundaki azalmanın ve adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki artışın P110 tedavisiyle geri döndürüldüğü gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada P110'un apoptozun tetiklenmesinde önemli rolü olan sitokrom c'nin mitokondriden salınımını azalttığı da gösterilmiştir (74).

Sonuç olarak sepsis ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisinde kan-beyin bariyerinin bozulması önemli bir yer tutmakta ve bu bariyerin bozulması birçok etkenin tetiklemesi ve hücrel yolların aktivasyonu sonucu gelişmektedir.

2.4 Sepsis İlişkili Ensefalopatinin Tedavisi

Sepsis tedavisi temel olarak 3 başlık altında toplanmaktadır. Bunlar enfeksiyonun kontrolü, hemodinamik dengenin sağlanması ve konağın enfeksiyona karşı verdiği immün yanıtın düzenlenmesi olarak geçmektedir. Enfeksiyon kontrolü için antibiyotik tedavisi ya da enfeksiyon alanının cerrahi şekilde drenajı seçenekler arasında yer almaktadır. Hemodinamik dengenin sağlanmasında sıvı tedavisi ve vasoaktif ajanlar kullanılmaktadır. Konağın immün yanıtının düzenlenmesinde ise NF- κ B üzerinden etki ederek immün yanıtı baskıladığı bilinen glikokortikoidler kullanılmaktadır. Vazopressin de immün yanıtı düzenlemede kullanılabilen ajanlardandır. İnsan aktive protein C'nin rekombinant bir formu Drotrecogin alfa (aktive) antitrombotik, anti-inflamatuar ve trombolitik etkilere sahiptir. Sepsis tedavisinde kullanılan bu ilacın daha sonraki yapılan çalışmalarda negatif etkisi gösterilince, ilaç kullanımdan kaldırılmıştır (4).

2.5 Polifenoller ve Flavonoidler

Fitokimyasallar, organizmanın enerji üretiminde doğrudan yer almamasına rağmen, hastalıkların önlenmesinde önemli roller üstlenen bitkisel kökenli mikrobeyinlerdir (75). Polifenoller, yaklaşık 8000 üyesiyle fitokimyasallar arasındaki en büyük grubu oluşturmaktadırlar. Sebzeler, meyveler, bakliyatlar ve baharatlar gibi birçok bitkide bulunabilen polifenoller ortak özellikleri bulunan bir kimyasal yapıya sahiptirler. Bu ortak yapıda en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir hidroksil grubu yer almaktadır. Polifenoller , flavonoid ve flavonoid olmayan olarak

sınıflandırılabilir (76). Anti-inflamatuar özelliklere sahip polifenollerin, inflamatuvar temelli birçok hastalıkta faydalı olduğu gösterilmiştir. Polifenoller bu anti-inflamatuar etkilerini iki transkripsiyon faktörünün aktivitesini düzenleyerek gerçekleştirmektedirler. Polifenoller, bu transkripsiyon faktörlerinden birisi olan NF- κ B üzerinde inhibitör etkiye sahipken, NF-E2-ilişkili faktör (nrf2) üzerinde ise aktivatör etkiye sahiptirler. Bu sayede proinflamatuvar sitokinlerin sentezinde ve doku inflamasyonu üzerinde azaltıcı bir etkiye neden olmaktadır. Polifenollerin ayrıca sepsis ve sepsis ilişkili organ disfonksiyonunun tedavisi üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu yapılan bir çok çalışmada gösterilmiştir (75).

Flavonoidler bazı bitkilerde serbest olarak ya da glikozidler şeklinde bulunabilen bileşiklerdir. Sebzeler, meyveler, çiçekler ve tahıllar gibi çok geniş yelpazedeki bitki türlerinde bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan bu polifenoller bitkilerin doğada bulunan zararlı patojenlere karşı mücadelesinde yardımcı olmakta ve bitkilerin büyümesine katkıda bulunmaktadır. Patojenlere karşı olan etkileri arasında bakterilerin ölümü, önemli viral enzimlerin inhibisyonu ve zararlı protozoaların öldürülmesi yer almaktadır (77). Doğada binlerce çeşit flavonoid bulunmaktadır ve flavonoidler polifenoller içerisindeki en büyük grubu oluşturmaktadırlar. Bu flavonoid grupları arasında taksifolin, hesperetin, kateşin, malvidin, antosiyanidin, antosiyanin ve kuersetin gibi birçok alt grup sayılabilmektedir (78).

Flavonoidlerin temel yapısı, iki benzen halkası ve bunlara bağlı piran halkasından oluşan bir flavan çekirdeğinden oluşmaktadır (79). Flavonoidler hidrojen veren antioksidanlardır ve bu özellikleri sayesinde aromatik halka yapısında bulunan çoklu hidroksil gruplarını indirgeyebilmektedirler. Bu nedenle polifenolik flavonoidler hidroksil ve süperoksit radikali gibi farklı türden reaktif oksijen radikallerini temizleyen moleküller olarak görev yapmaktadırlar (80). Farklı zamanlarda yapılan birçok çalışmada flavonoidlerin bu antioksidan etkisi temel araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır (77,81,82). Yapılan birçok çalışmada flavonoidlerin sepsis ve sepsis ilişkili ensefalopatinin tedavisinde faydalı olabileceği gösterilmiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada genisteinin, sepsisli farelerin hipokampusünde TNF- α , IL-1 β ve NF- κ B düzeylerini azalttığı ayrıca bilişsel fonksiyonlarda iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Yapılan başka çalışmalarda fisetin ve morin flavonoidlerinin SİE gelişen deney hayvanlarında beyin dokusunda lipid

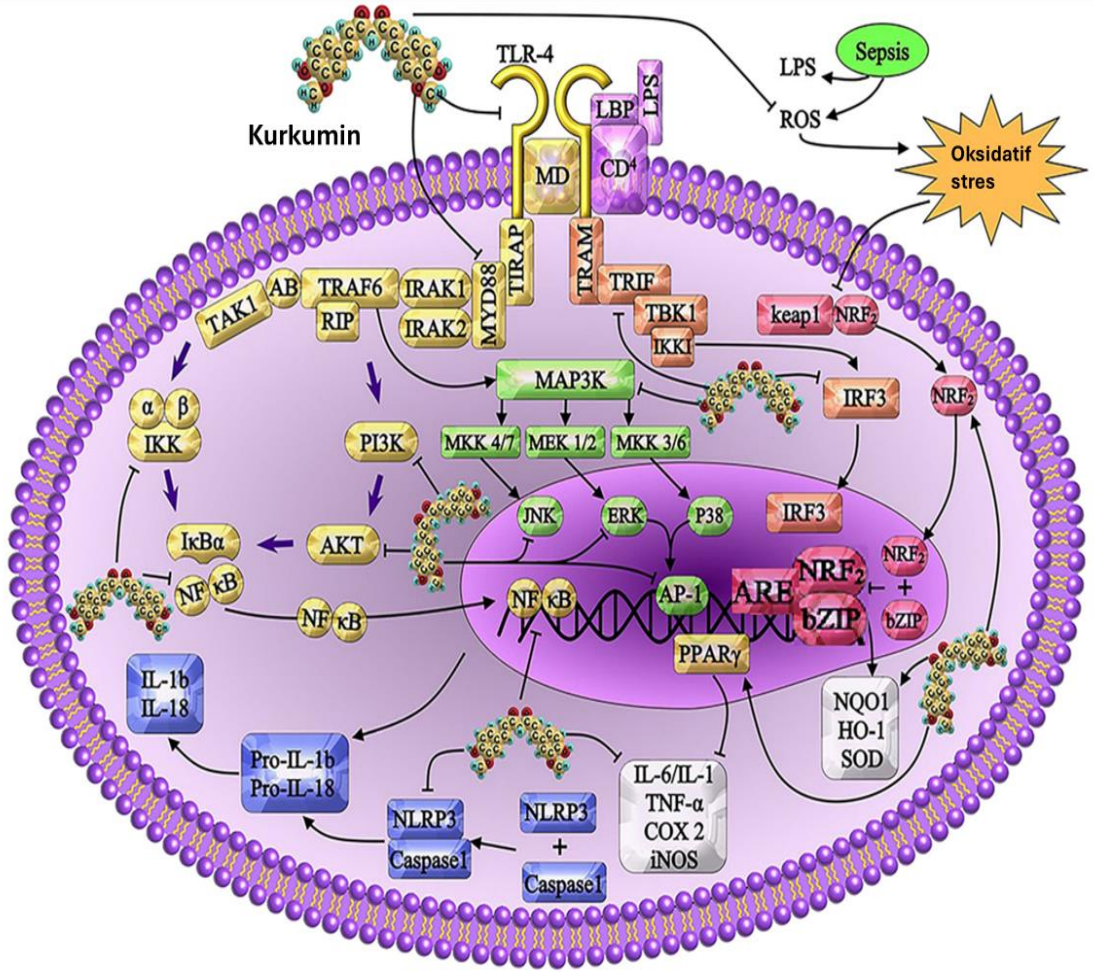
peroksidasyonunu engellediği, proinflamatuvar sitokin ve kaspaz düzeylerini azalttığı ayrıca beyin dokusu ve bilişsel aktivite üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (83,84).

2.6 Kurkuminin Terapötik Etkileri ve Sepsis Üzerindeki Etki Mekanizmaları

Kurkumin zerdeçal bitkisinde bulunan bir polifenoldür. Zerdeçal, zencefil (*Zingiberaceae*) türüne ait bir bitkidir ve dünyada subtropikal ve tropikal bölgelere yayılmıştır, özellikle Çin ve Hindistan gibi asya ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir (85). Yaklaşık 200 yıl kadar önce keşfedilen kurkumin ilk olarak 1847 yılında Vogel Jr. Tarafından saf olarak elde edilmiştir. Kurkumin (1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) zerdeçal bitkisinin kökünden izole edilmektedir. Zerdeçal genel olarak yağ (5.1%), protein (6.3%), karbonhidrat (69.4%), mineraller (3.5%) ve sıvı içerikten (13.1%) oluşmaktadır (86). Zerdeçal bitkisinde ayrıca üç çeşit kurkuminoid bulunmaktadır. Bunlar arasında kurkumin (60%-70%), demetoksikurkumin (20%-27%) ve bisdemeteksokurkumin (%10-%15) yer almaktadır (5). Kurkuminle yapılan çalışmalarda, kurkuminin birçok hastalıkta faydalı etki gösterebileceği belirtilmiştir. Bu etkiler arasında antiepileptik, antiproliferatif, anti-inflamatuvar ve antioksidatif etki sayılabilmektedir (87-89).

Önceki çalışmalar vücudun patojenlerle mücadele edebilmek için aşırı immün cevap oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu immün cevapla birlikte çok miktarda inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin salınmakta ve bunun sonucunda, sepsiste doku hasarı, organ yetmezliği ve ölüm gerçekleşmektedir (90). Birçok çalışma kurkuminin, bu aşırı immün cevapla mücadele edebilecek anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Kurkumin bu anti-inflamatuvar etkisini hücre içerisinde birden çok sinyal yolağını tetikleyerek yapmaktadır (Şekil 1). Kurkuminin proinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın sentezlenmesi üzerindeki güçlü inhibitör etkisi bu mekanizmalardan birisidir (91). Yapılan bir çalışmada kurkuminin kronik kolitli deney hayvanlarında p38 MAPK aktivitesini baskılayarak COX-2 ve iNOS sinyal yollarını baskıladığı ve bu yolla da anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (92). Kurkuminin, NF- κ B inhibitörü olan ve enfeksiyon durumunda hücre içi düzeyi azalan I κ B α 'nın hücre içi miktarında artışa neden olduğu ve bu yolla NF- κ B'nin aktivasyonunu engelleyebileceği gösterilmiştir. NF- κ B heterodimer yapısında olan

p65 molekülü, NF- κ B'nin sitoplazmadan çekirdeğe geçerek proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu sağlayan genlerin aktive olmasına yardımcı olmaktadır. Kurkuminin, enfekte hücrelerde sitozolik p65 düzeylerini arttırdığı ve nükleer p65 düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur (93). AKT proteini, NF- κ B sinyal yolağının aktive olmasında rol oynamaktadır. Kurkumin PI3K/AKT sinyal yolağındaki AKT'yi baskılayarak NF- κ B sinyal yolağını baskılamaktadır (89). Kurkumin ayrıca PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) ekspresyonunu arttırarak da NF- κ B sinyal yolağını ve sonuç olarak sitokin fırtınasını baskılayabilmektedir (94). LPS ile TLR-4 etkileşimi ve bu etkileşim sonucunda aktive olan sinyal yolları da kurkumin tarafından baskılanabilmektedir. Kurkumin TLR-4'ün hücre dışı kısmıyla ilişkili olan ve LPS ile TLR-4 etkileşiminde önemli bir role sahip olan MD-2 proteine bağlanarak bu etkileşimi engelleyebilmektedir (95,96). Ayrıca MyD88 ve TRIF bağımlı sinyal yollarını da inhibe ederek, NF- κ B ve inflamatuvar yanıtı baskılayabilmektedir (97). Sepsisli fareler üzerinde 2016 yılında yapılan bir çalışmada kurkuminin beyin ödemi azalttığı ve nöronal apoptozisi engellediği de ortaya konulmuştur. Ayrıca aynı çalışmada kurkuminin, mitokondriyal disfonksiyonu engelleyerek reaktif oksijen türlerini azalttığı gösterilmiştir. Bunun dışında kurkuminin, sepsisli farelerde MMP düzeyini azaltarak KBB'nin bozulmasının engellendiği gösterilmiştir (98)



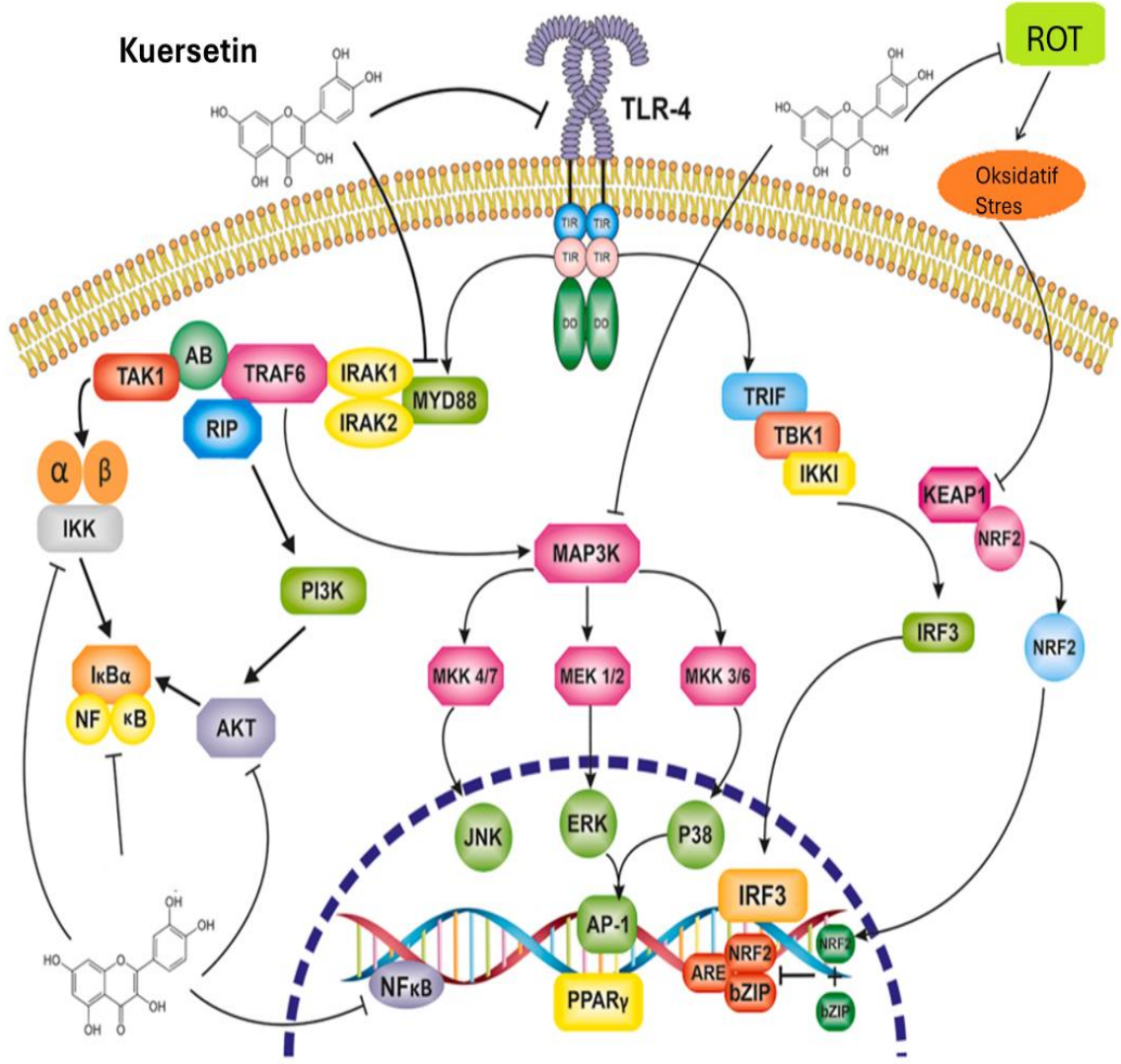
Şekil 1: Kurkumin Sepsisteki Etki Mekanizmaları (Karimi ve ark. modifiye edilmiştir) (5)

2.7 Kuersetinin Terapötik Etkileri ve Sepsis Üzerindeki Etki Mekanizmaları

Kuersetin ve türevleri olan izokuersetin, rutin ve kuerstrin birçok biyolojik aktiviteye sahip olan ve flavanoid ailesine ait olan bitkisel kaynaklı moleküllerdir. Meyveler, sebzeler ve tahıllar gibi birçok bitkisel besinde bulunabilen kuersetin özellikle elma, soğan, turuncgiller, üzüm, domates, brokoli ve yeşil yapraklı sebzelerde yüksek oranlarda bulunmaktadır. Yapısında çok sayıda hidroksil grubu barındıran kuersetin antioksidan ve anti-inflamatuar etkiler başta olmak üzere antitümör, antibakteriyel, immünsüpresif ve nöroprotektif etki gibi birçok faydalı

etkiye sahiptir (99). Yapılan bir çalışmada depresyonun tetiklendiği farelerde, kuersetinin depresyon ilişkili davranışlar üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun yanısıra aynı çalışmada kuersetinin, FOXG1/CREB/BDNF sinyal yolağı aracılığıyla nörojenezi de uyardığı gösterilmiştir (100).

Bu etkilerin yanısıra kuersetin sepsis üzerinde de birçok faydalı etkiye sahiptir. Bu etkiler arasında oksidatif stresin engellenerek doku hasarının önlenmesi, immün sistem ve inflamasyonun düzenlenmesi ayrıca sepsis ilişkili organ disfonksiyonun önlenmesi sayılabilmektedir. Kuersetin inflamasyon üzerindeki inhibe edici etkisini birçok mekanizma ile göstermektedir (Şekil 2) (6). Bunlardan birisi LPS ile aktiflenen NF- κ B sinyal yolağının inhibitörü olan I κ B α 'nın fosforilasyonunu azaltarak yıkılmasını önlemek ve NF- κ B sinyal yolağının baskılanmasıdır. Bu sayede TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi baskılanmaktadır (101). Ayrıca kuersetinin, TLR-4 mRNA ekspresyonunu azaltarak NF- κ B ve MAPK sinyal yolağlarını baskıladığı da gösterilmiştir (102). Yapılan bir çalışmada kuersetinin p38 MAPK ve JNK üzerinden iNOS uyarılmasını inhibe ederek NO sentezini azalttığı da gösterilmiştir (103). Kuersetinin sepsis üzerindeki genel etkileri yanı sıra sepsis ilişkili ensefalopatide beyin dokusundaki inflamasyonu baskılayarak beyin hasarını azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Fareler üzerinde 2018 yılında yapılan bir çalışmada, kuersetinin LPS ile indüklenen nöroinflamasyonda TLR-4/NF- κ B sinyal yolağını ve TNF- α , IL-1 β , COX-2, NOS-2 gibi inflamasyon ilişkili belirteçleri baskıladığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada kuersetinin beyin dokusundaki kaspaz-3 aktivitesini baskılayarak nöronal apoptozisi azalttığı da gösterilmiştir (104). Yapılan başka bir çalışmada kuersetinin nöronal inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak nöronal sağ kalımı arttırdığı ve beyin dokusu üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (105).



Şekil 2: Kuersetinin Sepsisteki Etki Mekanizmaları (Karimi ve ark. modifiye edilmiştir) (6)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın yapılması için Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 07.09.2022 tarihinde 01/11/2022 karar sayılı etik kurulu onayı (EK-1) alınmıştır. Proje Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından TTU-2023-2981 proje kodu ile desteklenmiştir. Deney hayvanlarına yapılan uygulamalar Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarında yürütülmüştür. Doku homojenizasyonu ve biyokimyasal analizler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AD Laboratuvarı ve Dokuz Eylül Üniversitesi ARLAB bünyesinde yürütülmüştür. Çalışmada yer alan deney hayvanlarına yapılan uygulamalarda uluslararası deney hayvanları çalışma ilkelerine ve hayvan refahına uygun bir yaklaşım sergilenmiştir.

Tablo 3: Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar

Kuruluştaki Bulunan Altyapı/Ekipman Türü	Projede Kullanım Amacı
Santrifüj	Doku homojenizasyonunda süpernatantı ayırmak
Etüv	ELİSA inkübasyonları
-86 °C Derin dondurucu	Dokuların dondurulması ve saklanması
Hassas terazi (0,1 mg hassasiyetli)	Dokuların ve solüsyonların hazırlanması için gerekli malzemelerin tartımında
Otomatik pipet seti (Thermo Fisher Scientific)	Deneyde kullanılan çözeltilerin, reaktiflerin hazırlanması ve ELİSA kitlerinin çalışılması
Buzdolabı	Kitlerin saklanması
Buz yapma makinesi	Dokuları belirli soğuklukta muhafaza edilmesi
Bidistile su cihazı	Bidistile su gereksiniminin karşılanması
Vortex 4S	Solüsyonların karıştırılması
Mikroplaka okuyucu	ELISA testleri ile protein tayini

3.1 Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Denepleri Laboratuvarından temin edildi. Çalışmada kullanılacak deney hayvanı sayısının belirlenmesi amacıyla çalışma öncesinde güç analizi yapıldı ve çalışmada ağırlıkları ortalama 350-400 gram olan Wistar Albino türünde toplamda 42 tane erkek sıçan kullanıldı. Literatürde, erkek ve dişi sıçanlarda oluşturulan sepsis modeli için cinsiyet hormonlarının sepsis şiddetini etkileyebileceğinin belirtilmesi nedeniyle, seçilen tüm sıçanlar aynı cinsiyette ve erkek olarak seçildi (106). Çalışma grupları ön deneyler hariç her bir deney grubunda 6 hayvan olacak şekilde gruplandırıldı. Deney hayvanlarının 12 tanesi ön deney çalışmalarında, 30 tanesi de sepsis modelinin oluşturulup polifenollerin etkinliğinin değerlendirildiği deneysel kısımda kullanıldı.

3.2 Deney Hayvanlarının Bakımı ve Beslenmesi

Deneyde kullanılan tüm sıçanlar 20-22°C oda ısısında, bağıl nem oranı yüzde 50-60 olan standart hayvan odaları ve kafeslerinde 12 saatlik aydınlık, 12 saatlik karanlık periyod olacak şekilde barındırıldı. Tüm deney süresinde hayvanların yem ve suya serbest bir şekilde (ad libitum) ulaşmaları sağlandı. Hayvanların beslenmesinde çeşme suyu ve standart pelet yem kullanıldı.

3.3 Deney Grupları ve Deney Modelinin Oluşturulması

Deney modelinin oluşturulması iki aşamalı olarak tasarlandı. Çalışmanın ilk aşamasında LPS enjeksiyonu ile sepsis modelinin oluşturulması ve doğrulanması, ikinci aşamasında ise sepsis modelinin oluştuğu ve KBB'nin bozulduğu doğrulanmış olan bir deney modelinde polifenollerin ve kombinasyonunun etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Her bir deney grubundaki deney hayvanı sayısı, intaperitoneal (i.p) verilecek maddeler ve bu maddelerin uygulama dozları Tablo-4 ve Tablo-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4: Ön Deney Grupları

Gruplar	(n)	Enjeksiyonlar
Kontrol	3	SF*
LPS	3	LPS (5mg/kg)

*: Serum Fizyolojik

Tablo 5: Deney grupları

Gruplar	(n)	Enjeksiyonlar
LPS	6	LPS (5 mg/kg) /Pozitif Kontrol Grubu
Taşıyıcı kontrol	6	DMSO* / Taşıyıcı kontrol Grubu
Kurkumin	6	Kurkumin (50 mg/kg)
Kuersetin	6	Kuersetin (100 mg/kg)
Kombinasyon	6	Kurkumin (25 mg/kg) + Kuersetin (50 mg/kg) /Kombinasyon Grubu

*: Dimetil sülfoksit

3.4 Deneyin Yapılışı

3.4.1 Sepsis modelinin oluşturulması




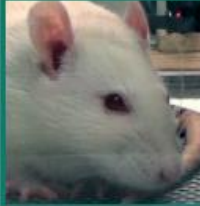




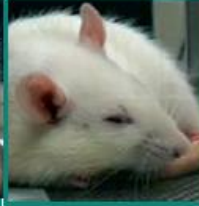



Sepsis oluşumunu sağlayan LPS dozunun ve süresinin belirlenmesi için yapılan ön deneyde literatür bilgisine dayanarak LPS grubuna, LPS (Escherichia Coli O111:B4, Sigma-Aldrich) distile su içinde 5mg/kg dozunda i.p yolla verildi. Kontrol grubunda yer alan deney hayvanlarına ise aynı miktarda SF intraperitoneal yoldan verildi (107). Literatürde belirtilen süre boyunca deney hayvanları sepsis bulguları açısından izlendi. Bu süre zarfında LPS verilen deney hayvanlarındaki ağrı bulguları olan orbital daralma, burun düzleşmesi, kulakların açılması ve bıyıklarda dikleşme *rat grimace scale* 'e göre değerlendirildi (Şekil 3).

The Rat Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in rats.

The specific facial action units shown below have been used to generate the Rat Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can be used as part of a clinical assessment.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening <ul style="list-style-type: none"> Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) A wrinkle may be visible around the eye 			
Nose/cheek flattening <ul style="list-style-type: none"> Flattening and elongation of the bridge of the nose Flattening of the cheeks (potentially sunken look) 			
Ear changes <ul style="list-style-type: none"> Ears curl inwards and are angled forward to form a 'pointed' shape Space between the ears increases 			
Whisker change <ul style="list-style-type: none"> Whiskers stiffen and angle along the face Whiskers may 'clump' together Whiskers lose their natural 'downward' curve 			

Read the original paper:
Solocinski SG, Sorge RE, Zakum A, Tuttle AH, Merth L, Weskopf JS, Mepplebeck JCS, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 7: 55. doi:10.1186/1744-8059-7-55

For guidance on using the Rat Grimace Scale, research papers that underpin this technique, and for grimace scales in other species, visit: www.nc3rs.org.uk/grimacescales
To request copies of this poster, please email: enquiries@nc3rs.org.uk
The NC3Rs provides a range of 3Rs resources at: www.nc3rs.org.uk/resources
Images kindly provided by Dr. Jeffrey Mogil, McGill University

Şekil 3: Rat Grimace Scale(108)

3.4.2 KBB bütünlüğünün bozulduğunun doğrulanması

Lipopolisakkarit uygulanmasından sonraki altıncı saatin sonunda kan-beyin bariyerinin bozulup, bozulmadığının değerlendirilmesi amacıyla, literatürde daha önce tarif edildiği şekilde deney hayvanlarına Evans blue boyası verildi (109). Bu uygulamada deney hayvanlarına kuyruk veninden deney hayvanlarının ağırlıklarına göre hesaplanmış olan Evans blue boyası (3 ml/kg) uygulandı ve bu boyanın deney hayvanında sistemik dolaşıma karışması için 1 saat beklendi. Bir saatlik bekleme süresinin sonunda perfüzyon aşamasına geçildi. Bu aşamada deney hayvanının karın ve göğüs boşluğu açıldı. Sonrasında göğüs kavitesi açılarak kalbin sağ atriyumunda küçük bir delik açıldı. Sol ventriküle de enjektörle girilerek yaklaşık olarak 200-250 ml serum fizyolojik verilerek, perfüzyon işlemi sağ atriyumdan şeffaf renkte sıvı gelmesiyle sonlandırıldı (Şekil 4). Bu süre sonunda deney hayvanın kafatası açılarak beyin çıkarıldı ve beyin hipokampus, prefrontal lob ve kalan beyin dokusu olacak şekilde 3 parçaya ayrıldı ve dokular -80 °C saklandı. Sonraki gün -80 °C'den çıkarılan hipokampus ve prefrontal korteks tartıldı ve 500 µL, %50 trikloroasetik asit içerisinde doku homojenizatörü kullanılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenat 10000 g hızında 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant etanol ile 4 kat seyreltildi. Evans blue boyasının standart eğrisi, etanolde Evans blue boyasının 100, 250, 500, 750, ve 1000 ng/ml konsantrasyonunda çözülmesiyle elde edildi. Standart ve örneklerde floresans ışımaya ölçümü 620/680 nm'de yapıldı. Belirlenen standartlar kullanılarak örneklerde miktar tayini yapıldı.



Şekil 4: Perfüzyon Aşaması (Sol ventrikülden SF verilmesi)

3.4.3 Deney Hayvanlarına Uygulanacak Polifenol Çözeltilerinin Hazırlanması

250 mg Kurkumin 375 μ L'lik DMSO içinde çözülerek bir stok solüsyon hazırlandı. Deney hayvanı başına 20 mg kurkumin içermesi için ependorf tüplere 30 μ L hazırlanan stok solüsyondan eklendi ve bu çözelti sonraki gün hayvanlara verilmek üzere -20 °C saklandı. Sonraki gün bu stok solüsyona 300 μ L etanol eklendi ve çözelti vortekslenerek hayvanlara intraperitoneal olarak verildi. Böylelikle %100 DMSO içerisinde çözülen kurkumin bir hayvana verilmesi gereken maksimum DMSO yüzdesi olan %10 oranına seyreltilmiş oldu. Ayrıca etanol ile seyreltme yapılırken bir hayvana ip olarak verilmesi gereken maksimum etanol dozuna (1 ml/kg) dikkat edildi.

500 mg kuersetin 3.75 ml etanol içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Hayvan başına 40 mg kuersetin içermesi için ependorf tüplere 300 μ L hazırlanan stok solüsyondan eklendi. Daha sonra bu stok solüsyona 30 μ L DMSO (Son çözelti %10 DMSO) eklenip çözelti bir sonraki gün hayvana enjekte edilmek üzere -20 °C saklandı. Sonraki gün bu karışım vortekslenerek hayvanlara ip yoldan verildi.

Kombinasyon grubundaki her bir hayvana verilecek olan solüsyonun 10 mg kurkumin ve 20 mg kuersetin içermesi için, ependorflara hazırlanan kurkumin stok

solüsyonundan 15 µL ve kuersetin stok solüsyonundan 150 µL eklenerek bir karışım oluşturulmuştur ve daha sonra bu karışım bir sonraki gün hayvanlara verilmek üzere -20 °C saklanmıştır.

3.4.4 Deney Hayvanlarının Tartılması, Gruplandırılması ve İşaretlenmesi

İlk etapta deney hayvanları her bir kafeste 3 hayvan olacak şekilde 10 kafese ayrıldı ve hayvanlar doz hesaplanması için tartıldı. Hayvanların ağırlığı 350-400 gram olarak belirlendi. Sonrasında her kafes ilgili deney grubunun 1. kafesi ve ilgili deney grubunun 2. kafesi (LPS 1. ve LPS 2. Kafes) şeklinde etiketlendi ve işaretleme işlemine geçildi. Her kafesteki hayvanın kuyruğu sırasıyla tek çizgi (1. Hayvan), çift çizgi (ikinci hayvan) ve çizgi yok (3. Hayvan) olacak şekilde boyandı.

3.4.5 Deney Modelinin Oluşturulması ve Dokuların Toplanması

Deneyin 1. Günü

LPS uygulanmasından 24 saat öncesinde Kurkumin grubundaki deney hayvanlarına 50 mg/kg kurkumin i.p olarak verildi. LPS uygulanmasından 24 saat öncesinde Kuersetin grubundaki deney hayvanlarına 100 mg/kg kuersetin i.p olarak verildi. LPS uygulanmasından 24 saat öncesinde Kombinasyon grubundaki deney hayvanlarına 25 mg/kg kurkumin+50 mg/kg kuersetin içeren karışım i.p olarak verildi. LPS uygulanmasından 24 saat öncesinde taşıyıcı kontrol grubundaki deney hayvanlarına %10 DMSO i.p olarak verildi.

Deneyin 2. Günü:

LPS uygulanmasından 1 saat öncesinde Kurkumin grubundaki deney hayvanlarına 50 mg/kg kurkumin i.p. olarak verildi. LPS uygulanmasından 1 saat öncesinde Kuersetin grubundaki deney hayvanlarına 100 mg/kg kuersetin i.p. olarak verildi. LPS uygulanmasından 1 saat öncesinde Kombinasyon grubundaki deney hayvanlarına 25 mg/kg kurkumin+50 mg/kg kuersetin içeren karışım i.p olarak verildi. LPS uygulanmasından 1 saat öncesinde taşıyıcı kontrol grubundaki deney hayvanlarına %10 DMSO i.p olarak verildi.

Yukarıdaki enjeksiyonlardan sonra DMSO grubu dışındaki deney hayvanlarına 5 mg/kg dozundaki LPS i.p olarak verildi. Sonrasında hayvanlar 6 saat boyunca *rat grimace scale*'e göre izlendi ve belirli aralıklarla görüntüleri kaydedildi. LPS uygulanmasından sonraki 6. saatte deney hayvanları sakrifiye edildi ve beyinleri çıkarılıp buz üzerine koyuldu. Sakrifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra toplanan beyinlerin hipokampus ve prefrontal lobları buz üzerinde tüm beyinden disseke edilerek ayrıştırıldı. Ayrıştırılan bu dokular daha sonra ilgili biyokimyasal parametreleri ölçülmek üzere -80 °C saklandı.

3.5 Biyokimyasal Ölçümler

3.5.1 Doku Homojenatının Hazırlanması

NF-κB, TNF-α, IL-1β ölçümleri ve NLRP-3, ZO-1, Claudin-5 ölçümleri için beynin iki ayrı lobundan hipokampus ve prefrontal korteks bölgeleri kullanıldı. Dokuların homojenizasyonu esnasında prefrontal korteks ve hipokampus tek bir homojenat oluşturacak şekilde homojenize edildi. NF-κB, TNF-α, IL-1β ölçümlerinde kullanılmak amacıyla doku homojenat hazırlanması sürecinde ilk etapta dokular tartıldı. Daha sonra bu dokular kitlerin prospektüsünde belirtildiği şekilde ağırlık (mg): hacim (μL) = 1:9 olacak şekilde soğuk PBS ile cam homojenizatörde buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonrasında berrak bir görünüm elde etmek amacıyla sonikasyon cihazı kullanıldı. Elde edilen homojenat iki tüpe ayrıldı. Bunlardan birisi NF-κB ölçümü için +4 °C, 10000g' de 5 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant -80 °C'ye kaldırıldı. Diğer kısım +4 °C, 5000g' de 7 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant TNF-α ile IL-1β ölçümü için -80 °C'ye kaldırıldı.

NLRP-3, ZO-1, Claudin-5 ölçümlerinde kullanılmak amacıyla doku homojenat hazırlanması sürecinde ilk etapta dokular tartıldı. Daha sonra bu dokular kitlerin prospektüsünde belirtildiği şekilde uygun lizis tampon çözeltileri kullanılarak doku öğütücüsü ile homojenize edildi. NLRP-3 için elde edilen homojenat 18000g de 20 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant -80 dereceye kaldırıldı. ZO-1 ve Claudin-5 ölçümlerinde kullanılmak amacıyla hazırlanan homojenat 10000g de 5 dk santrifüj edilerek -80 dereceye kaldırıldı.

3.5.2 ELİSA Yöntemiyle Biyokimyasal Ölçümlerin Yapılması

Tablo 6: Kitlerin Marka ve Yöntemleri

TEST ADI	MARKA ADI	YÖNTEM
ZO-1	USCN	ELİSA
Claudin-5	MyBioSource	ELİSA
TNF- α	Reed Biotech	ELİSA
IL-1 β	Reed Biotech	ELİSA
NF- κ B	ELK Biotechnology	ELİSA
NLRP-3	Abcam	ELİSA
Doku Protein Ölçümü	Pierce™(Thermo Scientific)	BCA Protein Ölçümü

3.5.2.1 ZO-1 ELİSA Test Prosedürü

1. Çalışmadan önce tüm örnekler, solüsyonlar ve mikroplaka oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kit prosedüründe belirlendiği şekilde hazırlandı.
3. Reaktif A ve reaktif B konsantre çözeltileri kendi dilüentleriyle 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışmaya uygun hale getirildi.
4. İlgili kuyucuklara 100 μ L örnek ve standartlardan eklendi ve 37 °C, 60 dk inkübasyona bırakıldı.
5. Kuyucuklardaki sıvılar alındı ancak yıkama yapılmadı.
6. Her bir kuyucuğa 100 μ L reaktif A eklendi ve 37 °C, 60 dk inkübasyona bırakıldı.
7. 350 μ L yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
8. Her bir kuyucuğa 100 μ L reaktif B eklendi ve 37 °C, 30 dk inkübasyona bırakıldı.
9. 350 μ L yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkama yapıldı.
10. Her bir kuyucuğa 90 μ L sübstrat reaktifi eklendi ve 37 °C, 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

11. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu (sülfürik asit) eklendi ve 450'nm de absorbans ölçüldü.

3.5.2.2 Claudin-5 ELİSA Test Prosedürü

1. Çalışmadan önce tüm örnekler, solüsyonlar ve mikroplaka oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kit prosedüründe belirlendiği şekilde hazırlandı.
3. Reaktif A ve reaktif B konsantre çözeltileri kendi dilüentleriyle 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışmaya uygun hale getirildi.
4. İlgili kuyucuklara 100 µL örnek ve standartlardan eklendi ve 37 °C, 60 dk inkübasyona bırakıldı.
5. Kuyucuklardaki sıvılar alındı ancak yıkama yapılmadı.
6. Her bir kuyucuğa 100 µL reaktif A eklendi ve 37 °C, 60 dk inkübasyona bırakıldı.
7. 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
8. Her bir kuyucuğa 100 µL reaktif B eklendi ve 37 °C, 30 dk inkübasyona bırakıldı.
9. 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkama yapıldı.
10. Her bir kuyucuğa 90 µL sübstrat reaktifi eklendi ve 37 °C, 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
11. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu (sülfürik asit) eklendi ve 450'nm de absorbans ölçüldü.

3.5.2.3 TNF-α ELİSA Test Prosedürü

1. Çalışmadan önce tüm örnekler, solüsyonlar ve mikroplaka oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kit prosedüründe belirlendiği şekilde hazırlandı.
3. Biotinli-Antikor ve HRP (Horseradish Peroksidaz) konjugatı konsantre çözeltilerine kendi dilüentleriyle 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışmaya uygun hale getirildi.

4. İlgili kuyucuklara 100 µL örnek ve standartlardan eklendi ve 37 °C, 90 dk inkübasyona bırakıldı.
5. 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
6. Her bir kuyucuğa 100 µL biotinli antikor eklendi ve 37 °C, 60 dk inkübasyona bırakıldı.
7. 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
8. Her bir kuyucuğa 100 µL HRP konjugatı eklendi ve 37 °C, 30 dk inkübasyona bırakıldı.
9. 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
10. Her bir kuyucuğa 100 µL sübstrat reaktifi eklendi ve 37 °C, 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
12. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu (sülfürik asit) eklendi ve 450'nm de absorbans ölçüldü.

3.5.2.4 IL-1β ELİSA Test Prosedürü

1. Çalışmadan önce tüm örnekler, solüsyonlar ve mikropılaka oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kit prosedüründe belirlendiği şekilde hazırlandı.
3. Biotinli-Antikor ve HRP konjugatı konsantre çözeltilerine kendi dilüentleriyle 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışmaya uygun hale getirildi.
4. İlgili kuyucuklara 100 µL örnek ve standartlardan eklendi ve 37 °C, 90 dk inkübasyona bırakıldı.
5. 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
6. Her bir kuyucuğa 100 µL biotinli antikor eklendi ve 37 °C, 60 dk inkübasyona bırakıldı.
7. 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
8. Her bir kuyucuğa 100 µL HRP konjugatı eklendi ve 37 °C, 30 dk inkübasyona bırakıldı.
9. 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
10. Her bir kuyucuğa 100 µL sübstrat reaktifi eklendi ve 37 °C, 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

11. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu (sülfürik asit) eklendi ve 450'nm de absorbens ölçüldü.

3.5.2.5 NF-κB ELİSA Test Prosedürü

1. Çalışmadan önce tüm örnekler, solüsyonlar ve mikroplaka oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kit prosedüründe belirlendiği şekilde hazırlandı.
3. Biotinli-Antikor ve Streptavidin-HRP konsantre çözeltilerine kendi dilüentleriyle 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışmaya uygun hale getirildi
4. İlgili kuyucuklara 100 µL örnek ve standartlardan eklendi ve 37 °C, 80 dk inkübasyona bırakıldı.
5. 200 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
6. Her bir kuyucuğa 100 µL biotinli antikor eklendi ve 37 °C, 50 dk inkübasyona bırakıldı.
7. 200 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
8. Her bir kuyucuğa 100 µL streptavidin HRP eklendi ve 37 °C, 50 dk inkübasyona bırakıldı.
9. 200 µL yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkama yapıldı.
10. Her bir kuyucuğa 90 µL TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) reaktifi eklendi ve 37 °C, 20 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
11. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu (sülfürik asit) eklendi ve 450 nm'de absorbens ölçüldü.

3.5.2.6 NLRP-3 ELİSA Test Prosedürü

1. Çalışmadan önce tüm örnekler, solüsyonlar ve mikroplaka oda sıcaklığına getirildi.
2. Standartlar kit prosedüründe belirlendiği şekilde hazırlandı.
3. Antikor karışımı hazırlamak için konsantre antikor solüsyonlarının her birinden 300 µL alındı ve antikor dilüsyon solüsyonu ile 3 ml'ye tamamlandı.
4. İlgili kuyucuklara 50 µL örnek ve standartlardan eklendi.

5. Örnek ve standartların üzerine 50 µL antikor karışımından eklendi ve 400 rpm hızında çalışan çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapıldı.
7. Her bir kuyucuğa 100 µL TMB reaktifi eklendi ve 400 rpm hızında çalışan çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında, karanlıkta 10 dk inkübasyona bırakıldı.
8. Her bir kuyucuğa 100 µL durdurma solüsyonu eklendi ve 450 nm'de absorbans ölçüldü.

3.5.2.7 BCA Protein Ölçümü Test Prosedürü

1. BCA Reaktif A: BCA Reaktif B oranı 50:1 olacak şekilde karıştırılarak çalışma reaktifi hazırlandı.
2. Kitte belirtildiği şekilde standartlar hazırlandı.
3. İlgili kuyucuklara 25 µL örnek ve standartlardan eklendi.
4. Üzerlerine 200 µL çalışma reaktifi eklendi.
5. 37 °C, 30 dk inkübasyona bırakıldı.
6. 562 nm'de absorbans ölçüldü.

3.6 İstatistiksel Analiz

Deney modellerinde kullanılacak deney hayvanı sayısını belirlemek amacıyla kurkumin ve kuersetin polifenollerini kullanılarak yapılan iki deney hayvanı çalışması güç analizinde kullanıldı (110,111). Beş bağımsız grubun karşılaştırıldığı bu çalışmada; ANOVA F test için etki büyüklüğü "1" alınarak %95 güven aralığı %90 güç ile toplam örnek büyüklüğü 20, her grup için "4" olarak hesaplandı. Verinin her grupta dağılımın parametrik özelliğe yaklaşması ve/veya homojen dağılım göstermemesi için, her gruba en az 6 hayvan alınmasına karar verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Sürekli veriler, her grup için tanımlayıcı olarak parametrik koşul sağlanması nedeniyle ortalama ve standart sapma ile sunuldu. Grupların karşılaştırılmasında ANOVA F test ve Posthoc Bonferroni test uygulandı. Tüm testlerde $P < 0.05$ hata istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Ön Deneyler

4.1.1.Gözlemsel bulgular

Kan-Beyin bariyerinin bozulması ve sepsis gelişmesi amacıyla literatürde belirtilen 24 saatlik sürenin sonucunda; 5 mg/kg LPS verilen 3 deney hayvanının ölmesi nedeniyle, ön deney çalışması bekleme süresi kısaltılarak yeniden planlandı. İkinci kez yapılan ön deneyde, LPS grubundaki deney hayvanlarına 5 mg/kg LPS, kontrol grubundaki deney hayvanlarına aynı miktarda SF verildi ve literatürde belirtilen diğer bir süre olan 6 saat boyunca deney hayvanları sepsis bulguları açısından izlendi (112,113). LPS verilen deney hayvanlarında ağrı bulguları olan orbital daralma, burun düzleşmesi, kulakların açılması ve bıyıklarda dikleşme 2. saatten itibaren gözlenmeye başlandı. İkinci saat ile deney hayvanlarının sakrifikasyonuna kadar geçen sürede bu bulgular daha belirgin olarak gözlenmeye devam edildi (Şekil 5 ve Şekil 6). Evans blue verildikten 1 saat sonra deney hayvanlarının kulak, burun gibi uç uzuvları ve ön, arka ayaklarının mavi bir renk aldığı gözlemlendi (Şekil 7). Bu durum bize evans blue boyasının dolaşımında dağılımının gerçekleştiğini göstermektedir. Perfüzyon aşaması için karın boşluğu açıldığında iç organların da mavi renk aldığı gözlemlendi (Şekil 8), ayrıca sepsis bulgularından olan Peyer plakları gözlemlendi (Şekil 9) (114,115).



Şekil 5: LPS verilmeden hemen öncesi orbital daralma yok (Ön deney)



Şekil 6: LPS verildikten 6 saat sonra belirgin orbital daralma mevcut (Ön deney)



Şekil 7: Evans blue boyası sonrası uç uzuvların mavi renk alması



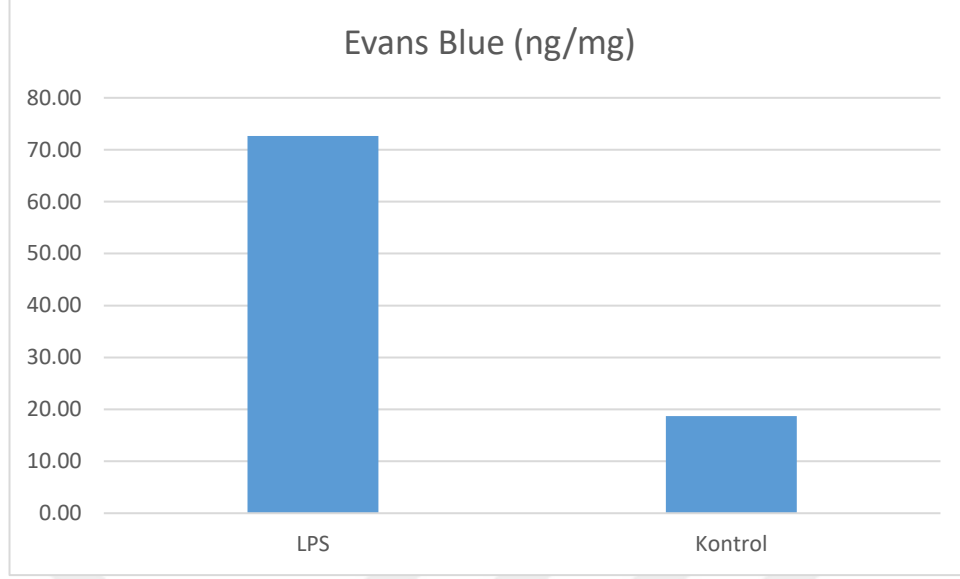
Şekil 8: Evans blue sonrası iç organların görünümü



Şekil 9: Peyer Plakları

4.1.2. Biyokimyasal bulgular

Ön deney çalışmasında KBB geçirgenliği Evans blue boyasının hipokampus ve prefrontal kortekste ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. LPS verilmesinden 6 saat sonrasında LPS grubundaki deney hayvanlarının hipokampus ve prefrontal korteksinden elde edilen homojenatta ölçülen Evans blue boyasının düzeyi ortalama $72,67 \pm 6,05$ ng/mg, kontrol grubundaki deney hayvanlarında ölçülen Evans blue boyasının düzeyi $18,7 \pm 1,82$ ng/mg olarak ölçülmüştür (Şekil 10). Bu sonuçlarla deney hayvanlarına 5 mg/kg LPS'nin i.p olarak verilmesinden 6 saat sonrasında KBB'nin bozulduğu anlaşılmış ve bu veriler ışığında sepsis deney modeli oluşturulmuştur.



Şekil 10: Evans Blue Düzeyleri (Hipokampus+Prefrontal Korteks)

4.2 Deney modelinde polifenollerin etkinliğinin değerlendirilmesi

4.2.1 Gözlemsel bulgular

Deneyde LPS verilmesinden sonra tüm deney hayvanları 6 saat boyunca *rat grimace scale* ile değerlendirilmiş ve deneyin başlangıcı ve 6. saatteki skorlar tablo 7, tablo 8, tablo 9 ve tablo10'da gösterilmiştir. Deneyin 6. saatinde LPS grubundaki deney hayvanlarının belirgin şekilde letarjik, çevresel uyaranlara tepkilerinin azalmış ve tüyelerinin bakımsız olduğu gözlenmiştir (Şekil 11). Deneyin 6. saatinde; kombinasyon grubunun 1 numaralı deney hayvanı dışında kurkumin, kuersetin ve kombinasyon grubundaki deney hayvanlarının hareketli, çevresel uyaranlara duyarlı ve tüyelerinin bakımlı olduğu gözlenmiştir (Şekil 12, Şekil 13 ve Şekil 14). Kombinasyon grubundaki 1 numaralı deney hayvanın çevresel uyaranlara tepkili olduğu ancak hareketliliğinde azalma olduğu gözlenmiştir.

Tablo 7: LPS Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

LPS Grubu	Orbital Daralma	Burun Düzleşmesi	Kulakların Açılması	Bıyıkların Dikleşmesi
1.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
1.Hayvan (6. Saat)	2	1	2	2
2.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
2.Hayvan (6. Saat)	2	1	2	2
3.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
3.Hayvan (6. Saat)	2	1	2	2
4.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
4.Hayvan (6. Saat)	2	1	2	2
5.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
5.Hayvan (6. Saat)	2	1	2	2
6.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
6.Hayvan (6. Saat)	2	1	2	2

Tablo 8: Kurkumin Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

Kurkumin Grubu	Orbital Daralma	Burun Düzleşmesi	Kulakların Açılması	Bıyıkların Dikleşmesi
1.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
1.Hayvan (6. Saat)	0	0	0	1
2.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
2.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1
3.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
3.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	2
4.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
4.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1
5.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
5.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1
6.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
6.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1



Şekil 11: LPS Grubu

Tablo 9: Kuersetin Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

Kuersetin Grubu	Orbital Daralma	Burun Düzleşmesi	Kulakların Açılması	Bıyıkların Dikleşmesi
1.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
1.Hayvan (6. Saat)	1	0	1	2
2.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
2.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1
3.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
3.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1
4.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
4.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1
5.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
5.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1
6.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
6.Hayvan (6. Saat)	0	0	1	1

Tablo 10: Kombinasyon Grubundaki Deney Hayvanlarının Skorlanması

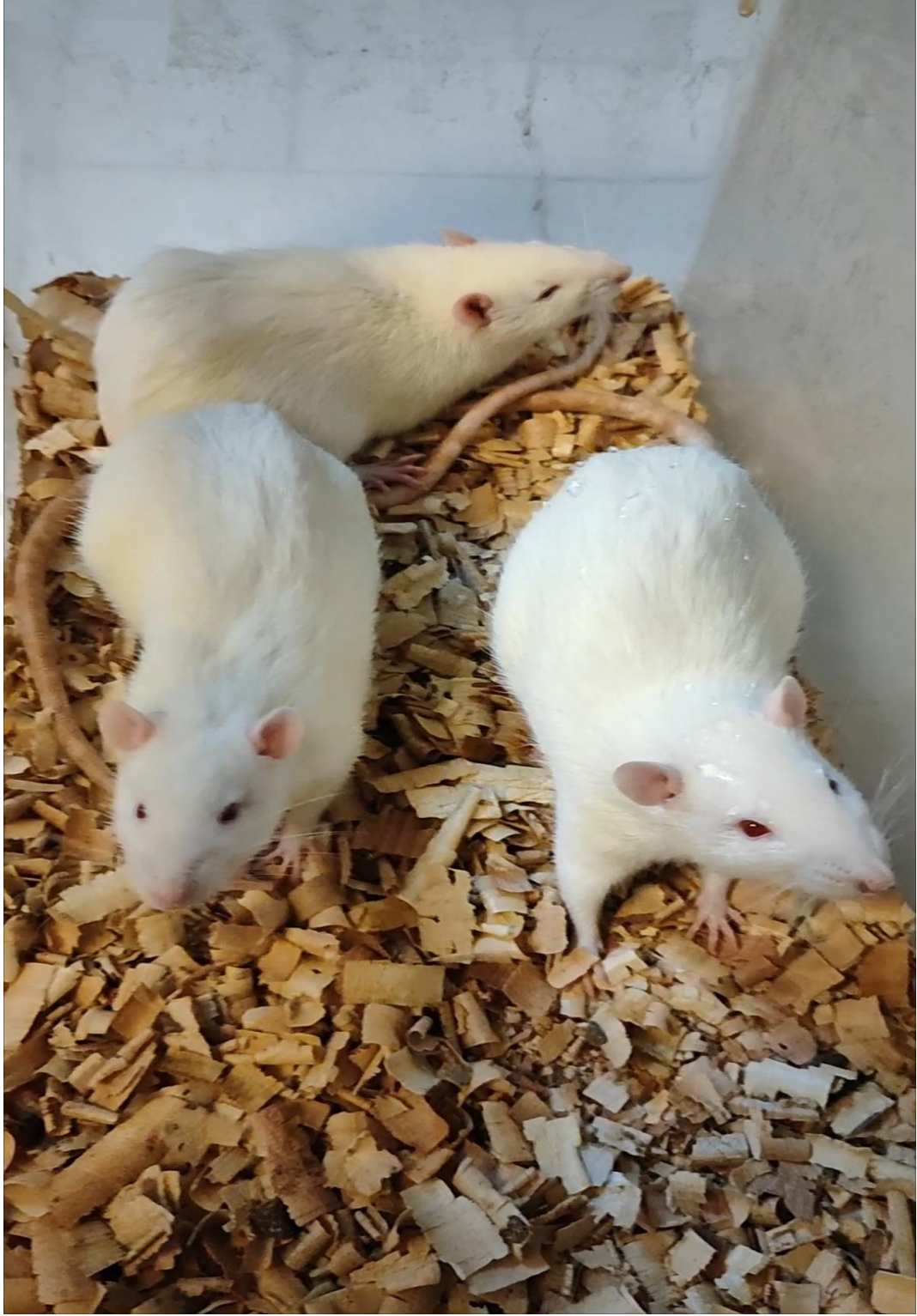
Kombinasyon Grubu	Orbital Daralma	Burun Düzleşmesi	Kulakların Açılması	Bıyıkların Dikleşmesi
1.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
1.Hayvan (6. Saat)	2	1	1	1
2.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
2.Hayvan (6. Saat)	0	0	0	1
3.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
3.Hayvan (6. Saat)	0	0	0	1
4.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
4.Hayvan (6. Saat)	0	0	0	1
5.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
5.Hayvan (6. Saat)	0	0	0	1
6.Hayvan (0. Saat)	0	0	0	0
6.Hayvan (6. Saat)	0	0	0	1



Şekil 12: Kurkumin Grubu



Şekil 13: Kuersetin grubu



Şekil 14: Kombinasyon grubu

4.2.2 Biyokimyasal Bulgular

4.2.2.1 ZO-1 Sonuçları

Gruplardaki ZO-1 düzeyleri tablo 11’de gösterilmiştir. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, LPS grubunda ZO-1 düzeyi, taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı (<0,001). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan gruplarının ZO-1 düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (p değerleri tabloda verilmiştir). Buna karşın, kurkumin, kuersetin ve kombinasyon gruplarının ZO-1 düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 11: ZO-1'in deney grupları arası karşılaştırılması

Grup	mean	SD	p total-F	Post-Hoc grup	p (Post Hoc Bonferoni Testi)
LPS	179,6	20,6	<0,001	LPS-Taşıyıcı kontrol	<0,001
				LPS-Kurkumin	0,011
Taşıyıcı kontrol	328,5	37,9	<0,001	LPS-Kuersetin	0,013
				LPS-Kombinasyon	0,020
Kurkumin	238,0	34,3	<0,001	Taşıyıcı kontrol-Kurkumin	0,001
Kuersetin	238,2	34,9	<0,001	Taşıyıcı kontrol-Kuersetin	0,001
				Taşıyıcı kontrol-Kombinasyon	<0,001
Kombinasyon	233,7	42,1	<0,001	Kurkumin-Kuersetin	1,000
				Kurkumin-Kombinasyon	1,000
				Kuersetin-Kombinasyon	1,000

4.2.2.2 Claudin-5 Sonuçları

Gruplardaki Claudin-5 düzeyleri tablo-12'de gösterilmiştir. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, LPS grubundaki claudin-5 düzeyi taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük ölçüldü ($<0,001$). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan grupların claudin-5 düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (p değerleri tabloda verilmiştir). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon gruplarının Claudin-5 düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 12: Claudin-5'in deney grupları arası karşılaştırılması

Grup	mean	SD	p total-F	Post-Hoc grup	p (Post Hoc Bonferoni Testi)
LPS	208,0	16,2		LPS- Taşıyıcı kontrol	$<0,001$
				LPS-Kurkumin	$<0,001$
Taşıyıcı kontrol	349,6	27,3		LPS-Kuersetin	$<0,001$
				LPS-Kombinasyon	$<0,001$
Kurkumin	284,2	19,9	$<0,001$	Taşıyıcı kontrol -Kurkumin	0,001
				Taşıyıcı kontrol -Kuersetin	$<0,001$
Kuersetin	278,8	23,4		Taşıyıcı kontrol -Kombinasyon	$<0,001$
				Kurkumin-Kuersetin	1,000
Kombinasyon	278,8	32,9		Kurkumin-Kombinasyon	1,000
				Kuersetin-Kombinasyon	1,000

4.2.2.3 TNF- α Sonuçları

Gruplardaki TNF- α düzeyleri tablo-13'te gösterilmiştir. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, LPS grubundaki TNF- α düzeyi taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek ölçüldü ($<0,001$). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan grupların TNF- α düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı (p değerleri tabloda verilmiştir). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon gruplarının TNF- α düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 13: TNF- α 'nın deney grupları arası karşılaştırılması

Grup	mean	SD	p total-F	Post-Hoc grup	p (Post Hoc Bonferoni Testi)
LPS	130,6	11,9		LPS- Taşıyıcı kontrol	$<0,001$
				LPS-Kurkumin	$<0,001$
Taşıyıcı kontrol	49,9	6,2		LPS-Kuersetin	$<0,001$
				LPS-Kombinasyon	$<0,001$
Kurkumin	93,5	9,3	$<0,001$	Taşıyıcı kontrol -Kurkumin	$<0,001$
				Taşıyıcı kontrol -Kuersetin	$<0,001$
Kuersetin	95,7	12,9		Taşıyıcı kontrol - Kombinasyon	$<0,001$
				Kurkumin-Kuersetin	1,000
Kombinasyon	90,4	7,6		Kurkumin-Kombinasyon	1,000
				Kuersetin-Kombinasyon	1,000

4.2.2.4 IL-1 β Sonuçları

Gruplardaki IL-1 β düzeyleri tablo-14'te gösterilmiştir. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, LPS grubundaki IL-1 β düzeyi taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek ölçüldü (<0,001). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan grupların IL-1 β düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı (p değerleri tabloda verilmiştir). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon gruplarının IL-1 β düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 14: IL1 β 'nın deney grupları arası karşılaştırılması

Grup	mean	SD	p total-F	Post-Hoc grup	p (Post Hoc Bonferoni Testi)
LPS	247,3	10,7	<0,001	LPS- Taşıyıcı kontrol	<0,001
				LPS-Kurkumin	<0,001
Taşıyıcı kontrol	69,5	3,8	<0,001	LPS-Kuersetin	<0,001
				LPS-Kombinasyon	<0,001
Kurkumin	176,5	6,5	<0,001	Taşıyıcı kontrol -Kurkumin	<0,001
				Taşıyıcı kontrol -Kuersetin	<0,001
Kuersetin	186,7	5,9	<0,001	Taşıyıcı kontrol - Kombinasyon	<0,001
				Kurkumin-Kuersetin	0,187
Kombinasyon	178,5	6,2	<0,001	Kurkumin-Kombinasyon	1,000
				Kuersetin-Kombinasyon	0,544

4.2.2.5 NF-κB Sonuçları

Gruplardaki NF-κB düzeyleri tablo-15'te gösterilmiştir. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, LPS grubundaki NF-κB düzeyi taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek ölçüldü (<0,001). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan grupların NF-κB düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı (p değerleri tabloda verilmiştir). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon gruplarının NF-κB düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 15: NF-κB'nin deney grupları arası karşılaştırılması

Grup	mean	SD	p total-F	Post-Hoc grup	p (Post Hoc Bonferoni Testi)
LPS	558,4	32,7		LPS- Taşıyıcı kontrol	<0,001
				LPS-Kurkumin	<0,001
Taşıyıcı kontrol	173,1	19,0		LPS-Kuersetin	<0,001
				LPS-Kombinasyon	<0,001
Kurkumin	414,3	18,6	<0,001	Taşıyıcı kontrol -Kurkumin	<0,001
				Taşıyıcı kontrol -Kuersetin	<0,001
Kuersetin	408,7	12,7		Taşıyıcı kontrol - Kombinasyon	<0,001
				Kurkumin-Kuersetin	1,000
Kombinasyon	401,3	9,5		Kurkumin-Kombinasyon	1,000
				Kuersetin-Kombinasyon	1,000

4.2.2.6 NLRP-3 Sonuçları

Gruplardaki NLRP-3 düzeyleri tablo-16’da gösterilmiştir. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, LPS grubundaki NLRP-3 düzeyi taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek ölçüldü ($<0,001$). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon uygulanan grupların NLRP-3 düzeyleri ise LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı (p değerleri tabloda verilmiştir). Kurkumin, kuersetin ve kombinasyon gruplarının NLRP-3 düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 16: NLRP-3'ün deney grupları arası karşılaştırılması

Grup	mean	SD	p total-F	Post-Hoc grup	p (Post Hoc Bonferoni Testi)
LPS	13,2	2,5		LPS- Taşıyıcı kontrol	$<0,001$
				LPS-Kurkumin	0,017
Taşıyıcı kontrol	7,8	1,0		LPS-Kuersetin	0,032
				LPS-Kombinasyon	0,007
Kurkumin	9,8	1,3	$<0,001$	Taşıyıcı kontrol -Kurkumin	0,548
				Taşıyıcı kontrol -Kuersetin	0,319
Kuersetin	10,0	1,7		Taşıyıcı kontrol - Kombinasyon	1,000
				Kurkumin-Kuersetin	1,000
Kombinasyon	9,4	1,7		Kurkumin-Kombinasyon	1,000
				Kuersetin-Kombinasyon	1,000

5. TARTIŞMA

Sepsis yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardaki ölüm nedenleri arasında önemli orana sahip bir hastalıktır. Dünya üzerindeki insidansı sürekli artan sepsis morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır (116). Organ disfonksiyonu sepsiste gerçekleşen en önemli komplikasyonlardandır. Özellikle beynin etkilenmesi sepsiste yaygın olarak ortaya çıkan bir komplikasyondur ve sonuç olarak sepsis ilişkili ensefalopati gelişmektedir. Sepsis ilişki ensefalopatide klinik, konfüzyondan komaya kadar uzanmaktadır (24). Sepsis tedavisi temel olarak hemodinamik dengenin korunması, enfeksiyonun kontrolü ve konağın immün yanıtının düzenlenmesini kapsamaktadır (117). Özellikle konağın immün yanıtının düzenlenmesi sepsis tedavisinde güncel araştırma konularından bir tanesidir. Bu amaçla polifenollerin sepsis üzerindeki etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve bu polifenollerden olan kurkumin ve kuersetin sepsis üzerinde olumlu etkileri ile öne çıkan polifenoller olmuştur (118–123).

Polifenoller arasında; kurkumin ve kuersetin, antioksidan ve immünmodülatör özelliklere sahip olan ve sepsis tedavisi açısından umut vaat eden polifenoller olarak öne çıkmaktadırlar. Sepsis ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisinde NF- κ B sinyal yolağı, reaktif oksijen türlerindeki artış, proinflamatuvar sitokinlerdeki artış ve NLRP-3 inflamazomu önemli bir yer tutmaktadır. Hem kurkumin hem de kuersetinin sepsis patofizyolojisinde etkili olan bu sinyal yolları üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip oldukları bilinmektedir (99,124). Bu iki polifenol kombinasyonunun antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, bu iki polifenol kombinasyonunun sepsis ilişkili ensefalopati üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma literatürde mevcut değildir (125). Bu çalışmada kullanılan polifenollerin farklı yollar üzerinde farklı düzeylerde etkiye sahip olabileceği düşünülerek iki polifenolün kombine edilmesi ile daha güçlü sinerjik bir etki oluşabileceği hipotezlenmiştir.

Araştırmamızda sepsis deney modelini oluşturulmak amacı ile LPS uygulaması tercih edilmiştir. Deneysel sepsis modelleri peritonit modelleri ve toksin modelleri şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. Çekal ligasyon ve perforasyon peritonit oluşturulan modeller arasında, LPS uygulaması ise toksin ile oluşturulan modeller arasında ön plana çıkmaktadır. Cerrahi bir model olan ÇLP modelinde sepsis oluşumu, bağırsakta

oluşturulan perforasyon sonucunda dışkının dışarı çıkararak peritonit oluşturmaya dayanmaktadır. Bu yönüyle ÇLP insanda oluşan sepsise en benzer sepsisi oluşturan model olmasına rağmen, bu modelin birçok dezavantajı da bulunmaktadır. Cerrahi bir model olması nedeniyle uygulayan kişiye bağlı değişkenlikler ve standardizasyonun sağlanmasındaki zorluklar en öne çıkan dezavantajlar arasında yer almaktadır. Ayrıca bu modelde bağırsaktan sızan dışkı ve buna bağlı olarak bakteri miktarının ayarlanmasındaki zorluk, oluşturulan deney modelindeki sepsis şiddetini ayarlamakta güçlük oluşturmaktadır. Bunun dışında cerrahi modelin oluşturulmasındaki başarısızlık ve sonuç olarak sepsisin tetiklenememesi de bu modelin zayıf yönleri arasında yer almaktadır. LPS modeli ise polimikrobiyal bir sepsis oluşturmadiğinden insanda gelişen sepsisi tam olarak yansıtamamasına rağmen, uygulayana bağlı farklılıklardan etkilenmemesi sayesinde daha kontrollü ve daha iyi standardize edilmiş bir model olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanı sıra LPS modelinde doz ayarlaması sayesinde oluşturulan sepsisin şiddeti ayarlanabilmektedir. Tüm bu avantajlarından dolayı çalışmamızda LPS ile sepsis modeli oluşturulması tercih edilmiştir (126). Yapılan çalışmalarda 5 mg/kg LPS (i.p) verilen ve 6 saat sonra sakrifiye edilen Wistar albino sıçanlarda beyin dokusunda inflamatuvar belirteçlerin yükseldiği ve nöroinflamasyonun tetiklendiği gösterilmiştir (112,113). Bu nedenle yaptığımız çalışmada da bu doz ve süre sepsis modelinin oluşturulması amacıyla seçilmiştir.

Kan beyin bariyerindeki bozulma sepsis ilişkili ensefalopatinin patofizyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. KBB'nin yapısındaki bozulma beyin nörotoksik maddelere doğrudan maruziyetine yol açmakta ve proinflamatuvar sitokin sentezleyen hücreleri uyarmaktadır. Tüm bu olayların sonucunda nöroinflamatuvar yollar aktive olarak sepsis ilişkili ensefalopati gelişmesine neden olmaktadır (24). KBB geçirgenliğini değerlendirmek amacıyla birçok yöntem kullanılmasına rağmen yüksek molekül ağırlığı nedeniyle sağlam bir KBB'yi geçemeyen Evans blue boyası ile KBB geçirgenliğinin değerlendirilmesi en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır (109). Bu nedenle yaptığımız çalışmada, sepsis modelinin doğrulanması için Evans blue boyası ile KBB geçirgenliğinin ölçülmesi kullanıldı. LPS grubundaki hayvanların beyin dokularında ölçülen Evans blue

düzeylerinin kontrol grubundan yüksek saptanması sonucunda oluşturulan sepsis modeli doğrulanmış oldu ve deneyin ikinci kısmına bu modelle devam edildi.

Deney hayvanlarına intraperitoneal yoldan LPS verilmesi ile oluşturulan sepsis modelinde, LPS uygulanmasından 24 saat önce ve 1 saat önce kurkuminin tek başına, kuersetinin tek başına ve kurkumin ile kuersetinin birlikte uygulanmasının sepsis ilişkili ensefalopati üzerindeki etkileri inflamasyon belirteçleri ve kan-beyin bariyeri proteinlerinin düzeyleri ile değerlendirildi. Oral kullanımda düşük biyoyararlanıma sahip olması nedeniyle kurkuminin ve kuersetinin i.p yoldan verilmesi tercih edilmiştir (127,128).

Kumari ve ark. 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada LPS (10 mg/kg, i.p) ile sepsis modeli oluşturulan deney hayvanlarında, LPS verilmesinden 1 saat önce 20 mg/kg dozunda verilen kurkuminin (i.p) mortaliteyi ve serum TNF- α düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (129). Lu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise LPS (5 mg/kg, i.p) ile sepsis modeli oluşturulan deney hayvanlarında LPS ile eş zamanlı verilen 20 mg/kg kurkuminin sepsis ilişkili vazokonstriksiyon ve E-selektin düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur (110). Literatürdeki çalışmalar referans alınarak; yaptığımız çalışmada kullanılan kurkumin dozu, kurkumin grubu için 50 mg/kg ve kombinasyon grubu için 25 mg/kg olarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda kurkuminin LPS uygulanmasından 1 saat önce etkili olduğu gösterildiği için çalışmada kurkumin verilme zamanlarından birisi olarak bu saat tercih edilmiştir. Ayrıca kurkuminin daha uzun vadeli etkilerinden de faydalanmak amacıyla LPS uygulanmasında 24 saat öncesinde de kurkumin uygulaması yapılmıştır.

Chang ve ark. tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada LPS (10 mg/kg, i.p) ile sepsisin tetiklendiği deney hayvanlarına i.p olarak uygulanan 50 mg/kg ve 100 mg/kg kuersetinin proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve TNF- α düzeylerinde düşüşe neden olduğu ortaya konulmuştur (101). Tang ve ark. tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada yine aynı şekilde 10 mg/kg LPS (i.p) ile sepsis tetiklenen deney hayvanlarında 50 mg/kg ve 100 mg/kg kuersetinin(i.p) TNF- α düzeylerinde ve mortalite oranlarında düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (111). Literatürdeki çalışmalar referans alınarak; yaptığımız çalışmada da kullanılan kuersetin dozu, kuersetin grubu için 100 mg/kg ve kombinasyon grubu için 50 mg/kg olarak belirlendi.

Lipopolisakkarid uygulaması ile hücre yüzeyinde bulunan TLR-4 etkileşimi sonucunda çok basamaklı bir sinyal yolağı aktive olmaktadır. Bunun sonucunda NF- κ B aktive olarak nükleusa geçmekte, NLRP3 inflamazomunun oluşumunu ve proinflamatuvar sitokin sentezini uyarmaktadır (130). Bu nedenle NF- κ B, TNF- α , IL-1 β ve NLRP-3 sepsiste gelişen inflamasyonu değerlendirmek amacıyla birçok çalışmada belirteç olarak kullanılmıştır (131–133). Kan-beyin bariyeri beyin homeostazisini sağlayan önemli bir yapıdır. Kan-beyin bariyerindeki bozulma sepsis ilişkili ensefalopatinin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır (134). Sıkı bağlantılar, bağırsak ve beyin gibi organlarda bulunan ve dokular arasında bariyer oluşturan yapılardır. Kan beyin bariyerinin yapısında bulunan sıkı bağlantılar temel olarak okludin, claudinler gibi transmembran proteinler, zonula okludens proteinleri ve hücre iskeleti proteinlerinden oluşmaktadır. Claudin-5 proteini kan beyin bariyerinin bütünlüğünden ve hücreler arası geçirgenlikten sorumluyken, ZO-1 proteinleri ise sıkı bağlantıların düzenlenmesi ve sinyal iletiminde görev almaktadır. Bu proteinlerin beyin dokusundaki düzeylerinin kan beyin bariyerinin geçirgenliğiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (135). Bu bilgiler temel alınarak çalışmamızda beyin dokusundaki nöroinflamasyon NF- κ B, TNF- α , IL-1 β ve NLRP-3 ölçümleri ile, kan-beyin bariyerindeki bozulma ise ZO-1 ve Claudin-5 ölçümleri ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde LPS grubunda, taşıyıcı kontrol grubuna kıyasla ZO-1 ve claudin-5 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük; TNF- α , IL-1 β , NF- κ B ve NLRP-3 düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olarak ölçüldü ve bu durum bize oluşturduğumuz deney modelinde 5 mg/kg LPS verilmesi sonucunda kan-beyin bariyerinin bozulduğunu ve nöroinflamasyonun tetiklendiğini göstermiş oldu. Sonuçlar polifenoller açısından değerlendirildiğinde ise kan beyin bariyeri proteinlerinden olan Claudin-5 ve ZO-1 düzeyleri; kurkumin, kuersetin ve kombinasyon grubunda LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek saptandı. Nöroinflamasyon belirteçlerinden olan TNF- α , IL-1 β , NF- κ B ve NLRP-3 düzeylerinin ise; kurkumin, kuersetin ve kombinasyon grubunda LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğunu tespit ettik. Bu durum bize kurkumin ile kuersetinin tek başlarına ve kombine uygulanmasının LPS ile tetiklenen SİE' de tedavi edici ya da önleyici bir etkisinin olduğunu göstermiş oldu. Ancak kurkumin ve kuersetin

kombinasyonunun, bu iki polifenolün tek başına verilmesine kıyasla nöroinflamasyon üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığı saptandı.

Antinflatuar etkilere sahip olan kurkuminin nöroinflamasyonu azaltığını çeşitli yollar ve belirteçler üzerinden gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur. Öz ve Erdal'ın 2024 yılında yaptığı bir çalışmada LPS ile indüklenen sepsis ilişkili nöroinflamasyon modeli oluşturulan farelerde, kurkumin verilen gruptaki farelerin beyin dokusunda ölçülen TNF- α düzeyinin LPS grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde düşük olduğu bildirilmiştir (136). Hooshmand ve Asoodeh'in 2024 yılında yaptığı bir başka çalışmada LPS ile inflamasyonun indüklendiği mikroglia hücrelerinde TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin, kurkumin uygulanmasıyla azaldığı ortaya konulmuştur (137). Kurkumin nöroinflamasyonu baskılayıcı bu etkisini birden çok yolk ve moleküler yapı üzerinden göstermektedir. Bu moleküler yapılar arasında NF- κ B ve proinflamatuvar sitokinler önemli bir yer tutmaktadır. Bu konuda 2021 yılında yapılan bir çalışmada, iskemik inme modeli oluşturulan sıçanlarda intraperitoneal yoldan verilen kurkuminin, sepsis patofizyolojisinde de etkili olan NF- κ B p65 ve kan-beyin bariyerine zarar veren MMP-9 düzeylerini düşürdüğü ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada ayrıca kurkumin verilen deney hayvanlarında ZO-1 ile Claudin-5 düzeylerinin ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin korunduğu ortaya konulmuştur (71). Wu ve ark. tarafından 2021 yılında yapılan bir çalışmada ise arsenik trioksit tarafından nörotoksitite tetiklenen deney hayvanlarına kurkumin tedavisi uygulanmıştır. Bu çalışmada kurkumin uygulanmasının beyin dokusunda NF- κ B ve proinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 düzeylerinde bir düşüşe neden olduğu gösterilmiş, ayrıca kurkuminin beyin dokusundaki ZO-1 düzeylerini koruduğu da ortaya konulmuştur (138). Bir inflamazom molekülü olan ve piropitozis ilişkili olan NLRP-3 molekülü, kurkuminin nöroinflamasyonun azaltılması amacıyla etki ettiği moleküllerden bir diğeri olarak karşımıza çıkmaktadır. Gan ve ark. tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışmada nörotoksitite ve nöroinflamasyon tetiklenen deney hayvanlarına kurkumin tedavisi verilmiştir. Bu çalışmada da kurkuminin deney hayvanlarının beyin dokusunda hem NF- κ B düzeylerinde hem de piropitozis ilişkili moleküler yapılardan olan NLRP-3, IL-1 β ve IL-18 düzeylerinde bir düşüşe neden olduğu ortaya konulmuştur (139). Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, kurkuminin, nöroinflamasyon ile ilişkili moleküler yapılar ve KBB'deki

sıkı bağlantı proteinleri üzerindeki etkileri ile ilgili verilerin bizim çalışmamızda bulunduğumuz sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Flavanoid ailesine ait olan kuersetin, nöroinflamasyonu azaltıcı ve kan beyin bariyerinin bozulmasını önleyici etkilere sahiptir ve bu etkileri birçok farklı yolla ve moleküler yapı üzerinden yerine getirmektedir. Bu moleküler yapılar arasında NF- κ B, proinflamatuvar sitokinler ve NLRP-3 önemli bir yer tutmaktadır (140). Yang ve ark. 2024 yılında yaptığı bir çalışmada çekal ligasyon ile sepsis ilişkili ensefalopati tetiklenen deney hayvanlarında kuersetinin proinflamatuvar sitokin düzeylerini ve mikroglyal aktivasyonu azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada LPS ile nöroinflamasyon modeli oluşturulan mikroglyal hücrelerinde kurkuminin NF- κ B ve NLRP-3 düzeylerini azalttığı da ortaya konulmuştur (141). Lee ve ark. 2020 yılında yaptığı bir başka çalışmada lateral ventrikül içerisine LPS uygulanarak nöroinflamasyon oluşturulan deney hayvanlarında kuersetin uygulanmasının, proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-6 ve IL-1 β , ayrıca NF- κ B'nin beyin dokusunda ölçülen düzeylerini anlamlı bir şekilde düşürdüğü ortaya konulmuştur (142).

Kuersetin nöroinflamatuvar yolla üzerindeki etkilerinin yanısıra, kan beyin bariyerinde bulunan sıkı bağlantı proteinleri üzerinde de koruyucu etkilere sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Jin ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada serebral iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan deney hayvanlarına kuersetin uygulanmasının Claudin-5 ve ZO-1 düzeylerini düşürdüğü ve kan beyin bariyeri geçirgenliği azalttığı ortaya konulmuştur (143). Ayrıca nörotoksitite modeli oluşturulan deney hayvanlarında 2013 ve 2022 yıllarında yapılan iki çalışmada kuersetin uygulanmasının, claudin-5 ve ZO-1 proteinlerinin beyin dokusundaki miktarlarının azalmasını engellediği ortaya konulmuştur (144,145). Kuersetinin nöroinflamasyon ve sepsis ilişkili ensefalopati üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalarda elde edilen sonuçlar, nöroinflamasyon belirteçleri ve kan beyin bariyeri proteinlerinin düzeyleri açısından bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile 5 mg/kg LPS'nin i.p olarak verilmesi ile oluşturulan sepsis modelinde, kurkumin ve kuersetin polifenol kombinasyonunun LPS uygulanmasından 24 saat ve 1 saat önce verilmesi ile LPS ile indüklenen inflamatuvar

yanıt ve KBB bozulmasının anlamlı düzeyde önlenebileceğini ancak polifenollerin tek başlarına ve kombinasyon olarak verilmeleri arasında beyindeki inflamatuvar belirteçler ve KBB'deki sıkı bağlantı proteinlerinin düzeyleri açısından anlamlı bir fark oluşmadığı saptanmıştır. Literatürde kurkumin ve kuersetin kombinasyonun sepsis üzerindeki etkilerini değerlendiren başka çalışma olmadığı için kombinasyon ile ilgili verileri karşılaştırma olanağımız bulunmamaktadır. Ancak, hipotetik olarak sinerjik ve daha güçlü bir etki oluşturmasını düşündüğümüz kombinasyon dozunun ve verilme sürelerinin değiştirilmesi ile yapılacak yeni çalışmalarda farklı sonuçların elde edilebileceğini düşünmekteyiz. Araştırmamızın önemli kısıtlılıkları arasında farklı doz ve sürelerin denenememesi yer almasına karşın, bu alanda gelecekte yapılacak araştırmalar için elde edilen verilerin bir temel oluşturacağını öngörmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada LPS verilerek sepsis modeli oluşturulan deney hayvanlarında kurkumin, kuersetin ve kurkumin-kuersetin kombinasyon uygulanmalarının beyindeki inflamasyonu azalttığı ve sıkı bağlantı proteinlerini koruduğu ortaya konulmuştur.
2. Çalışmada kurkumin ve kuersetin kombinasyonunun sepsis ilişkili ensefalopati nedeni beyin dokusunda gelişen inflamasyonu baskılamadaki etkinliği, bu iki polifenolün tek başlarına kullanılmalarıyla kıyaslandığında arada anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.
3. Çalışmanın önemli kısıtlılıkları arasında farklı kombinasyon dozlarının ve uygulama zamanlarının denenememesi yer almaktadır.
4. Gelecekte yapılacak çalışmalarda farklı kombinasyon dozları ve uygulama zamanları denerek farklı sonuçların elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR

1. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3;377(5):414–7.
2. Chung HY, Wickel J, Brunkhorst FM, Geis C. Sepsis-Associated Encephalopathy: From Delirium to Dementia? *J Clin Med*. 2020 Mar 5;9(3):703.
3. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul;39(5):517–28.
4. Vincent JL. Current sepsis therapeutics. *EBioMedicine*. 2022 Dec;86:104318.
5. Karimi A, Ghodsi R, Kooshki F, Karimi M, Asghariazar V, Tarighat-Esfanjani A. Therapeutic effects of curcumin on sepsis and mechanisms of action: A systematic review of preclinical studies. *Phytother Res PTR*. 2019 Nov;33(11):2798–820.
6. Karimi A, Naeini F, Asghari Azar V, Hasanzadeh M, Ostadrahimi A, Niazkar HR, et al. A comprehensive systematic review of the therapeutic effects and mechanisms of action of quercetin in sepsis. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. 2021 Jun;86:153567.
7. Vachharajani V, Wang SW, Mishra N, El Gazzar M, Yoza B, Mccall C. Curcumin Modulates Leukocyte and Platelet Adhesion in Murine Sepsis. *Microcirculation*. 2010;17(6):407–16.
8. Lee JK, Kwak HJ, Piao MS, Jang JW, Kim SH, Kim HS. Quercetin reduces the elevated matrix metalloproteinases-9 level and improves functional outcome after cerebral focal ischemia in rats. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011 Jun;153(6):1321–1329.
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
10. Catarina AV, Branchini G, Bettoni L, De Oliveira JR, Nunes FB. Sepsis-Associated Encephalopathy: from Pathophysiology to Progress in Experimental Studies. *Mol Neurobiol*. 2021 Jun;58(6):2770–9.
11. Nedeva C, Menassa J, Puthalakath H. Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:108.
12. Cossart YE. The rise and fall of infectious diseases: Australian perspectives, 1914-2014. *Med J Aust*. 2014 Jul 7;201(1 Suppl):S11-14.
13. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of

Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Feb 1;193(3):259–72.

14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992 Jun;101(6):1644–55.
15. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996 Jul;22(7):707–10.
16. Widmann CN, Heneka MT. Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol.* 2014 Jun;13(6):630–6.
17. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:28.
18. Michelon C, Michels M, Abatti M, Vieira A, Borges H, Dominguni D, et al. The Role of Secretase Pathway in Long-term Brain Inflammation and Cognitive Impairment in an Animal Model of Severe Sepsis. *Mol Neurobiol.* 2020 Feb;57(2):1159–69.
19. Sonnevile R, de Montmollin E, Poujade J, Garrouste-Orgeas M, Souweine B, Darmon M, et al. Potentially modifiable factors contributing to sepsis-associated encephalopathy. *Intensive Care Med.* 2017 Aug;43(8):1075–84.
20. Fritze T, Doblhammer G, Widmann CN, Heneka MT. Time course of dementia following sepsis in German health claims data. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2021 Jan;8(1):e911.
21. Manabe T, Heneka MT. Cerebral dysfunctions caused by sepsis during ageing. *Nat Rev Immunol.* 2022 Jul;22(7):444–58.
22. Gao Q, Hernandez MS. Sepsis-Associated Encephalopathy and Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Inflammation.* 2021 Dec;44(6):2143–50.
23. Gu M, Mei XL, Zhao YN. Sepsis and Cerebral Dysfunction: BBB Damage, Neuroinflammation, Oxidative Stress, Apoptosis and Autophagy as Key Mediators and the Potential Therapeutic Approaches. *Neurotox Res.* 2021 Apr;39(2):489–503.
24. Pan S, Lv Z, Wang R, Shu H, Yuan S, Yu Y, et al. Sepsis-Induced Brain Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Aug 24;2022:1328729.

25. Yang K, Chen J, Wang T, Zhang Y. Pathogenesis of sepsis-associated encephalopathy: more than blood-brain barrier dysfunction. *Mol Biol Rep.* 2022 Oct;49(10):10091–9.
26. Erikson K, Tuominen H, Vakkala M, Liisanantti JH, Karttunen T, Syrjälä H, et al. Brain tight junction protein expression in sepsis in an autopsy series. *Crit Care.* 2020 Jun 29;24:385.
27. Griton M, Dhaya I, Nicolas R, Raffard G, Periot O, Hiba B, et al. Experimental sepsis-associated encephalopathy is accompanied by altered cerebral blood perfusion and water diffusion and related to changes in cyclooxygenase-2 expression and glial cell morphology but not to blood-brain barrier breakdown. *Brain Behav Immun.* 2020 Jan;83:200–13.
28. Willie CK, Tzeng YC, Fisher JA, Ainslie PN. Integrative regulation of human brain blood flow. *J Physiol.* 2014 Mar 1;592(5):841–59.
29. Ferlini L, Su F, Creteur J, Taccone FS, Gaspard N. Cerebral autoregulation and neurovascular coupling are progressively impaired during septic shock: an experimental study. *Intensive Care Med Exp.* 2020 Aug 14;8(1):44.
30. Faraci FM, Taugher RJ, Lynch C, Fan R, Gupta S, Wemmie JA. Acid-Sensing Ion Channels: Novel Mediators of Cerebral Vascular Responses. *Circ Res.* 2019 Oct 25;125(10):907–20.
31. Moraes CA, Zaverucha-do-Valle C, Fleurance R, Sharshar T, Bozza FA, d'Avila JC. Neuroinflammation in Sepsis: Molecular Pathways of Microglia Activation. *Pharm Basel Switz.* 2021 May 1;14(5):416.
32. Mazeraud A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. *Clin Chest Med.* 2016 Jun;37(2):333–45.
33. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, Khoury JE. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018 Oct;21(10):1359–69.
34. Guo F, Tang J, Zhou Z, Dou Y, Van Lonkhuyzen D, Gao C, et al. GEF-H1-RhoA signaling pathway mediates LPS-induced NF- κ B transactivation and IL-8 synthesis in endothelial cells. *Mol Immunol.* 2012 Feb;50(1–2):98–107.
35. Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology.* 2007;212(9–10):715–22.
36. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res.* 2018 Oct 30;11:407–19.
37. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000 Aug;118(2):503–8.
38. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27–37.

39. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2013 Jul;62(7):641–51.
40. Ihnatko R, Kubes M. TNF signaling: early events and phosphorylation. *Gen Physiol Biophys*. 2007 Sep;26(3):159–67.
41. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):149–60.
42. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996 Jan 26;84(2):299–308.
43. Eder J. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Sep;18(9):319–22.
44. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Sep 4;6(10):a016295.
45. Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2627–34.
46. Klein MA, Möller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*. 1997 Mar;19(3):227–33.
47. Guo H, Callaway JB, Ting JPY. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):677–87.
48. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):826–37.
49. Yang X, Chang HY, Baltimore D. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell*. 1998 Jan;1(2):319–25.
50. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137–61.
51. Vanaja SK, Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol*. 2015 May;25(5):308–15.
52. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Jun;1319(1):82–95.
53. Şaker D, Polat S. NLRP3 İnflamazom Aktivasyon ve Düzenleme Mekanizmalarına Genel Bir Bakış. *Arşiv Kaynak Tarama Derg*. 2022 Mar 31;31(1):52–9.

54. Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL. Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol.* 1992 Nov;22(11):2963–71.
55. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 β (IL-1 β) Processing Pathway. *Sci Signal.* 2010 Jan 19;3(105):cm2–cm2.
56. Huang ZB, Sheng GQ. Interleukin-1 β with learning and memory. *Neurosci Bull.* 2010 Dec 1;26(6):455–68.
57. Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalstein Y, Ben-Hur T, et al. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology.* 2007 Sep 1;32(8):1106–15.
58. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011 Feb 1;25(2):181–213.
59. Han Q, Lin Q, Huang P, Chen M, Hu X, Fu H, et al. Microglia-derived IL-1 β contributes to axon development disorders and synaptic deficit through p38-MAPK signal pathway in septic neonatal rats. *J Neuroinflammation.* 2017 Mar 14;14(1):52.
60. Choi EK, Park D, Kim TK, Lee SH, Bae DK, Yang G, et al. Animal Models of Periventricular Leukomalacia. *Lab Anim Res.* 2011 Jun 1;27(2):77–84.
61. Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Oct 1;11(5):343–53.
62. Xie D, Shen F, He S, Chen M, Han Q, Fang M, et al. IL-1 β induces hypomyelination in the periventricular white matter through inhibition of oligodendrocyte progenitor cell maturation via FYN/MEK/ERK signaling pathway in septic neonatal rats. *Glia.* 2016 Apr;64(4):583–602.
63. Michels M, Steckert AV, Quevedo J, Barichello T, Dal-Pizzol F. Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis: from blood-borne leukocytes to glial cells. *Intensive Care Med Exp.* 2015 Oct 29;3:30.
64. Michels M, Danieslki LG, Vieira A, Florentino D, Dall’Igna D, Galant L, et al. CD40-CD40 Ligand Pathway is a Major Component of Acute Neuroinflammation and Contributes to Long-term Cognitive Dysfunction after Sepsis. *Mol Med Camb Mass.* 2015 Mar 26;21(1):219–26.
65. Hasegawa-Ishii S, Inaba M, Umegaki H, Unno K, Wakabayashi K, Shimada A. Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. *Sci Rep.* 2016 May 5;6:25457.

66. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011 Aug 31;477(7362):90–4.
67. Parajuli B, Horiuchi H, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. CCL11 enhances excitotoxic neuronal death by producing reactive oxygen species in microglia. *Glia*. 2015 Dec;63(12):2274–84.
68. Rossaint J, Margraf A, Zarbock A. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:2712.
69. Wu F, Zhao Y, Jiao T, Shi D, Zhu X, Zhang M, et al. CXCR2 is essential for cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2015 May 21;12:98.
70. Ni Y, Teng T, Li R, Simonyi A, Sun GY, Lee JC. TNF α alters occludin and cerebral endothelial permeability: Role of p38MAPK. *PloS One*. 2017;12(2):e0170346.
71. Wu S, Guo T, Qi W, Li Y, Gu J, Liu C, et al. Curcumin ameliorates ischemic stroke injury in rats by protecting the integrity of the blood-brain barrier. *Exp Ther Med*. 2021 Jul;22(1):783.
72. Qi X, Qvit N, Su YC, Mochly-Rosen D. A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J Cell Sci*. 2013 Feb 1;126(Pt 3):789–802.
73. Doll DN, Hu H, Sun J, Lewis SE, Simpkins JW, Ren X. Mitochondrial crisis in cerebrovascular endothelial cells opens the blood-brain barrier. *Stroke*. 2015 Jun;46(6):1681–9.
74. Haileselassie B, Joshi AU, Minhas PS, Mukherjee R, Andreasson KI, Mochly-Rosen D. Mitochondrial dysfunction mediated through dynamin-related protein 1 (Drp1) propagates impairment in blood brain barrier in septic encephalopathy. *J Neuroinflammation*. 2020 Jan 27;17(1):36.
75. Shapiro H, Lev S, Cohen J, Singer P. Polyphenols in the prevention and treatment of sepsis syndromes: rationale and pre-clinical evidence. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 2009 Oct;25(10):981–97.
76. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998 Nov;56(11):317–33.
77. Amić D, Davidović-Amić D, Beslo D, Rastija V, Lucić B, Trinajstić N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem*. 2007;14(7):827–45.
78. Williams CA, Grayer RJ. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep*. 2004 Aug;21(4):539–73.

79. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 2002 Jan;18(1):75–81.
80. Teixeira S, Siquet C, Alves C, Boal I, Marques MP, Borges F, et al. Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free Radic Biol Med*. 2005 Oct 15;39(8):1099–108.
81. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem*. 2001 Jun;49(6):2774–9.
82. Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Sep 1;501(1):23–30.
83. Ding H, Li Y, Chen S, Wen Y, Zhang S, Luo E, et al. Fisetin ameliorates cognitive impairment by activating mitophagy and suppressing neuroinflammation in rats with sepsis-associated encephalopathy. *CNS Neurosci Ther*. 2022 Feb;28(2):247–58.
84. Mohamed AR, Fares NH, Mahmoud YI. Morin Ameliorates Lipopolysaccharides-Induced Sepsis-Associated Encephalopathy and Cognitive Impairment in Albino Mice. *Neurochem Res*. 2024 Nov 16;50(1):14.
85. Karimi A, Ghodsi R, Kooshki F, Karimi M, Asghariazar V, Tarighat-Esfanjani A. Therapeutic effects of curcumin on sepsis and mechanisms of action: A systematic review of preclinical studies. *Phytother Res PTR*. 2019 Nov;33(11):2798–820.
86. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol Adv*. 2014 Nov 1;32(6):1053–64.
87. Hashemian M, Anissian D, Ghasemi-Kasman M, Akbari A, Khalili-Fomeshi M, Ghasemi S, et al. Curcumin-loaded chitosan-alginate-STPP nanoparticles ameliorate memory deficits and reduce glial activation in pentylenetetrazol-induced kindling model of epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Oct 3;79(Pt B):462–71.
88. Pan Z, Zhuang J, Ji C, Cai Z, Liao W, Huang Z. Curcumin inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting VEGF expression. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):4821–6.
89. Zhong W, Qian K, Xiong J, Ma K, Wang A, Zou Y. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- κ B related signaling. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2016 Oct;83:302–13.
90. Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Jul;14(7):417–27.

91. Arshad L, Haque MA, Abbas Bukhari SN, Jantan I. An overview of structure-activity relationship studies of curcumin analogs as antioxidant and anti-inflammatory agents. *Future Med Chem.* 2017 Apr;9(6):605–26.
92. Camacho-Barquero L, Villegas I, Sánchez-Calvo JM, Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Motilva V, et al. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol.* 2007 Mar;7(3):333–42.
93. Xu Y, Liu L. Curcumin alleviates macrophage activation and lung inflammation induced by influenza virus infection through inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Influenza Other Respir Viruses.* 2017 Sep;11(5):457–63.
94. Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. Mechanism of the Anti-inflammatory Effect of Curcumin: PPAR- γ Activation. *PPAR Res.* 2007;2007:89369.
95. Wang Y, Shan X, Dai Y, Jiang L, Chen G, Zhang Y, et al. Curcumin Analog L48H37 Prevents Lipopolysaccharide-Induced TLR4 Signaling Pathway Activation and Sepsis via Targeting MD2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015 Jun;353(3):539–50.
96. Zhang Y, Liu Z, Wu J, Bai B, Chen H, Xiao Z, et al. New MD2 inhibitors derived from curcumin with improved anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem.* 2018 Mar 25;148:291–305.
97. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol.* 2006 Jun 28;72(1):62–9.
98. Zhao M, Wang Y, Yue Y, Zhang R, Wang S, Zhang W, et al. Curcumin alleviates neuronal apoptosis and cerebral mitochondrial dysfunction in septic mice. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(3):6107–13.
99. Wang T, Lv L, Feng H, Gu W. Unlocking the Potential: Quercetin and Its Natural Derivatives as Promising Therapeutics for Sepsis. *Biomedicines.* 2024 Feb 16;12(2):444.
100. Ma ZX, Zhang RY, Rui WJ, Wang ZQ, Feng X. Quercetin alleviates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors by promoting adult hippocampal neurogenesis via FoxG1/CREB/ BDNF signaling pathway. *Behav Brain Res.* 2021 May 21;406:113245.
101. Chang YC, Tsai MH, Sheu WHH, Hsieh SC, Chiang AN. The Therapeutic Potential and Mechanisms of Action of Quercetin in Relation to Lipopolysaccharide-Induced Sepsis In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE.* 2013 Nov 19;8(11):e80744.
102. Bhaskar S, Helen A. Quercetin modulates toll-like receptor-mediated protein kinase signaling pathways in oxLDL-challenged human PBMCs and regulates TLR-activated atherosclerotic inflammation in hypercholesterolemic rats. *Mol Cell Biochem.* 2016 Dec 1;423(1):53–65.

103. Angeloni C, Hrelia S. Quercetin Reduces Inflammatory Responses in LPS-Stimulated Cardiomyoblasts. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:837104.
104. Khan A, Ali T, Rehman SU, Khan MS, Alam SI, Ikram M, et al. Neuroprotective Effect of Quercetin Against the Detrimental Effects of LPS in the Adult Mouse Brain. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Dec 11 [cited 2024 Dec 13];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2018.01383/full>
105. Wang Q, Liu C. Protective effects of quercetin against brain injury in a rat model of lipopolysaccharide-induced fetal brain injury. *Int J Dev Neurosci*. 2018 Dec 1;71:175–80.
106. Erikoğlu M, Şahin M, Özer Ş, Avunduk MC. Effects of Gender on the Severity of Sepsis. *Surg Today*. 2005 Jun 1;35(6):467–72.
107. Chen S, Tang C, Ding H, Wang Z, Liu X, Chai Y, et al. Maf1 Ameliorates Sepsis-Associated Encephalopathy by Suppressing the NF-κB/NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Dec 23 [cited 2024 Nov 9];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.594071/full>
108. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011 Jul 29;7:55.
109. Goldim MP de S, Della Giustina A, Petronilho F. Using Evans Blue Dye to Determine Blood-Brain Barrier Integrity in Rodents. *Curr Protoc Immunol*. 2019 Sep;126(1):e83.
110. LU W, JIANG JP, HU J, WANG J, ZHENG MZ. Curcumin protects against lipopolysaccharide-induced vasoconstriction dysfunction via inhibition of thrombospondin-1 and transforming growth factor-β1. *Exp Ther Med*. 2015 Feb;9(2):377–83.
111. Tang D, Kang R, Xiao W, Zhang H, Lotze MT, Wang H, et al. Quercetin prevents LPS-induced high-mobility group box 1 release and proinflammatory function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Dec;41(6):651–60.
112. Savran M, Aslankoc R, Ozmen O, Erzurumlu Y, Savas HB, Temel EN, et al. Agomelatine could prevent brain and cerebellum injury against LPS-induced neuroinflammation in rats. *Cytokine*. 2020 Mar;127:154957.
113. Savran M, Ozmen O, Erzurumlu Y, Savas HB, Asci S, Kaynak M. The Impact of Prophylactic Lacosamide on LPS-Induced Neuroinflammation in Aged Rats. *Inflammation*. 2019 Oct;42(5):1913–24.

114. Liu C, Li A, Weng YB, Duan ML, Wang BE, Zhang SW. Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol WJG*. 2009 Dec 14;15(46):5843–50.
115. Steeber DA, Tang MLK, Zhang XQ, Müller W, Wagner N, Tedder TF. Efficient Lymphocyte Migration Across High Endothelial Venules of Mouse Peyer's Patches Requires Overlapping Expression of L-Selectin and β 7 Integrin1. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6638–47.
116. Srzić I, Neseek Adam V, Tunjić Pejak D. SEPSIS DEFINITION: WHAT'S NEW ^[1]_{SEPT} IN THE TREATMENT GUIDELINES. *Acta Clin Croat*. 2022 Jun;61(Suppl 1):67–72.
117. Vincent JL. Current sepsis therapeutics. *EBioMedicine*. 2022 Dec;86:104318.
118. Zhang L, Wen K, Zhang Z, Ma C, Zheng N. 3,4-Dihydroxyphenylethanol ameliorates lipopolysaccharide-induced septic cardiac injury in a murine model. *Open Life Sci*. 2021;16(1):1313–20.
119. Chen L, Yang S, Zumbrun EE, Guan H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammation driven by macrophages. *Mol Nutr Food Res*. 2015 May;59(5):853–64.
120. Liu Y, Feng L, Hou G, Yao L. Curcumin Elevates microRNA-183-5p via Cathepsin B-Mediated Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway to Strengthen Lipopolysaccharide-Stimulated Immune Function of Sepsis Mice. *Contrast Media Mol Imaging*. 2022;2022:6217234.
121. Wang X, Buechler NL, Yoza BK, McCall CE, Vachharajani VT. Resveratrol attenuates microvascular inflammation in sepsis via SIRT-1-Induced modulation of adhesion molecules in ob/ob mice. *Obes Silver Spring Md*. 2015 Jun;23(6):1209–17.
122. Ye X, Liu Y, Hu J, Gao Y, Ma Y, Wen D. Chlorogenic Acid-Induced Gut Microbiota Improves Metabolic Endotoxemia. *Front Endocrinol*. 2021;12:762691.
123. Zhang ZK, Zhou Y, Cao J, Liu DY, Wan LH. Rosmarinic acid ameliorates septic-associated mortality and lung injury in mice via GRP78/IRE1 α /JNK pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2021 Jun 8;73(7):916–21.
124. Vieira BM, Caetano MAF, de Carvalho MT, Dos Santos Arruda F, Tomé FD, de Oliveira JF, et al. Impacts of Curcumin Treatment on Experimental Sepsis: A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2023;2023:2252213.
125. Heeba GH, Mahmoud ME, El Hanafy AA. Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats: role of oxidative stress, heme oxygenase-1 and TNF- α . *Toxicol Ind Health*. 2014 Jul;30(6):551–60.

126. Aydın P, Bekmez H. Experimental Sepsis Models: Advantages and Limitations. *Eurasian J Med.* 2023 Dec 1;55(Suppl 1):S120–4.
127. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol Pharm.* 2007 Dec 1;4(6):807–18.
128. Kandemir K, Tomas M, McClements DJ, Capanoglu E. Recent advances on the improvement of quercetin bioavailability. *Trends Food Sci Technol.* 2022 Jan 1;119:192–200.
129. Kumari A, Dash D, Singh R. Curcumin inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia and airway inflammation through modulation of sequential release of inflammatory mediators (TNF- α and TGF- β 1) in murine model. *Inflammopharmacology.* 2017 Jun;25(3):329–41.
130. Wang M, Feng J, Zhou D, Wang J. Bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial activation and dysfunction: a new predictive and therapeutic paradigm for sepsis. *Eur J Med Res.* 2023 Sep 12;28(1):339.
131. Giustina AD, de Souza Goldim MP, Danielski LG, Garbossa L, Junior ANO, Cidreira T, et al. Lipoic Acid and Fish Oil Combination Potentiates Neuroinflammation and Oxidative Stress Regulation and Prevents Cognitive Decline of Rats After Sepsis. *Mol Neurobiol.* 2020 Nov;57(11):4451–66.
132. Shen W, Zhang X, Tang M, Chen W, Wang Y, Zhou H. Targeting of ubiquitination and degradation of KLF15 by E3 ubiquitin ligase KBTBD7 regulates LPS-induced septic brain injury in microglia. *Exp Cell Res.* 2024 Nov 1;443(1):114317.
133. Zhang X, Yan F, Feng J, Qian H, Cheng Z, Yang Q, et al. Dexmedetomidine inhibits inflammatory reaction in the hippocampus of septic rats by suppressing NF- κ B pathway. *PloS One.* 2018;13(5):e0196897.
134. Gao Q, Hernandez MS. Sepsis-Associated Encephalopathy and Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Inflammation.* 2021 Dec;44(6):2143–50.
135. Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y. Specific Role of Tight Junction Proteins Claudin-5, Occludin, and ZO-1 of the Blood–Brain Barrier in a Focal Cerebral Ischemic Insult. *J Mol Neurosci.* 2011 Jun 1;44(2):130–9.
136. Öz M, Erdal H. A TNF- α inhibitor abolishes sepsis-induced cognitive impairment in mice by modulating acetylcholine and nitric oxide homeostasis, BDNF release, and neuroinflammation. *Behav Brain Res.* 2024 May 28;466:114995.
137. Hooshmand M, Asoodeh A. Coadministration of Monophosphoryl Lipid and Curcumin Modulates Neuroprotective Effects in LPS Stimulated Rat Primary Microglial Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2024;2024:9422312.

138. Wu S, Rao G, Wang R, Pang Q, Zhang X, Huang R, et al. The neuroprotective effect of curcumin against ATO triggered neurotoxicity through Nrf2 and NF- κ B signaling pathway in the brain of ducks. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Dec 25;228:112965.
139. Gan R, Liu H, Wu S, Huang R, Tang Z, Zhang N, et al. Curcumin Alleviates Arsenic Trioxide-Induced Inflammation and Pyroptosis via the NF- κ B/NLRP3 Signaling Pathway in the Hypothalamus of Ducks. *Biol Trace Elem Res.* 2023 May 1;201(5):2503–11.
140. Karimi A, Naeini F, Asghari Azar V, Hasanzadeh M, Ostadrahimi A, Niazkar HR, et al. A comprehensive systematic review of the therapeutic effects and mechanisms of action of quercetin in sepsis. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 2021 Jun;86:153567.
141. Yang YS, Liu CY, Pei MQ, Sun ZD, Lin S, He HF. Quercetin protects against sepsis-associated encephalopathy by inhibiting microglia-neuron crosstalk via the CXCL2/CXCR2 signaling pathway. *Phytomedicine.* 2024 Nov 1;134:155987.
142. Lee B, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Protective Effects of Quercetin on Anxiety-Like Symptoms and Neuroinflammation Induced by Lipopolysaccharide in Rats. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2020;2020:4892415.
143. Jin Z, Ke J, Guo P, Wang Y, Wu H. Quercetin improves blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia reperfusion via Wnt signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2019 Aug 15;11(8):4683–95.
144. Selvakumar K, Prabha RL, Saranya K, Bavithra S, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Polychlorinated biphenyls impair blood–brain barrier integrity via disruption of tight junction proteins in cerebrum, cerebellum and hippocampus of female Wistar rats: Neuropotential role of quercetin. *Hum Exp Toxicol.* 2013 Jul 1;32(7):706–20.
145. Elblehi SS, Abd El-Maksoud EM, Aldahrani A, Alotaibi SS, Ghamry HI, Elgendy SA, et al. Quercetin Abrogates Oxidative Neurotoxicity Induced by Silver Nanoparticles in Wistar Rats. *Life.* 2022 Apr 13;12(4):578.

8.EKLER

EK-1. Etik Kurul İzin Formu

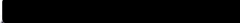
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 01/11/2022 35340, İnciraltı, İzmir-232 412234
Toplantı Tarihi 07 Eylül 2022

Sayın, Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK'
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

35/2022 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Sepsis modeli oluşturulmuş sıçanlarda Kurkumin Kuersetin polifenol kombinasyonunun nöroinflamasyon ve kan-beyin bariyeri üzerine önleyici etkisi incelenmesi" isimli; Burak GÜNDOĞDU, Ali Necati GÖKMEN, Ozan BALKABAK, Elvan ÖÇMEN, Pem KESKİNOĞLU' nun araştırmacı olduğu projenin uygulanmasında 78 adet Wistar Albino sıçan kullanımı uygulaması etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı


Prof. Dr. Nazan UYSAL HARZADIN
Başkan Vekili (katılmadı)


Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Üye (Araştırmacı)


Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

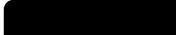

Prof. Dr. Nergiz BÜRMÜŞ SÜTİPELER
Üye

Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman (Araştırmacı)


Prof. Dr. Gamze ÇAPA KAYA
Üye



Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN
Üye


Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK
Üye



Prof. Dr. Figen AKAN
Üye

Öğr. Gör. Dr. Sevim KANDİŞ
Üye

Doç. Dr. Kadri KULUALP
Üye (katılmadı)


Öğr. Gör. Dr. Aslı ÇELİK
Üye

Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye


Zehra KINAM
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağ olacaktır.