



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**NÖROİNFLAMASYON MODELİNDE L-KARNİTİN
UYGULAMASININ BİLİŞSEL İŞLEVLER VE NLRP3 YOLU,
TNF-ALFA, IL-18 ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Sönmez ŞEVİK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından TTU-2022-8650 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA-2023

BEYAN

“Nöroinflamasyon Modelinde L-Karnitin Uygulamasının Bilişsel İşlevler Ve NLRP3 Yolu, TNF-alfa, IL-18 Üzerine Etkisi” adlı Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi SDÜ Tıp Fakültesi Uzmanlık Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

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

Hazırlayan

Dr. Sönmez ŞEVİK

Danışman

Prof. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyimleri ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan, tezimi hazırlama sürecinde her aşamasında bana destek olan, tezimde büyük emekleri olan, mesleki gelişimimde büyük desteğini gördüğüm, beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ hocama teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık hayatım süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, manevi desteklerini her zaman hissettiren, mesleki gelişimimde büyük katkıları olan ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sayın Doç. Dr. Fevziye Burcu ŞİRİN, Dr. Öğr. Üyesi İlter İLHAN, Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım tüm asistan ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan ve her zaman yanımda olduklarını hissettiren canım anneme, babama ve ablama teşekkür ederim.

Fakülte yıllarımda, asistanlık hayatım sürecinde yanımda ve bana destek olan ve bundan sonra da her zaman yanımda olacağını bildiğim, hayatın zorluklarını benimle paylaşan en önemli destekçim canım eşim Kağan ŞEVİK'e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Asistanlık sürecimde hayatıma giren en büyük mutluluk kaynağım, varlığıyla bana güç veren oğlum, her şeyim Efehan'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Dr. Sönmez ŞEVİK

ISPARTA-2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nöroinflamasyon (Nİ)	3
2.1.1. Nöroinflamasyon ve Mikroglialar	5
2.1.2. Nöroinflamasyon ve Astrositler	6
2.2. Lipopolisakkarit (LPS) Yapısı	7
2.3. LPS Sinyal İletisi	8
2.3. İnflamazomlar	12
2.4. NOD (NükleotidBağlayıcı Oligomerizasyon Alanı) Benzeri Reseptör Proteini 3 (NLRP3) İnflamazomu Aracılı İnflamasyon	13
2.5. Nöroinflamasyonda Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)	17
2.6. Nöroinflamasyonda İnterlökin-18	18
2.7. Hipokampus ve Bilişsel Fonksiyonlar	20
2.8. Karnitin	21
2.8.1. L-Karnitin Sentezi.....	21
2.8.2. L-Karnitin Emilimi.....	23
2.8.3. L-Karnitin Biyolojik Fonksiyonları	24
2.9. Nöroinflamasyon ve Oksidatif Stres.....	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç.....	29
3.1.1. Deney Hayvanları	29
3.1.2. Lipopolisakkarit	30
3.1.3. L-Karnitin	31

3.1.4. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	31
3.1.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.1.6. Kullanılan Reaktif Malzemeleri.....	32
3.1.7. Kullanılan Çözeltiler	32
3.1.8. Serum ve Hipokampus TNF- α ve IL-18 Düzeylerin Çalışma Prensibi	33
3.1.8.1. Serum ve Hipokampus TNF- α Çalışma Prensibi	33
3.1.8.2. Serum ve Hipokampus IL-18 Çalışma Prensibi	33
3.1.9. Serum ve Hipokampus Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Çalışma Prensibi	33
3.1.10. Genetik Analiz için Kullanılan Sarf ve Ekipmanlar	34
3.1.11. Genetik Analiz için Kullanılan Cihazlar	35
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Öğrenme ve Davranışsal Testler	35
3.2.1.1. Morris Su Labirenti - Morris Water Maze	35
3.2.1.1.1. Deney Prosedürü	36
3.2.1.2. Açık Alan Testi-Open Field Test.....	37
3.2.1.3. Zorlanmış Yüzme Testi (Forced Swim Test).....	38
3.2.2. Hipokampus Dokusunun Elde Edilmesi.....	39
3.2.3. Serum Numunelerin Elde Edilmesi.....	40
3.2.4. Histokimyasal Preparat Hazırlıkları.....	40
3.2.4.1. Doku Örneklerinde Histolojik Çalışma	40
3.2.4.1.1. Doku Takip Çalışmaları ve Kesitlerin Eldesi	40
3.2.4.2. Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması (H-E)	41
3.2.5. Hipokampus NLRP3 VE IL-18 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tayini	43
3.2.5.1. RNA İzolasyon Protokolü	43
3.2.5.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	43
3.2.5.3. cDNA Sentezi	43
3.2.5.4. Real Time PCR (RT-PCR).....	44
3.2.5.5. Analiz	46
3.3. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR.....	48
4.1. Morris Su Labirenti Verileri	48
4.1.1. Eğitim Dönemi Verileri.....	48
4.1.2. Morris Su Labirenti Test Günü Verileri (Probe Test-Visible Test).....	49

4.2. Açık Alan Testi Sonuçları.....	50
4.3. Zorlanmış Yüzme Testi Sonuçları.....	51
4.4. Serum ve Hipokampüste İnflamatuvar Sitokinlerin Sonuçları	52
4.5. Serum ve Hipokampüste Oksidatif Stres Parametrelerinin Sonuçları.....	53
4.6. Hipokampüste NLRP3 ve IL-18 Ekspresyon Bulguları	55
4.7. Hipokampüste Histopatolojik Bulgular	56
5. TARTIŞMA.....	60
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	67
ÖZET.....	69
ABSTRACT	70
KAYNAKLAR.....	71
EKLER.....	83
Ek 1. Materyal Kullanım İzni	83
Ek 2. Materyal Kullanım İzni	84
Ek 3. Etik Kurul Onayı	85

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
AIM	: Absent in melanom
ALR	: Absent in melanoma 2-benzeri reseptörler
AP-1	: Aktivatör protein 1
ARE	: Antioksidan yanıt elemanları
ASC	: Apoptoz ilişkili benek benzeri protein
ATP	: Adenozin trifosfat
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CA	: Cornu ammonis
CARD	: Kaspaz aktivasyon ve alım alanı
CAT	: Karnitin açilkarnitin translokaz
CCL-3	: Kemokin ligand 3
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
CLRs	: C tipi lektin reseptörü
CPT	: Karnitin palmitoil transferaz
CREB	: Siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
CXCL-8 (IL-8)	: Kemokin ligandı 8
DAMP	: Hasarla ilişkili moleküler yapılar
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift sarmallı deoksiribonükleik asit
ELİSA	: Enzim-bağlı immünsorbent test
FADD	: Fas aracılı ölüm alanı
FADH2	: Redükte flavin adenin dinükleotid
FASL	: Fas ligandı
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GSDMD	: Gasdermin D
GSDMD^{Nterm}	: Gasdermin D amino terminali
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCL	: Hidroklorür
H-E	: Hematoksilen-eozin
HO-1	: Hem oksijenaz 1

HSP	: Isı şok proteini
ICAM-1	: İntrasellüler adezyon molekülü 1
IFN-β	: İnterferon beta
IFN-γ	: İnterferon gama
IL-1	: İnterlökin-1
IL-10	: İnterlökin-10
IL-18	: İnterlökin-18
IL1R	: İnterlökin 1 reseptörü
IL-1β	: İnterlökin-1beta
IL-6	: İnterlökin-6
IRF	: İnterferon düzenleyici faktör
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
ip	: İntraperitoneal
K	: Kontrol grubu
Kar	: Karnitin grubu
KarLPS	: Karnitin ve lipopolisakkarit verilen grup
KBB	: Kan beyin bariyeri
Keap1	: Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
kg	: Kilogram
LBP	: Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
LPS	: Lipopolisakkarit
LRR	: Lösinden zengin tekrarlayan alan
MD2	: Myeloid farklılaşma faktörü 2
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MMPs	: Matriks metalloproteinaz
MYD-88	: Myeloid farklılaşmasından öncelikli sorumlu gen 88
NACHT	: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon alanı
NADH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NEK7:	: NIMA-ilişkili kinaz 7
NF-κB	: Nükleer faktör kappa beta
NLR	: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon alanı benzeri reseptör
NLRC4	: NLR ailesi CARD alanı içeren protein 4
NLRP	: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör proteini

NOD	: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon alanı
NOD2	: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 2
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
OSI	: Oksidatif stres indeksi
PAMP	: Patojen ilişkili moleküler yapılar
PMN	: Polimorfonükleer lökosit
PRR	: Patojen tanıma reseptörü
PYD	: Pirin alanı
RIG	: Retinoik asit ile indüklenabilen gen
RLR	: Retinoik asit ile indüklenebilir gen benzeri reseptör
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
rpm	: Dakikadaki devir hızı
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSS	: Santral sinir sistemi
TAS	: Total antioksidan durum
TIR	: Toll-interlökin 1 reseptörü
TIRAP	: Toll-interlökin 1 reseptör bölgesi içeren adaptör protein
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
TOS	: Total oksidan durum
TRAM	: TRIF ile ilişkili adaptör molekül
TRIF	: Toll-interlökin 1 reseptör alanı içeren adaptör indükleyici IFN- β

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. LPS sinyal iletisi	10
Şekil 2.2. SSS’de LPS’nin etki mekanizması	11
Şekil 2.3. NLRP3 inflamazom düzenneği	14
Şekil 2.4. NLRP3 inflamazomu hazırlama (sinyal 1) ve aktivasyon (sinyal 2) sinyali	16
Şekil 2.5. IL-18’in nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona aracılık etme hipotezi ...	19
Şekil 2.6. L-karnitinin kimyasal yapısı (gama-trimetil amino beta hidroksi bütirik asit).....	21
Şekil 2.7. İnsanda karnitin biyosentezi.	23

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1. Morris su labirentinde eğitim döneminde her bir grubun kendi içinde 1.-4. gün sürecinde hedef platformu bulma süresi	48
Grafik 4.2. Zorlanmış yüzme testi verilerinin gruplar arası karşılaştırılması	52
Grafik 4.3. Hipokampüste NLRP3 ve IL-18 relatif mRNA ekspresyon düzeylelerinin karşılaştırılması	55



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1. Kafeste barındırılan sıçanlar.....	30
Resim 3.2. Bir sıçanın Morris su labirentinde izlediği yol ve Morris su labirentindeki kadranlar	36
Resim 3.3. Açık alan testi uygulamasındaki bir sıçan.....	38
Resim 3.4. Hipokampus çıkarmak için kullandığımız aparatlar	39
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait beyin doku kesiti.....	58
Resim 4.2. LPS grubuna ait beyin doku kesiti.	58
Resim 4.3. LPS+Karnitin grubuna ait beyin doku kesiti.	59
Resim 4.4. Karnitin grubuna ait beyin doku kesiti.....	59

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. Deney grupları.....	29
Tablo 3.2. NLRP3 ve IL-18 için cDNA sentez protokolü.....	44
Tablo 3.3. Reaksiyon karışımı	45
Tablo 3.4. Cihaz protokolü	45
Tablo 4.1. Morris su labirentinde eğitim döneminde hedef platformu bulma süresinin gün içi gruplar arası karşılaştırması (sn)	49
Tablo 4.2. Morris su labirentinde test günü verileri.....	50
Tablo 4.3. Açık alan testi verilerinin gruplar arası karşılaştırılması	51
Tablo 4.4. Serum ve hipokampüste IL-18, TNF- α sitokinlerinin gruplar arası karşılaştırılması	53
Tablo 4.5. Serum oksidatif stres parametrelerinin sonuçları ve gruplar arası karşılaştırılması	54
Tablo 4.6. Hipokampus oksidatif stres parametrelerinin sonuçları ve gruplar arası karşılaştırılması	54
Tablo 4.7. Hipokampüste NLRP3 ve IL-18 relatif mRNA ekspresyon düzeyleri.....	56
Tablo 4.8. Gruplar arasındaki histopatolojik bulguların derecelendirilmesi	57
Tablo 4.9. Gruplar arasındaki histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi	57

1. GİRİŞ

Günümüzde nörodejeneratif hastalıklar ciddi mortalite ve morbidite nedeni olup, etyopatogeneze ve tedavide kullanılabilecek ajanlara yönelik araştırmalar devam etmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların temelinde yatan faktörlerden biri nöroinflamatuvar süreçlerdir. Nöroinflamasyon, santral sinir sisteminde (SSS) bağışıklık tepkisinin mikroglia ve astrositler tarafından aktivasyonudur. Tipik olarak nöroinflamasyon, SSS hasarına, inflamatuvar ve enfeksiyöz nedenlere, serebral iskemiyeye, toksinlere yanıt olarak veya otoimmünitenin bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. İnflamatuvar sitokinlerin etkisi ile nöroinflamatuvar süreç tetiklenmektedir. Nöroinflamatuvar yanıt başlangıçta, hasarı takiben gelişen doku onarımı sırasında koruyucu bir rol oynar, ancak Alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı, amiotrofik lateral skleroz ve multipl skleroz dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda kronik nöroinflamasyon hastalık tablosunun progresyonu ile ilişkilidir (1).

Karnitin, temelde yağ asidi oksidasyonu için mitokondri membranında yer alan peptid yapılı bir moleküldür dolayısıyla mitokondriyal fonksiyonların regülasyonunda rol oynar. Diğer taraftan sinaptik iletide nöromodülatör etkisi, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) düzeylerini artırması nöroprotektif özelliğini ifade etmektedir. Sonuçta karnitinin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileriyle de nöroinflamasyonun baskılanmasında etkinliği olabileceği düşünülen ve bununla ilgili geniş araştırma alanlarına sahip olan önemli bir moleküldür (2,3).

Gram negatif bakterilerin bir komponenti olan lipopolisakkarit (LPS) deneysel olarak inflamasyon/nöroinflamasyon modelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. LPS'ye maruziyet sonrası aktive olan mikroglialar proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ve bazı proteinlerin birikimine neden olarak nöroinflamasyona neden olur (1).

Lipopolisakkarit Toll benzeri reseptör (TLR) 4 ile etkileşerek inflamasyonu tetikler. Toll benzeri reseptör, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR), interlökin 1 reseptörü (IL1R) uyarılması sonucu inaktif nükleotidbağlayan oligomerizasyon alanı benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3) üretimi artmaktadır. Hücre dışı ATP birikimi,

iyon değişiklikleri gibi sinyallerle NLRP3'ün aktivasyonu uyarılınca NLRP3 inflamazomu oluşur. İnflamasyon ve piroptosis tetiklenir. NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonucu da interlökin 18 (IL-18)'in aktif formu oluşur ve salınır (4). Karnitinin ise NF-κB transkripsiyon faktörünü ve iNOS gen ifadesini inhibe ettiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (5). Ayrıca antioksidan etkiye sahiptir. Oksidatif stresin ve inflamasyonun birbirini tetiklemesi nedeniyle karnitinin bunlardan birini veya her ikisini inhibe etmesi inflamasyonu ve oksidatif stresi önleyebilmektedir (5,6)

Nöroinflamasyon modeli oluşturmak üzere sıçanlara intraperitoneal (ip) yolla LPS enjeksiyonu yapılmıştır. Bu tabloya subakut karnitin enjeksiyonunun farklı yönlerden koruyucusu etkisini araştırmayı amaçladık. Nöroinflamasyonda NO, oksidan ajanlar, sitokinler nöronlarda ve sinapslarda fagositoza yol açar. Karnitinin ise antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif özellikleriyle ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz [inducible nitric oxide synthase (iNOS)] gen ifadesinin inhibe edilmesi gibi fonksiyonlarıyla nöroinflamasyonda koruyucu olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. LPS ile oluşan nöroinflamasyonda nöron ve sinaps kaybı meydana gelmesi sonucunda hafızada ve öğrenmede bozulma meydana geleceğinden buna karşı karnitinin etkisinin öğrenme ve nörodavranış deneyleri ile incelenmesi amaçlandı. Kognitif fonksiyonu değerlendirmek amacıyla su labirenti, lokomotor aktiviteyi değerlendirmek amacıyla açık alan testi, umutsuzluk ve depresyona eğilimi değerlendirmek için zorlanmış yüzmeye testi, ek olarak hipokampüste eşlik eden histopatolojik değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca LPS indüksiyonu ile ilişkili olan tümör nekroz faktör alfa [tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)], IL-18 düzeylerinin hem hipokampüste hem de serumda düzeylerinin değişimi ve karnitinin NLRP3 inflamazomu üzerine etkisini değerlendirmek için hipokampüste NLRP3 ve IL-18 ekspresyonunun incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroinflamasyon (Nİ)

Dünya nüfusunun yaşlanmasıyla birlikte nörodejeneratif hastalıklar artmaktadır ve nörodejeneratif hastalıklar büyük bir halk sağlığı problemi haline gelmektedir. Nörodejenerasyonun patofizyolojisinde hedef, sinir hücreleri ve sinapslardır (7).

Kanser, bulaşıcı hastalık ve kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle erken ve orta yaşta ölüm tıbbın gelişmesi ve halk sağlığı çabalarıyla azalmış olup, bunun sonucunda yaşlı popülasyonun artışıyla beraber nörodejeneratif hastalığa yatkınlık artmıştır. Günümüzde nörodejeneratif hastalığa sahip insanlar bakım ihtiyacı olan önemli bir popülasyonu oluşturmaktadır (8).

Santral sinir sistemi hastalıklarının çoğunun patogeneğinde nöroinflamasyon bulunmaktadır (9). İnflamasyon, immün sistemin yabancı uyaranlara karşı verdiği bağışıklık yanıtı olup patojenlere karşı savunmayı ve dokuda meydana gelebilecek hasarın önlenmesini sağlar (10). Nöroinflamasyon ise; mikroglialar, astrositler ve kan beyin bariyerine (KBB) katılan endotel hücrelerinin aktivasyonu, inflamasyon ilişkili mediatörlerin beyin üzerine etkileri ve immün sistem hücrelerinin beyin dokusuna infiltrasyonu ile meydana gelen bir süreçtir (11). Nöroinflamatuvar yanıtta sitokin, kemokin, reaktif oksijen türevleri (ROS) ve ikinci haberciler bulunur. Bu mediatörler SSS'de yerleşmiş glial (mikroglia ve astrositler), endotelial ve periferik vasküler immün hücreler tarafından üretilmektedir (12). Nöroinflamasyonu başlatan faktörler arasında travmaya bağlı beyin hasarı, infeksiyon, serebrovasküler olay, otoimmün hastalıklar, toksik metabolitler, yaşlanma, hava kirliliği ve pasif tütün içiciliği vardır (9,13).

Santral sinir sisteminin bağışıklık sistemi hücresi olan mikroglialar, nöroinflamatuvar süreçlerin en önemli hücreleri ve araçlarıdır. Ayrıca, periferik inflamasyon çeşitli mekanizmalar yoluyla beyinde inflamatuvar yanıt oluşturabilir (14).

Akut inflamasyon, vücutta oluşan tehlike sinyallerine verilen ani ve hızlı yanıt olup, patojeni yok eden veya hasarlı bölgenin onarımını sağlayan bir savunma

mekanizmasıdır. Uzun süreli uyaranlar sonucunda ise kronik inflamasyon meydana gelir. Nöroinflamasyon genel olarak SSS'nin kronik inflamasyonu anlamında kullanılır. Mikroglial ve astrositik aktivasyonun kümülatif etkileri ile SSS'de kronik ve progresif hasarı tanımlar ve nörodejeneratif hastalıkların progresyonuna yol açar (15). SSS'de meydana gelen inflamasyon sonucunda oluşan etkiler incelendiğinde olumlu ve olumsuz sonuçlar görülmektedir. Bir tarafta hasarlanan nöronların iyileşmesini sağlarken diğer tarafta nörodejenerasyonun şiddetini arttırır. Bunun ayrımı uyaranın süresi ve şiddetine bağlı olarak değişiklik gösterir (16). Nöroinflamasyon, nörodejeneratif hastalıklara bağlı nöronal hasar için önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir (17).

Kan beyin bariyeri endotel, kapilleri saran astrositik yapılar, bazal lamina ve bu laminaya gömülü halde bulunan perisitlerden oluşmuştur. Monosit, makrofaj immün hücreleri periferik inflamasyon sürecine dahil olur. Periferik vasküler alanda bulunan immün sistem hücreleri hasara uğramış KBB'yi geçebilirler. KBB'yi geçen immün sistem hücreleri, sinir hücrelerini, gliaları etkiler ve immün yanıtı başlatır. Oluşan bu immün yanıt aslında ilk zamanlarda nöroprotektif amaçlı bir yanıt olarak gerçekleşse de immün sistemin aktivasyonundaki artış sonucu immün hücrelerin sayısının artmasıyla beraber beyin dokusunda hasar şiddetlenebilir (13). Önceden KBB'nin SSS'yi periferik immün sistemden tamamen ayırdığı ve periferik dolaşımdaki immün hücrelerin KBB'yi geçmediği düşünülmekteyken, günümüzde KBB'nin, immün sistem kaynaklı inflamatuvar sitokinlere karşı geçirgen olduğu, SSS'ye geçen sitokinlerin mikroglialardan ve astrositlerden de bu sitokinlerin salınımı ve yayılımını sağlayarak beyin dokusuna daha fazla lökosit infiltrasyonuna yol açabildiği bilinmektedir (13,18).

Periferik inflamasyon, nöroinflamasyonu şu mekanizmalarla gerçekleştirir;

1. KBB'deki taşıyıcı sistemler, proinflamatuvar sitokinlerin beyin dokusuna geçişine izin verir.
2. KBB'si olmayan sirkumventriküler organlardan sitokinler SSS'ye geçer.
3. KBB bütünlüğü proinflamatuvar sitokinler ile bozulur ve daha geçirgen hale gelir. Bu geçirgenlik artışı da inflamatuvar hücrelerin KBB'ye geçişini artırır.

4. Sitokin düzeyleri, beyin damarlarında bulunan endotelial hücrelerdeki sıkı bağlantıların dayanıklılığını sağlayan okludin gibi proteinlerin yapısının bozulması ile sıkı bağlantıların geçirgenliğini artırmaktadır. Dolayısıyla KBB'nin geçirgenliğini artırır.
5. Periferik sitokinler tarafından vagal uyarılmanın, SSS üzerine direkt etkisi vardır ve bu uyarılmanın hastalık davranışını tetiklediği bildirilmiştir.

Sonuç olarak, KBB'yi aşan inflamatuvar sitokinlerin ve nöroglial hücrelerden kaynaklanan sitokinlerin neden olduğu nöroinflamasyon cevabı nöron hasarına ve kaybına yol açarak beyinle ilgili birçok hastalığın progresyonuyla sonuçlanabilir (13).

2.1.1. Nöroinflamasyon ve Mikroglialar

Santral sinir sisteminin makrofajı olan mikroglia, hipokampus ve bazal ganglionların yapısında bulunur. Santral sinir sistemindeki nöronları patojenlerden korumak, fagositoz, sinyal iletimi, mediatör salınımı gibi görevleri vardır (19,21).

Mikroglialar, inflamasyon sonucu salınan sitokinler ile uyarıldıktan sonra morfolojik yapısında değişim görülür. Dinlenme halindeki dallanmış formundan, fagositik özellikteki aktif formuna dönüşür ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımı gerçekleşir. Kronik inflamasyonda ise uzun süre aktif formda kalan mikroglialar, uzun süreli sitokin ve nörotoksik moleküllerinin salıverilmesine önderlik eder (13). Santral sinir sistemindeki inflamatuvar sürecin ilk göstergesi mikroglial aktivitedir. Mikroglial aktivasyon toksin, doku hasarı, mikrobiyal ajanlar veya herhangi bir tehlike sinyali varlığında gerçekleşir. Bu durumlarda mikroglialar, sağlıklı nöron mikroçevresinde de aktive olup, fagositoz veya apoptoz yoluyla sağlıklı nöronlarda da hasara yol açabilmektedir (22). Uyarılma sonucunda aktifleşen mikroglialar; fagositoz, T-hücrelerine antijen sunma ve çeşitli oksidan maddelerin salgılanması gibi görevlerde yer alır. Bunların yanısıra iNOS'u indükler, interleukin-1 β [interleukin-1 β (IL-1 β)] ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri artırır, siklooksijenaz-1, siklooksijenaz-2, reaktif oksijen türevlerini etkinleştirir. Bunların sonucunda nörodejenerasyon ve nöronal ölüm gelişir (23).

Mikroglialar hem proinflamatuvar hem antiinflamatuvar ya da hem nörotoksik ve hem de nöroprotektif immünolojik özellikler kazanabilirler (24). Aktif mikroglialar nöron kaybına sebep olup nörodejeneratif rol üstlenirken, doku hasarını ve patojenleri yok ederek nöroprotektif role de sahip olabilirler. Ölü veya hasarlı nöronların mikrogliya tarafından fagosite edilmesi ile diğer hücreler için hasara sebep olabilecek proinflamatuvar intrasellüler komponentlerin salıverilmesi önlenmektedir. Birçok proapoptotik sinyal ileti yolu şiddetli nöroinflamasyon nedeniyle üretimi artan moleküller üzerinden düzenlenir. Bu sonuçlar, sinir hücrelerindeki apoptozun ve mikroglialardaki etkinliğin nöroinflamasyon ile doğrudan etkilendiğini desteklemektedir (22). Ek olarak, mikrogliaların etkinleşmesi, hücrel metabolik ihtiyacı da artırarak oksidatif stres ve mitokondriyal işlev bozukluğuna da neden olabilmektedir. Mikroglial aktivite sonucu üretimi artmış olan proinflamatuvar mediatörlerin inhibe edilmesi nöron hasarının azalmasına, dolayısıyla nörodejenerasyonun yavaşlamasına yol açıp, nörodejenerasyonun önüne geçmek için farklı bir tedavi yaklaşımını gündeme getirmektedir (24).

2.1.2. Nöroinflamasyon ve Astrositler

Astrositler, SSS’de en çok bulunan ve alt tipleri olan glial hücre tipidir. Astrositlerin, nöronlara metabolik destek, sinyal iletimi, sinaptik plastisite, sinaptogenez, beyin kan akımını regüle etmek, oksidatif stresi modüle etmek gibi önemli işlevleri vardır (25).

Astrositler, uyarıldıkları zaman proinflamatuvar mediatörler salıverilmektedir. Astrositlerde de, SSS’de hücre hasarı veya tehlike sinyali söz konusu olduğunda mikroglialardaki gibi morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir (26). Astrositler uyarıldıklarında reaktif astrogliazis gelişmektedir. Astrositlerde meydana gelen bu proliferasyonun amacı doku hasarını engellemek ve ortadan kaldırmaktır. Astrogliazis, hasarı engellemek için olsa da fizyolojik bir olay değildir ve bu süreç astrositlerin olumlu etkilerinin kaybına neden olabilir (25).

Astrositleri uyaran olaylar dizisi net olmamakla beraber nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde bulunan birçok nedene bağlı gerçekleşebilir. Sinir hücreleri içindeki protein yapılar, hasarlı yapılar ve hasarlı nöronlardan salınan

mediatörler gibi mekanizmalar sonucunda astrosit proliferasyonu gelişip nörodejenerasyon meydana gelebilir(27).

Astrositlerin aktive edilmesi sonucunda önemli transkripsiyon moleküllerinden biri olan nükleer faktör kapp beta [nuclear factor kapp beta (NF- κ B)] aktive olur. NF- κ B'nin aktivasyonu proinflamatuvar moleküllerin etkinleştirilmesini, periferik immün hücre göçünü regüle eder. Bu olaylar sonucunda inflamatuvar yanıt nörodejenerasyona neden olur (28).

2.2. Lipopolisakkarit (LPS) Yapısı

Lipopolisakkarit, dünya çapında deneysel nöroinflamasyon ve amiloidoz modelleri oluşturmak için kullanılmaktadır (29). Lipopolisakkarit ile indüklenen sistemik inflamasyon; Alzheimer, parkinson, amiotrofik lateral skleroz, multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (30).

Lipopolisakkarit, gram negatif bakterilerde bulunan yapısal bir komponent olup hücre dışı membranının dışında yerleşim gösterir. Lipopolisakkarit yapısal olarak üç bileşenden oluşur. Bunlar şu şekildedir;

- 1- Hidrofobik olan Lipit A kısmı, LPS'yi hücre dışı tabakaya bağlayan yapıdır.
- 2- İç ve dış polisakkarit kor
- 3- Antijenik yapıda olan hidrofilik kısım (O antijen) (31).

İnsanda edinsel ve doğal olmak üzere iki farklı immün yanıt mevcut olup LPS'nin lipit A kısmı doğal immüniteyi aktive eder. Lipopolisakkaritin O antijen komponenti de edinsel immün yanıtı aktive eder. Lipopolisakkaritin etkinliği zincir uzunluğuna, yapısındaki açıl gruplarının yerine, fosfat sayısına bağlıdır. Lipopolisakkarit molekülü hidrofilik ve hidrofobik gruplar içermektedir. Molekül yapısındaki O antijen bölümü ve çekirdek bölümü hidrofilik polisakkarit zincirlerden, lipit A bölümü ise hidrofobik glikolipit bölümlerden oluşmaktadır. O antijeni bakteri suşuna göre değişen yinelenen oligosakkarit zincirleri içermektedir. Çekirdek bölümü oligosakkarite özgü şekerlere sahiptir. Lipit A bölümü ise açıl grupları taşıyan fosforillenmiş diglukozamin yapısındadır(32).

Lipopolisakkarit, oldukça toksik bir endotoksindir ve memelilerde bulunan enzimlerle parçalanmaya karşı dirençlidir. Böylece, inflamatuvar sitokin üretimiyle kalıcı bir inflamatuvar uyarı sağlar (33). Lipopolisakkarit uygulamasıyla oluşturulan nöroinflamasyon modelinde, KBB'nin bütünlüğü bozulur, bunun sonucunda nörotoksik faktörler ve inflamatuvar mediatörler SSS'ye geçer. Böylece hedef beyin hücrelerinde disfonksiyon, oksidatif stres ve apoptoz oluşur (34). Lipopolisakkarit, TLR4 reseptör proteinleri aracılığıyla proinflamatuvar kaskadları uyarak hipokampüste nöroinflamasyonu indükler (35).

2.3. LPS Sinyal İletisi

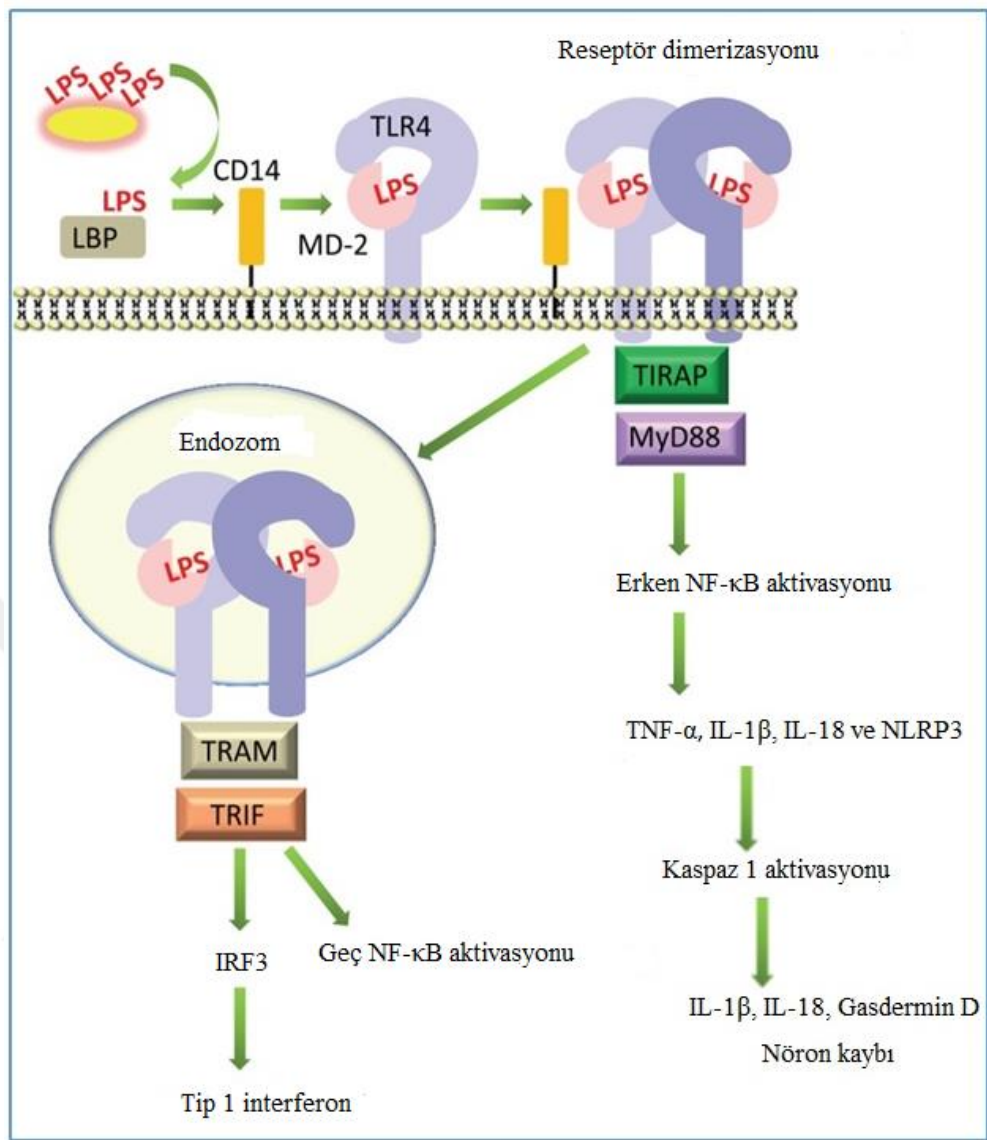
Doğal bağışıklık; polimorfonükleer lökosit, bazofil, makrofaj, monosit, eozinofil gibi hücrelerden oluşur. Bazı hücreler mikrobiyal etkenleri fagosite ederek inflamatuvar yanıtı başlatır, böylece organizmadaki ilk savunma mekanizmasını meydana getirirler. Bu inflamatuvar yanıtı, doğal bağışıklığın kalıtsal olarak aktarılan proteinleri olan, patern tanıma reseptörlerinin [pattern recognition receptors (PRR)] uyarılması da katkı sağlar. Patern tanıma reseptörleri hem mikroorganizmanın çeşitli yapılarını tanıır; bunlara patojen ilişkili moleküler yapılar [pathogen associated molecular pattern (PAMP)]denir; hem de doku hasarı, nekroz, hücre ölümü gibi durumlarda organizma tarafından salgılanan maddelere immün cevap gösterirler (36). Patern tanıma reseptörleri 5 gruptur:

1. Toll-benzeri reseptörler [toll like receptor (TLR)],
2. Nükleotid bağlayan oligomerizasyon domain benzeri reseptör [nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR)],
3. Retinoik asitle indüklenebilir gen [retinoic acid-inducible gene (RIG)] benzeri reseptörleri [RIG like reseptör (RLR)],
4. C-tipi lektin reseptörleri [C-type lectin receptors (CLRs)] ve
5. Absent in melanoma 2-benzeri reseptörlerden [absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors (ALR)] meydana gelir.

Bu reseptörler bağışıklık sistemi hücreleri, epitelyal, endotelyal hücreler tarafından eksprese edilmektedir (37,38). TLR'lerin bir kısmı hücre yüzeyinde, bir

kısmı intrasellüler kompartmanlarda eksprese edilir. Hücre yüzeyindeki TLR'ler özellikle protein, lipit, lipoprotein yapılarla uyarılırken, intrasellüler kompartmanlarda eksprese edilen TLR'ler nükleik asitleri tanırlar (37,39).

Lipopolisakkarit ilk olarak TLR4 ligandıolarak tanımlanmıştır (40). TLR4 temel olarak SSS'deki mikrogliauzerinde eksprese edilir. Lipopolisakkarit, LPS bağlayıcı protein [LPS-binding protein; (LBP)] tarafından bağlanır. Lipopolisakkarit, CD 14 [cluster of differentiation 14] 'e geçirilir, daha sonra miyeloid farklılaşma faktörü 2 [(myeloid differentiation factor; (MD2))] ve TLR4'e aktarılarak hücre yüzeyinde bir kompleks meydana getirir. Lipopolisakkarit-MD2-TLR4 kompleksi ikişerli dimer yapısına dönüşerek adaptör proteinler Toll-interlökin 1 reseptör[toll/interleukin-1 receptor (TIR)] bölgesi içeren adaptör protein[TIR domain containing adaptor protein (TIRAP)] ve miyeloid farklılaşmasından öncelikli sorumlu gen [myeloid differentiation primary response gene; (MYD)] 88'i etkinleştirip NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin nükleer translokasyonunu sağlar. Toll benzeri reseptör 4-MD2 kompleksi internalizasyonu ile farklı bir adaptör protein seti olan Toll-interlökin 1 reseptör alanı içeren adaptör indükleyici IFN- β [toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF)] ve TRIF ile ilişkili adaptör moleküllerini [TRIF-related adaptor molecule (TRAM)] etkinleştirerek interferon düzenleyici faktör [interferon regulatory factor (IRF)] aktivasyonunu, tip 1 interferon üretimini ve ayrıca NF- κ B'nin gecikmeli aktivasyonunu destekler (41,42) (Şekil 2.1).

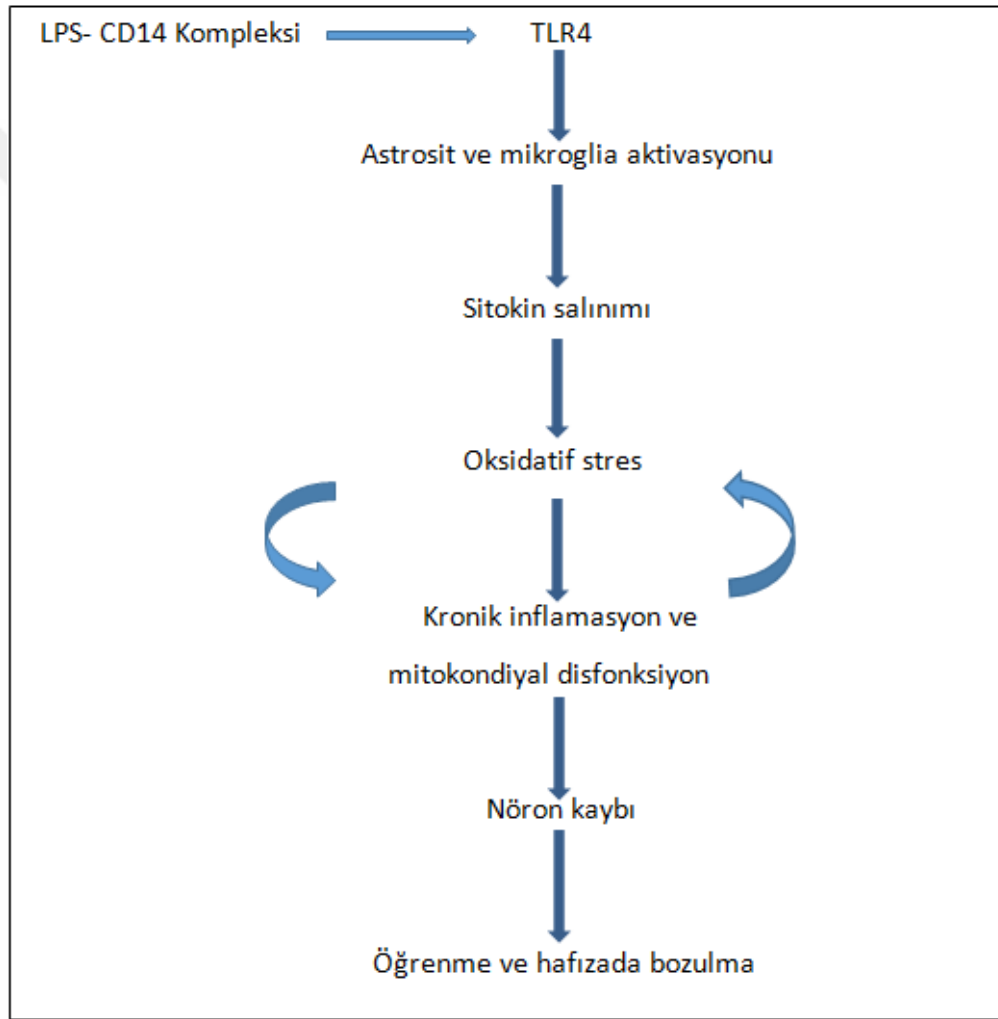


Şekil 2.1. LPS sinyal iletisi

(41) no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir. LPS: Lipopolisakkarit, LBP: Lipopolisakkarit bağlayıcı protein, CD 14: *Cluster of differentiation* 14, MD2: Myeloid farklılaşma faktörü 2, TLR4: Toll benzeri reseptör 4, TIRAP: Toll-interlökin 1 reseptör[toll/interleukin-1 receptor (TIR)] bölgesi içeren adaptör protein, MYD 88: Miyeloid farklılaşmasından öncelikli sorumlu gen 88, TRAM: TRIF ile ilişkili adaptör molekülü, TRIF: Toll-interlökin 1 reseptör alanı içeren adaptör indükleyici IFN-β, IRF3: interferon düzenleyici faktör, NF-κB: Nükleer faktör kappa beta.

Nükleer faktör κB, aktivator protein 1 [Activator protein 1 (AP-1)] ve IRF gibi transkripsiyon faktörleri; çekirdekte düzenleyici bölgelere bağlanır. Böylece IL-1β, İnterlökin 6 (IL-6), TNF-α ve IL-18 proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler, ROS ve iNOS gibi proinflamatuvar ve prooksidan mediatörler üretilir (42,43). Bu transkripsiyonel olaylar zinciri sonucunda nötrofiller ve monositler infeksiyon bölgesine göç eder ve immün hücrelerin bakterisidal yeteneğinin gelişmesine katkı

sağlar. Bununla birlikte herhangi bir patojene karşı gelişen immün yanıt doğal ve adaptif bağışıklık sistemini etkinleştirir, inflamasyona neden olur. Bu sitokinler, nöroinflamatuvar sürecin anahtarıdır. TLR4 kapsamlı nöronal hücre ölümüne aracılık eder (44). Kronik inflamasyon, oksidatif nitroztatif strese artışa neden olan uzun süreli mikrogliyal aktivasyon ile karakterizedir (45). Aşırı inflamatuvar yanıt, aynı zamanda mitokondriyal disfonksiyona, ROS üretimine neden olur ve sonuç olarak hücre hasarı, nöron kaybı gerçekleşebilir. İnflamasyon ve oksidatif stres iç içedir (Şekil 2.2) (46,47).



Şekil 2.2. SSS'de LPS'nin etki mekanizması

(47) numaralı kaynaktan yararlanılarak çizilmiştir. LPS: Lipopolisakkarit, CD 14: Cluster of differentiation, TLR: Toll benzeri reseptör.

Hayvanlara LPS verilmesi anoreksiya, hareketlerde azalma, kilo kaybı, azalmış keşifçi davranış, anksiyete, uyuklama ve genel davranışsal depresyon dahil

olmak üzere davranış paternine ve bilişsel bozulmaya neden olur (48,49). Bu semptomların birçoğunun, insanlarda nörodejeneratif hastalık semptomlarına çok benzer olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, LPS uygulaması, deney hayvanlarında nöroinflamasyonla ilişkili hastalıkları incelemek için sıklıkla kullanılır (49).

2.3. İnflamazomlar

Patojenlere karşı vücudun ilk savunma sistemini doğal bağışıklık sistemi oluşturur. Mikroorganizmalara karşı hızlı ve etkili bir savunma yanıtı kazanılmış bağışıklık devreye girmeden önce meydana gelir. Bunun yanı sıra kazanılmış bağışıklığın etkili bir şekilde görevini yapmasında önemlidir (50). Doğal bağışıklığın bileşenleri fiziksel bariyerler, kompleman sistemi, monosit/makrofajlar, eozinofiller, doğal öldürücü hücreler, nötrofillerdir (51). Patern tanıma reseptörleri, endozomal membranda, hücre yüzeyinde, sitoplazmada bulunur; çeşitli mikroorganizmalara ait yapısal elemanları tanır ve doğal bağışıklığın aktivasyonunu sağlar (50). Patern tanıma reseptörlerinin alt gruplarından biri olan TLR hücre içi ve hücre dışı yerleşimli olabilirken; NLR ve ALR'ler sitoplazmada bulunur. Sitoplazmada görev yapan NLR ve ALR gibi reseptörler patojen organizmaların yapısını ve oluşan tehlike sinyallerini tanır (48). Multiprotein kompleksi olan inflamazomu oluşturabilen reseptör alt tipleri NLR ve ALR proteinleridir (52).

İnflamazomlar, doğal bağışıklık mekanizmaları olup, inflamasyona yol açar ve programlanmış hücre ölümünün inflamatuvar bir formu olan piroptozisi indükler. İnflamatuvar sitokinlerin üretimini ve bunun sonucunda inflamasyon bölgesine bağışıklık hücrelerinin alınmasını sağlayan doğal bağışıklığın hücrel sinyal merkezleri olarak kabul edilir (53).

Patern tanıma reseptörlerinden AIM-2, NLRP1-3-6-9, NLR ailesi kaspaz aktivasyon ve alım alanı (CARD) içeren protein 4 (NLRC4) inflamazom oluşturabilen reseptörlerdendir (54). NLRP3 çok çeşitli hasarla ilişkili moleküler yapılar [damage-associated molecular pattern (DAMP)] ve PAMP ile; AIM-2 dsDNA'yla; NLRC4 *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Shigella flexneri* dahil olmak üzere birkaç gram negatif bakteriye ait olan proteinöz yapılar ile aktive edilir (55).

Uyarılara yanıt olarak oluşan inflamazom; sensör, adaptör protein olan apoptoz ilişkili benek benzeri protein [apoptosis associated speck like protein containing CARD (ASC)] ve efektör protein olan kaspazlardan oluşan sitozolik bir multiprotein kompleksidir (56).

Normalde doku hücrelerinde bu inflamazom bileşenleri düşük seviyelerde eksprese edilir, böylece aşırı aktivasyonu önlenir. Homotipik ölüm alanı (Death Domain-DD) etkileşimleri yoluyla aktive olur ve birleştirilir (57,58). İnflamasyonda CARD'dan, pirin alanından [pyrin domain (PYD)] sarmal filamentler halinde kendiliğinden birleştiği bulunmuştur (59). Bu inflamazom kompleksleri, doğal bağışıklık, inflamasyonda sinyalizasyon ve efektör işlevleri yerine getirir (60).

İnflamazom oluşturabilen PRR'ler, ASC adaptör proteini aracılığı ile efektör protein olan prokaspaz 1 ile etkileşir. Bunun sonucunda proinflamatuvar mediatörler salınır (52).

Literatürde yapılan birçok çalışmada NLRP3 inflamazom yolunun inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli olduğu vurgulanmıştır (61). İnflamazomlar; herhangi bir şekilde tetiklenmiş olan immün yanıtın kontrol altında tutulmadığı durumlarda inflamatuvar aktivite ile ilişkili birçok hastalıkta rol oynar (52). Ayrıca, inflamazom reseptörünün yapısal bileşenleri hücrelerin proliferasyonu, gen transkripsiyonu, tümör oluşumu gibi birçok olayda görev alır ve bunları düzenleyebilmektedir (62). İnflamazomların, nörodejeneratif hastalıkların başlamasında ve progresyonunda önemli bir role sahip olduğu çeşitli fare deneyi modellerinde gösterilmiştir (63).

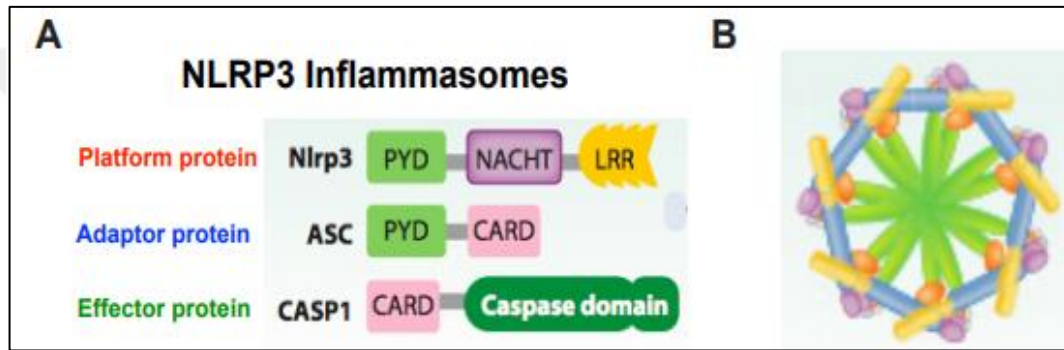
2.4. NOD (NükleotidBağlayıcı Oligomerizasyon Alanı) Benzeri Reseptör Proteini 3 (NLRP3) İnflamazomu Aracılı İnflamasyon

NLRP3, NLR ailesinin bir üyesi olup sitozolik bir reseptör proteindir. NLRP3 çok geniş özellikteki PAMP ve DAMP sinyallerini tanıma fonksiyonuna sahip olmasıyla diğer NLR proteinlerinden ayrılmaktadır (64).

NLRP3 inflamazomu, kaspaz-1 (Cysteinyll aspartate specific proteinase-1)'in aktivasyonuna yol açan multiprotein bir yapıdır. İnflamazom aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve IL-18) proteolitik aktivasyonuna aracılık eder

ve piroptozu programlar (65). NLRP3 inflamazomunun anormal düzeyde aktive olması, kriyopirin ilişkili periyodik sendromlar, alzheimer, diyabetes mellitus gibi bazı inflamatuvar bozukluklarla ilişkilidir (66).

NLRP3'ün yapısı aktif olmayan durumda iken 3 bölümden meydana gelmektedir. N-terminalinde pirin yapısı (PYD), merkezde nükleotid bağlayan oligomerizasyon alanı (NACHT), C-terminalinde lösinden zengin tekrarlayan kısmı (LRR) içerir. NLRP3'ün yapısında bulunan N-terminal PYD, ASC ile bağlanmayı sağlarken, NACHT otooligomerizasyon yapar. Patojen mikroorganizma ve tehlike ilişkili sinyalleri tanıyan kısım LRR bölgesidir (Şekil 2.3) (67,68).



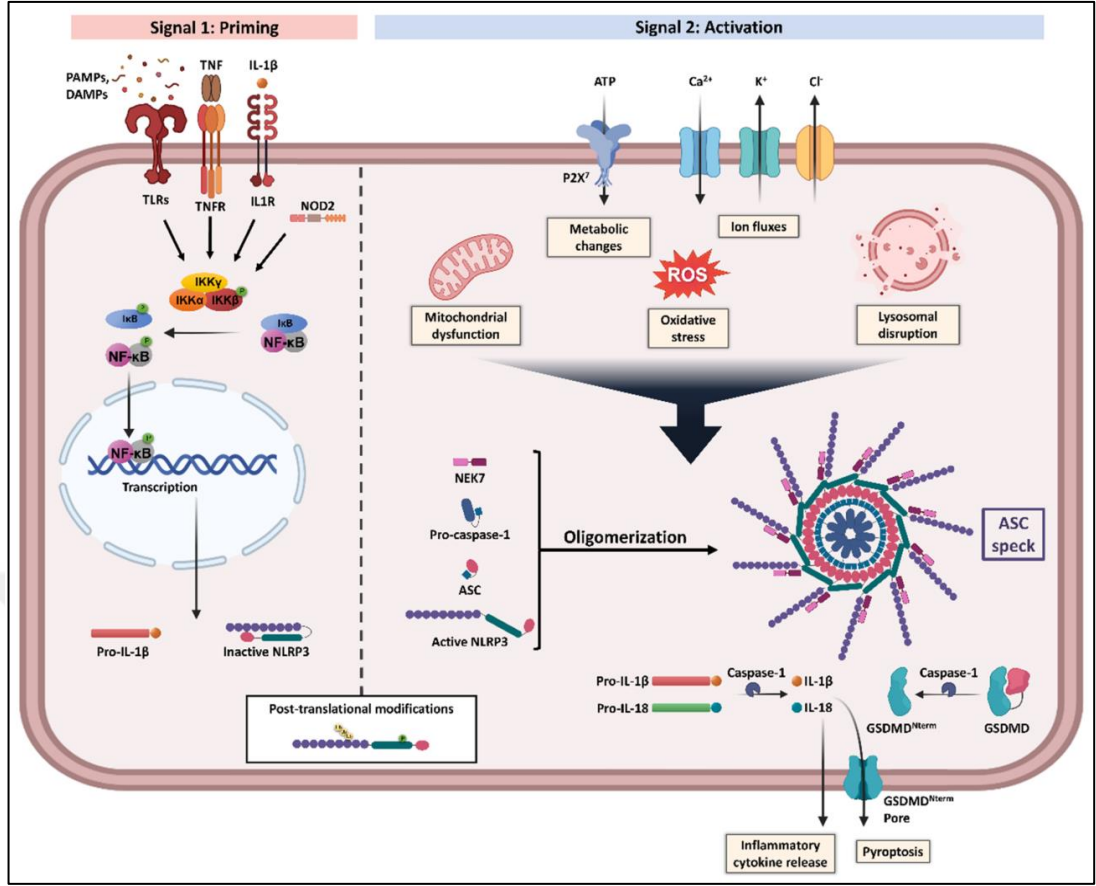
Şekil 2.3. NLRP3 inflamazom düzeneği

(A) NLRP3 inflamazom bileşenleri. NLRP3, C-terminal LRR alanları, bir merkezi NACHT alanı ve bir N-terminal PYD alanından oluşan üçlü bir yapı gösterir. (B) NLRP3 inflamazomunun 3 boyutlu yapısı. Bu multiprotein kompleksi, küresel bir "tekerlek" yapısı oluşturur (68). Yayıncı kuruluştan izin alınarak yayınlanmıştır. NLRP3: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon alanı benzeri reseptör proteini, ASC: Apoptoz ilişkili benek benzeri protein, CASP1: Kaspaz 1, PYD: Pirin alanı, NACHT: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon alanı, LRR: Lösinden zengin tekrarlayan alan, CARD: Kaspaz aktivasyon ve alım alanı.

NLRP3, doku hasarında salınan endojen moleküllerden olan ekstrasellüler ATP, okside mitokondriyal DNA, hücre içi potasyum kaybı tarafından aktive olabilmektedir (69). NLRP3, uyarılara doğrudan bağlanamaz, çünkü NLRP3 inflamazomu, farklı yapısal ve kimyasal özelliklere sahip birçok sinyalle aktive edilir (70). NLRP3'ün dolaylı olarak, uyarıların tarafından indüklenmiş olan ortak hücrel durumları algılaması ile uyarıldığı öne sürülmüştür. Bununla birlikte, bu hücrel olayların neler olduğu tartışmalıdır. NLRP3 inflamazom aktivasyonu iki aşamalı modelle kontrol edilmektedir (71).

NLRP3 inflamazomu aktivasyonu için kanonik yolda ilk aşama "hazırlama (sinyal 1)", ikinci aşama "birleştirme ve aktivasyon (sinyal 2)"dur. Hazırlama sinyali,

dinlenme durumundaki hücrelerde bulunan yetersiz NLRP3 bileşenleri seviyelerini yukarı doğru düzenlemek için bir dizi olay başlatır. Bu transkripsiyonel yukarı düzenleme, sitokin reseptörleri, TLR'ler ve NLR'ler dahil olmak üzere çeşitli PRR'ler yoluyla çeşitli DAMP'lar ve PAMP'lar tarafından indüklenebilir, böylece NLRP3'ün yanı sıra pro-IL-1 β gibi ana proinflamatuvar genlerin aktivasyonu ve gen transkripsiyonu içeren NF- κ B aktivasyonu ile sonuçlanır (4). İkinci aşama "aktivasyon sinyali (sinyal 2)" hücre dışı ATP, toksinler, RNA virüsleri dahil olmak üzere çeşitli uyaranlarla sağlanır. İyonik akış, mitokondriyal disfonksiyon, ROS üretimi ve lizozomal hasar dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler veya hücresel durumların NLRP3 inflamazomunu aktifleştirdiği bulunmuştur (66). Bununla birlikte, birçok yol kesiştiği ve birbiriyle ilişkili olduğu için, NLRP3 inflamazom aktivasyonu son derece karmaşıktır (72). Kaspaz-1 oluştuğu zaman Gasdermin D (GSDMD) de parçalanır ve elde edilen GSDMD amino terminali (GSDMD)^{Nterm} hücre zarına bağlanır, porlar oluşturur ve piroptozu indükler (Şekil 2.4) (73). Kanonik olmayan yol, GSDMD'yi parçalayan insanlarda kaspaz 4/5'i veya kemirgenlerde kaspaz-11'i aktive etmek için gram negatif bakteriler veya LPS tarafından aktive edilir (74).



Şekil 2.4. NLRP3 inflamazomu hazırlama (sinyal 1) ve aktivasyon (sinyal 2) sinyali (73).

Yayıncı kuruluştan izin alınarak yayınlanmıştır. PAMP: Patogen ilişkili moleküler yapılar, DAMP: Hasarla ilişkili moleküler yapılar, TLR: Toll benzeri reseptör, TNFR: Tümör nekroz faktör reseptörü, IL1R: İnterlökin 1 reseptörü, NF-κB: Nükleer faktör kappa beta, IL-1β: İnterlökin-1beta, IL-18: İnterlökin 18, NLRP3: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör proteini, NOD2: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 2, NEK: NIMA-ilişkili kinaz 7, P2X7: P2X pürinoseptör 7, ROS: Reaktif oksijen türevleri, ASC: Apoptoz ilişkili benek benzeri protein, GSDMD: Gasdermin D, GSDMD^{Nterm}: Gasdermin D amino terminali.

Toll benzeri reseptör aktivasyonu sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra NF-κB gen transkripsiyonu aracılığı ile NLRP3'ün kendisinin transkripsiyonu da artar (64). Hücre membranında yerleşmiş olan katyon kanalları ile kenetli iyonotropik P2X7 reseptörlerinin hücre içi potasyum kaybı ve ATP aracılı uyarılmasıyla NLRP3 aktive olur (75).

NLRP3'ün P2X7 reseptörleri ile aktivasyonu sonucunda NLRP3'e ASC proteini bağlanır buna da prokaspaz-1 bağlanarak inflamazom yapısı meydana gelir. Bunların sonucunda prokaspaz-1, kaspaz-1'e aktive olur. ASC proteini yapısındaki pirin alanıyla NLRP3'te bulunan pirin alanına, CARD proteini ile prokaspaz-1'in

CARD proteinine bağlanarak kaspaz-1'in oluşumuna aracılık etmektedir. Sonuç olarak kaspaz-1 aktive olduğu zaman IL-1 β ve IL-18 aktif formuna dönüşür (64,76-78).

2.5. Nöroinflamasyonda Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)

Sitokinler inflamasyonun merkezinde olup hem bağışıklık sistemi hem de sinir sistemi üzerinde etkileri vardır. Ayrıca hem fizyolojik hem de patolojik süreçler esnasında beyinde değişikliklere neden olabilirler (79). Özellikle inflamatuvar süreçlerden sonraki uzun dönemde, sistemik inflamasyonu takiben davranışsal ve bilişsel fonksiyonlarda sitokinlerin rolünün daha iyi anlaşılması, önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (80).

Tümör nekroz faktör- α , doğal bağışıklıkta yer alan proinflamatuvar bir sitokin olarak kabul görmektedir (81). Tümör nekroz faktör- α 'nın SSS hücrelerinde, sinaptik plastisite, öğrenme, hafıza, uyku gibi durumlar üzerinde düzenleyici etkisi vardır (82,83). Patolojik koşullar altında başta mikroglialar olmak üzere astrositlerden de yüksek oranda TNF- α salgılanır ve çeşitli nörolojik bozuklukların patogeneğinde suçlu bulunan nöroinflamatuvar cevabın önemli bir parçasını meydana getirir (79,84-86).

Tümör nekroz faktör- α 'nın R1 ve R2 olmak üzere iki reseptörü vardır. TNF- α , R1 reseptörü ile etkileşerek Fas aracılı ölüm alanı (FADD) aracılığıyla hücre ölümüne aracılık ederken, R2 reseptörü ile etkileşerek NF- κ B transkripsiyonu üzerinden inflamasyona neden olur (87,88). Önemli bir düzenleyici transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, inflamasyonda yer alan genleri indüklemeye önemli bir rol oynar (89). Nükleer faktör κ B inaktif durumda iken sitozolde bulunur; çeşitli inflamatuvar uyaranlar, sitokinler, oksidan ajanlar, mikroorganizmalar NF- κ B'nin DNA ile bağlandığı çekirdeğe göç etmesine, aktive olmasına ve birçok proinflamatuvar genin transkripsiyonuna yol açar (90,91). Dolayısıyla, TNF- α ile indüklenen NF- κ B'nin bu yolları, TNF- α 'nın IL-6 ve IL-8 gibi diğer inflamatuvar sitokinleri indüklemeye ve interferonlarla sinerji oluşturma yeteneğini açıklar (87). Tümör nekroz faktör- α 'nın bu biyolojik işlevleri, nöroinflamasyondaki rolünü belirgin hale getirir ve nöroinflamasyonun ana sitokini olarak kabul edilebilir (92).

2.6. Nöroinflamasyonda İnterlökin-18

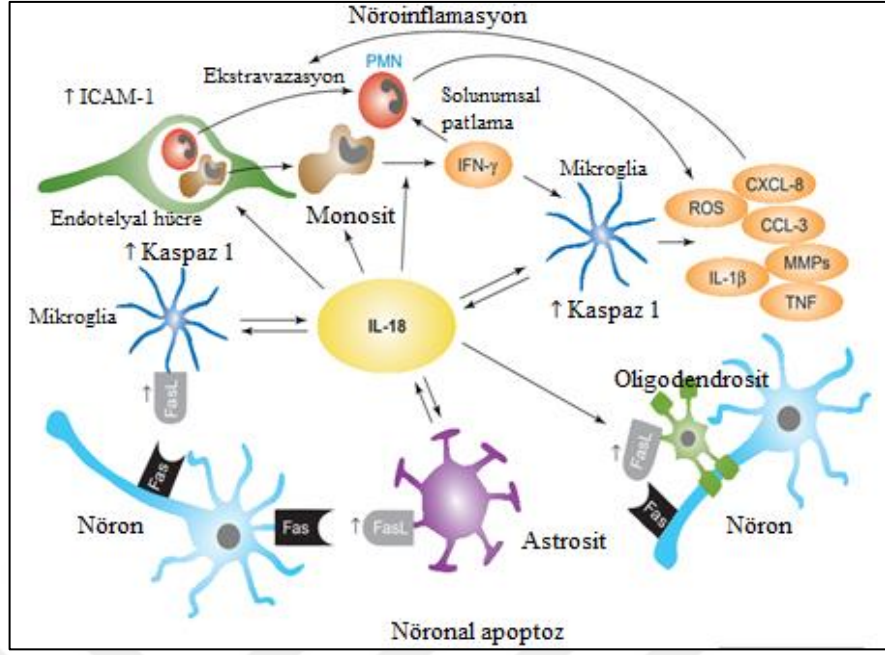
Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-18, IL-1 ailesindendir ve interferon gama indükleyici faktör olarak bilinir (93). İnterlökin 18, aslında bir proteaz olan IL-1 dönüştürücü enzim (kaspaz-1) ile aktif formuna dönüşür (94).

İnterlökin 18, makrofaj ve T-lenfositten interferon gama (IFN- γ) salınımını indükler. İnterlökin 18; IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α salgılanmasını indüklerken, IL-10 salınımını inhibe eder. İnterlökin-18; makrofajlar, periferik kan mononükleer hücreleri, mikroglialar başta olmak üzere astrositler, nöronlar ve ependimal hücreler tarafından da sentezlenmektedir (95,96).

İnterlökin 18'in mikrobiyal infeksiyonlar, fokal serebral iskemi, wallerian dejenerasyonu, hipoksik-iskemik, hiperoksik ve travmatik beyin yaralanmaları ile ortaya çıktığı deneysel ve klinik çalışmalar ile gösterilmiştir (97).

Yakın zamanda IL-18 reseptörünün hipokampus, hipotalamus ve korteks gibi çeşitli beyin bölgelerinde eksprese edildiğinin gösterilmesi, IL-18'in bu bölgelerdeki fonksiyonları modüle etmede etkisi olabileceğini göstermiştir (98). Beyindeki IL-18'in normal işlevi bilinmemekle birlikte, SSS gelişiminde bir rolü olabileceği, beyinin immün ve inflamatuvar süreçlerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (99,100).

İnterlökin 18'in, son zamanlarda davranışsal ve bilişsel etkileri olan nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif süreçlerde anahtar bir sitokin olduğu düşünülmüştür (97,101).



Şekil 2.5. IL-18'in nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona aracılık etme hipotezi

(97) numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir. ICAM-1: İntersellüler adezyon molekülü 1, ROS: Reaktif oksijen türevleri, IL-1 β : İnterlökin-1beta, TNF: Tümör nekroz faktör, MMPs: Matriks metalloproteinaz, CCL-3: Kemokin ligand 3, CXCL-8 (IL-8): Kemokin ligandı 8, IFN- γ : İnterferon gama, PMN: Polimorfonükleer lökosit, FasL: Fas ligandı.

Nöropatolojik durumlarda IL-18'in, inflamatuvar yanıt ve sitotoksik yolak üzerine düzenleyici etkisi vardır. Mikroglia, IL-18'in temel kaynağıdır. İnterlökin 18, kaspaz-1 gen ifadesini artırır. Tümör nekroz faktör- α , IL-1 β gibi diğer proinflamatuvar sitokinleri ve matriks metalloproteinaz (MMPs)'ı artırır. Polimorfonükleer lökositlerin, monositlerin/makrofajların ekstravazasyonu, endotelial hücrelerde intersellüler adezyon molekül-1 [intercellular adhesion molecule (ICAM-1)]'in IL-18'e bağlı up regülasyonu, CXCL-8 (IL-8, kemokin ligandı 8) ve kemokin ligand 3 (CCL-3) gibi bu hücrelerin kemokinlerinin mikroglial üretimi ile güçlendirilir. IL-18, polimorfonükleer lökositlerin solunum patlamasını ve degranülasyonunu indükler, bu da lokal nörotoksik enzimlerin salınımına yol açar. Monositler tarafından salgılanan IFN- γ ile stimülasyon üzerine, mikroglia ve polimorfonükleer lökositlerden, nöroinflamasyona daha fazla katkıda bulunacak olan ROS'u serbest bırakırlar. Ek olarak mikroglia, oligodendroglia ve astrositler IL-18 tarafından indüklenen FasL (Fas ligandı)'yi eksprese eder, böylece inflamatuvar koşullar altında Fas aracılı apoptotik hücre ölümünü artırır (Şekil 2.5) (97).

2.7. Hipokampus ve Bilişsel Fonksiyonlar

Hipokampal yapı; hipokampus, dentat gyrus, subikulum ve entorhinal korteksten oluşan beyindeki bir bölgedir. Hipokampus yapısı, ammon boynuzu [(cornu ammonis (CA)] denilen dört esas bölgeden (CA1-CA4) meydana gelir (102,103). Hipokampus yapısı lateral ventrikülün temporal boynuzu komşuluğunda olup, medial temporal lobta yerleşim gösterir, temporal lobun uzantısıdır (102,104).

Hipokampusün alt kısımları birbirleriyle bağlantı gösterir (105). Hipokampal yapı, SSS'nin diğer kısımlarıyla entorhinal korteks aracılığıyla bilgi iletimi gerçekleştirir. Subikulum, hipokampüste bir geçiş bölgesi olup entorhinal korteks ile bağlantı sağlar (102,103). Hipokampüsteki bilgi genel olarak tek yönlü glutamaterjik bir yolu takip eder (105).

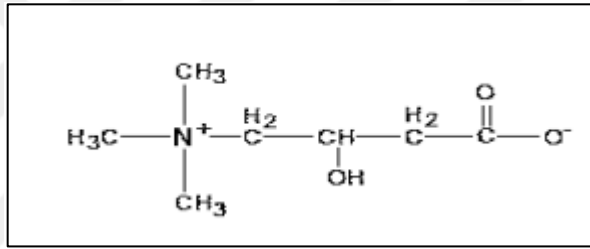
Hipokampusün en önemli fonksiyonlarından biri öğrenme ve hafızadaki yeridir (103,105,106). Hipokampusün uzun süreli hafızanın meydana getirilmesinde kortikal kısımlardan bilgi alıp, bunları birleştirdiği bildirilmiştir (106). Bunların yanı sıra, hipokampus olayların nerede meydana geldiği ve birbirleriyle ilişkisini izlemeye yarayan mekansal bellekte görev almaktadır; bu sebeplerden ötürü, kognitif haritalandırma oluşturulmasında önemli görevler almaktadır (103).

Nörobilimsel araştırma alanında LPS modelinin geniş bir kullanımı vardır. Nöroinflamasyon, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili önemli bir patomekanizmadır (107). Lipopolisakkarit etkili bir endotoksin olup SSS'deki nöroglial hücreleri aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerden başta TNF- α olmak üzere birçok sitokin salınımına yol açar (108). Bu sitokinlere cevaben çeşitli ROS'lar üretilip oksidatif stres durumu da meydana gelir (109). Sonuç olarak, mikrogliyal aktivasyon ve sitokin salınımı sinaptik plastisite bozuklukları ve nöronal hücre ölümü ile sonuçlanan bir dizi olaya neden olur ve sonunda bellek ve bilişsel işlev bozukluğunu tetikleyebilir (110). Literatür incelendiğinde LPS'nin santral sinir sisteminde hipokampüste hasar, bilişsel fonksiyonlarda ve sinaptik plastisitede bozulmaya neden olduğu bilinmektedir. Bu süreç sonunda asetilkolin salınımında bozulma, hipokampüste gliosis meydana gelir. LPS'ye bağlı nöroinflamasyon oluştuğunda da hipokampal bağımlı öğrenme ve hafızayı değerlendiren öğrenme ve nörodavranış deneylerinde bu nedenle başarısız sonuçlar elde edilebilir (111).

Hipokampusün etkilendiği durumlarda, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilemediği, yeni bellek bileşenleri meydana getirmenin ve meydana gelmiş olanın korunmasının zorlaştığı; ayrıca hafıza kaybı geliştiği gözlenmiştir (112).

2.8. Karnitin

L-karnitin 20.yy'ın başında kas dokusunda izole edilmiştir (113). Kimyasal yapısı 1927'de belirlenmiş olup L-karnitinin hidroksil grubu β-pozisyonundadır. Karnitin temel yapıtaşı olarak aminoasitlere benzemektedir ancak proteinlerin yapısına katılmadığından aminoasitlerden farklılık gösterir. Bu nedenle aslında kuarternar amin türevi olduğu düşünülür. Biyokimyasal formülü 3-hidroksi-4-N-trimetilaminobutirat şeklindedir (Şekil 2.6) (114).



Şekil 2.6. L-karnitinin kimyasal yapısı (gama-trimetil amino beta hidroksi bütirik asit)

2.8.1. L-Karnitinin Sentezi

Karnitinin %75'i besinlerle alınırken, %25'i endojen olarak sentez edilir. Bitkisel besinlerin tersine hayvansal besinler L-karnitin açısından daha zengindir. Karnitin insan vücudunda endojen üretilebildiği için esansiyel değildir, endojen üretiminden sorumlu organ temel olarak karaciğerdir; ayrıca böbrek, testis ve beyinde de karnitin üretilir (115).

Çizgili kaslar ve düz kas özelliği taşıyan kalp kasında karnitin tüketimi fazla olmasına rağmen karnitini sentezleyemez. Bunun nedeni kalp kasında ve iskelet kasında sentez için gerekli olan enzimlerden γ-bütirobetain hidroksilaz'ın olmamasıdır. γ-bütirobetain hidroksilaz'ın bulunduğu yerler karaciğer, böbrekler, beyin ve testisler (115,116).

Şekil 2.7’de gösterildiği gibi, L-karnitinin endojen üretilmesi için esas olarak gerekli aminoasitler lizin ve metiyonindir. Bu aminoasitler dışında askorbik asit, demir, piridoksin ve niasin de gereklidir. L-karnitinin sentezinde metil içeren gruplar metiyoninden, karbon zincirleri ve nitrojen ise L-lizinden temin edilir (117). Bu maddelerin eksikliğinde sentez azalır, metiyonin üretilmesi için gerekli olan kobalamin vitamini eksikliğinde L-karnitinin yapısı bozulur (114).

Endojen üretilen L-karnitin sentezi vücutta beş aşamada olur. Bunlar şu şekildedir (118);

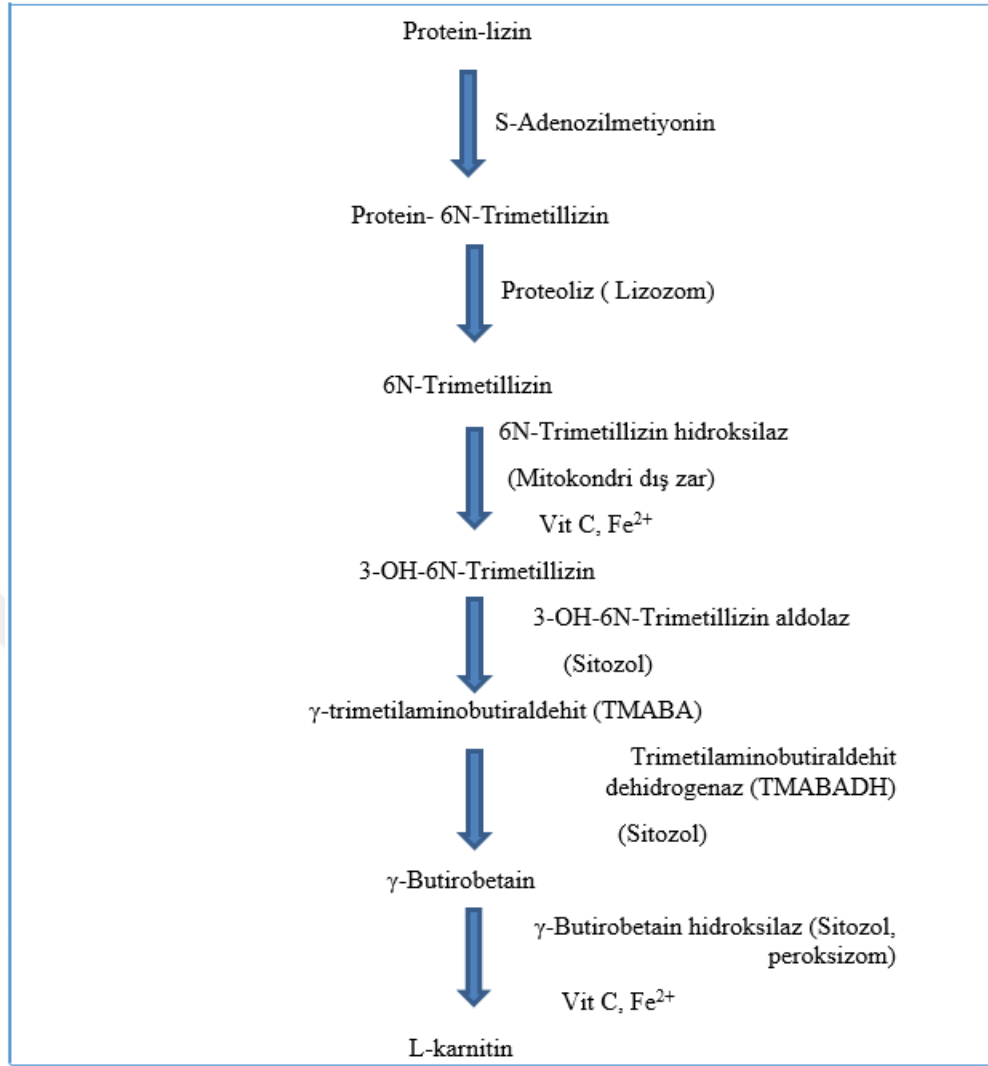
Metil grubu vericisi S-adenozil metiyonin olup, lizinin metilasyonu sonucunda 6-N-trimetillizin oluşur. Bu reaksiyon dizisinin başlangıcında trimetillizin proteine bağlı olarak bulunur. Proteinlerden proteolizle trimetillizin ayrılır.

İkinci aşamada, 6-N-trimetillizinin 3. karbonunun hidroksilasyonu sonucu sitoplazmada 3-OH-6-N-trimetillizin şekillenir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için askorbik asit ve demir (+2) gereklidir.

Üçüncü reaksiyon ürünü γ -trimetilaminobutiraldehit’tir. Glisinin ayrılmasıyla oluşur. Bu reaksiyonda piridoksine ihtiyaç duyulur.

Dördüncü reaksiyon ürünü aldehitin oksidasyonu ile γ -butirobetain (deoksi L-karnitin) oluşur. Reaksiyonlar arasında oluşan γ -butirobetain (deoksi L-karnitin) L-karnitinin prekürsörüdür.

Deoksi L-karnitinden, γ -butirobetain hidroksilaz enzimiyle endojen üretilen L-karnitin meydana gelir. Bu reaksiyonda askorbik asit ve ferröz demir kullanılır (Şekil 2.7) (118,119).



Şekil 2.7. İnsanda karnitin biyosentezi. (119) numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.8.2. L-Karnitinin Emilimi

L-karnitin, duodenum ve jejunumdan aktif taşıma ile absorbe edilir. Absorbe edilen L-karnitin asetillenir. L-karnitin serbest halde kana verilebileceği gibi ester şeklinde de verilebilir. Kanda % 80'i serbest formda kalanı ise ester (açılkarnitin) şeklinde bulunur (120). Böbreklere gelen karnitin glomerüler filtrasyona uğrar ve büyük bir kısmı tübülerden reabsorbe edilir. Böbrekte tübüler reabsorbsiyona uğrayan L-karnitin miktarı, vücudun ihtiyacına ve serum konsantrasyonuna göre değişmektedir (121). Karnitin metabolize edilemez ve idrarda hem serbest hem açılkarnitin olarak atılır (122). Aynı zamanda süt ve az miktarda da gaita ile atılır (120,123).

Vücutta karnitinin neredeyse tamamı iskelet kaslarında ve düz kas yapısında olan kalp kasında depolanır (124). Karnitinin ortalama %2'si ise karaciğer, böbrek, beyin, eritrosit ve plazmada bulunabilir (125).

2.8.3. L-Karnitinin Biyolojik Fonksiyonları

L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerini enerji metabolizmasında görevli organel olan mitokondriye taşır. Mitokondride yağ asitleri okside edilerek enerji açığa çıkar (126). Kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin mitokondrideki oksidasyonu L-karnitinden bağımsız gerçekleşebilirken, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrideki oksidasyonu L-karnitine bağımlıdır. Uzun zincirli yağ asitlerinin L-karnitinden bağımsız okside edilememesinin nedeni ise mitokondri membranının uzun zincirli yağ asitlerini geçirecek yapıda olmamasıdır ve bu membranın L-karnitin ile geçilebilmesidir (127,128).

Yağ asit moleküllerinin dokuda katabolizması temel olarak üç basamakta olur. Bu üç aşama; yağ asitlerinin aktive edilmesi, mitokondriye taşınması ve mitokondride okside edilmesidir. Yağ asitlerinin aktive edilmesi basamağında uzun zincirli yağ asitleri açıl-KoA sentetaz enzimiyle uzun zincirli açıl-KoA'ya çevrilir. Yağ asitlerinin katabolizmasındaki ikinci basamakta ise aktivasyonu gerçekleşen yağ asitler, mitokondrinin dış membranında bulunan karnitin palmitoiltransferaz-I [carnitine palmitoyltransferase I (CPT I)] enzimi yardımı ile karnitine aktarılır ve bunun sonucunda uzun zincirli yağ açıl-KoA, açilkarnitine çevrilir. Yağ asitlerinin katabolizmasındaki üçüncü basamakta da açilkarnitin molekülü mitokondriyal karnitin-açıl karnitin translokaz [carnitine-acylcarnitine translocase (CAT)] enzimi tarafından mitokondri iç zarından geçer. CAT enzimi kotransporterdir; yani açillenmiş karnitini ve serbest karnitini aynı anda zıt yöne taşıma görevi yapar. CAT enzimi, açıl karnitini mitokondrinin matriksine taşır, serbest halde bulunan karnitin de mitokondri matriksinden sitozole taşınmasını sağlar. Mitokondrinin iç zarının iç tarafında yerleşmiş olan karnitin palmitoiltransferaz-II [carnitine palmitoyltransferase II (CPT II)] enzimi açilkarnitinde bulunan uzun zincirli yağ asidi molekülünü Koenzim A'ya verir ve açıl-KoA oluşumunda görev alır. Açıl-KoA'nın β -oksidasyonu sonucu meydana gelen asetil-KoA enerji metabolizmasında görev almak için krebs siklusuna katılır. Beta oksidasyonda ve asetil-KoA'ların krebs

sikluslu basamaklarında kullanılmasıyla oluşan redükte halde bulunan nikotinamid adenin dinükleotid [nicotinamide adenine dinucleotide hydride (NADH)] ve redükte flavin adenin dinükleotid [dihydroflavine adenine dinucleotide (FADH₂)]'ler elektron taşıma sistemi ve oksidatif fosforilasyonda kullanılır. Bunun sonucunda ATP üretilir (129,132).

L-karnitin yağ asidi β-oksidasyonunu hızlandırır, bunun sonucunda asetil-KoA miktarı artar. Karnitin, toksik asetil-KoA moleküllerini tamponize eder ve asetil-KoA/KoA oranını regüle eder (113). Bu oran birçok alanda görevli mitokondriyal enzim fonksiyonlarının regülasyonunda görevlidir. Bunlar üre döngüsü, krebs sikluslu, glukoneogenez, yağ asidi oksidasyonudur (113,133).

L-karnitinin hücre içi metabolizmada görev aldığı bazı yerler şu şekildedir;

Peroksizomal beta oksidasyona katılır (113).

Karnitin, antiapoptotik etki gösterir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğundan dolayı mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımı olduğunda apoptoz başlamaktadır. Bu nedenle, L-karnitinin antiapoptotik etkisinin mitokondriyal disfonksiyonda iyileşmeye bağlı olduğu düşünülmektedir (134).

Antioksidan etkiye sahiptir ve serbest radikal çöçülüğü yapar (6) . L-karnitin, ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek serbest radikal üretimini önlemektedir ve lipit zar stabilizasyonunda görev alır. Nitrik oksit sentetaz (NOS) aktivitesini de bloke eder (5,135,137). L-karnitinin radikal süpürme mekanizması, a-karbon üzerinde oluşan bir radikali konjugasyon ile stabilize eden karbonil grubu etkisiyle açıklanabilir. Süperoksit radikali, lipidlerde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasarı indükleyen H₂O₂ veya hidroksil radikaligibi diğer ROS oluşumunda önemli bir rol oynar (138). L-karnitinin ayrıca superoksit, H₂O₂ ve hidroksil radikalini temizleme yeteneğine sahip olduğu, Fenton reaksiyon sisteminde hidroksil radikal üretimini engelleyebileceği ortaya çıkmıştır. L-karnitin glutatyon peroksidaz (GPx), superoksit dismutaz (SOD), katalazı koruyabilmektedir (139).

Uzun zincirli açillerin mitokondriden dışarı yönde transportu karnitinin görevlerinden biridir, bunun sonucunda mitokondri içinde birikmiş olan açillerin enerji metabolizmalarını olumsuz yönde etkilemesi önlenmiş olur (140). Açıl-KoA'nın açilkarnitine dönüşmesi, toksik açıl gruplarının detoksifiye edilmesinde

önemlidir (141). Uzun zincirli açıl-KoA'lar mitokondri içinde birikirse adenin nükleotid translokaz enziminin aktivitesi baskılanır ve ATP mitokondrinin dışına taşınmaz (140). Bunların yanı sıra, uzun zincirli açıl-KoA'lar membranlarda sabun etkisi oluşturarak hasar oluşturabilir (113).

İskemi varlığında karnitin düzeylerinin azaldığı, çeşitli iskemi ile ilgili çalışmalarda, karnitin takviyesi sonucunda hücrelerin metabolik hızının ve dokuların oksijen tüketiminin arttığı gözlenmiştir (142). İskemi sırasında mitokondri enerji üretimi yavaşlamaktadır. İskemik durumda karnitinin faydası, β -oksidasyonun yavaşlamasıyla birikmiş olan açıl-KoA ile reaksiyona girip açıl grubunun iskemik hücrenin dışına çıkarılmasıdır. Mitokondri içindeki açıl-KoA miktarı azalır; adenin nükleotid translokaz serbest hale geçer, ATP ve KoA seviyesi yükselir; asetil-KoA/KoA oranı azalır; krebs siklusu ve oksidatif yolak kullanılır. Laktat üretimi azalır ve asidoz gerilemiş olur. Ayrıca, L-propiyonil karnitin, D-propiyonil karnitin, fenton reaksiyonu ile hidroksil radikal üretimini durdurur. Sonuç olarak hücre hasarı azalır (121,143).

İndüklenebilir NO sentaz, immünolojik uyarılarla uyarılır. İndüklenebilir NO sentaz, uzun süreli ve şiddetli NO salınımına neden olur (144). Diyabetes mellitus, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların patogeneze katkıda bulunur (145,146). L-karnitin'in iNOS'u ve NF- κ B aktivasyonunu baskılamasında, L-karnitin'in iNOS gen ifadesi üzerine baskılayıcı yönünün transkripsiyonel seviyede olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. L-karnitin'in antiinflamatuvar etkisi de vardır (5).

L-karnitin aerobik metabolizmayı artırır, spor yapanlarda kas ağrısı hissinin azalmasına katkıda bulunarak uzun süreli egzersiz yapmasına olanak sağlar. L-karnitin, mitokondride yağ açilleri bağlar açilkarnitin oluşturur. Serbest KoA açığa çıkartır. Serbest KoA artar, krebs siklusu aktive olur. Aerobik metabolizma aktive olduğu için pirüvat laktata dönemez, yorgunluk hali gecikir (142,147,148).

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2)/hem oksijenaz 1 (HO-1) sinyal yolunun aktivasyonu, hücrel antioksidan stresi düzenler, antiinflamatuvar ve sitoprotektif etkilere yol açar (149). Normal koşullar altında Nrf2, sitoplazmada Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'e (Keap1) bağlanır. Stres koşullarında Nrf2,

Keap1'den ayrılır, çekirdeğe göç eder ve HO-1 gibi sitoprotektif antioksidan enzimlerin promotör bölgesindeki antioksidan tepki elemanlarına (ARE) bağlanır (150). Nrf2/HO-1 sinyal yolunun aktivasyonu aynı zamanda NLRP3'ün aktivasyonunu da inhibe eder, böylece IL-1 β ekspresyonunu azaltır ve antiinflamatuvar ve sitoprotektif etkiler gösterir (151.) L-karnitin, Nrf2/Keap1 sinyal yollarını aktive ederek, HO-1/ glutatyon sistein ligaz değiştirici alt biriminin (GCLM) aktivitesinin modülasyonunu ve TGF- β 1 ifadesini azaltarak aracılık ettiği antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerini vurgulayan yayınlar mevcuttur (149). TGF- β 1 GPx, katalaz ve SOD dahil olmak üzere birçok antioksidan enzimin ekspresyonunu inhibe ederek ve en bol hücre içi serbest tiyol olan glutatyon konsantrasyonunu düşürerek ROS seviyelerini artırır (152,153).

Canlı hücrelerde sürekli olarak akut veya kronik strese yol açan nedenler tarafından hasar olduğu iyi bilinmektedir. Çevresel değişikliklere uyum sağlamak ve farklı yaralanma türlerinde hayatta kalmak için ökaryotik hücreler, çeşitli stres biçimlerini algılayan ve kontrol eden farklı tepki ağları geliştirmiştir (154). Bunlardan biri olan ısı şoku yanıtı, çok çeşitli toksik koşullar altında hücrenin hayatta kalması için gerekli olan evrensel bir temel mekanizma olarak büyük ilgi çekmiştir. Bununla uyumlu olarak, beyinde, çeşitli stres ve nöronal hasarlanma biçimlerini tespit ve kontrol etmede aktif olarak çalışan ısı şoku proteinleri (HSP), sirtuin ve tiyoredoksin dahil olmak üzere entegre hayatta kalma tepkileri mevcuttur (155). Isı şok proteinleri nöronal sağkalımda ve inflamasyonda sinyalleşme süreçlerinde görev almakta olup inflamatuvar yanıtta regülasyon ve nöroprotektif yetenekleriyle önem kazanmaktadır. Ancak nöroinflamasyon süreçleri üzerindeki etkileri henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen çeşitli çalışmalarda immün regülasyonda rol aldığı, antioksidan ve antiapoptotik olduğu, nöronal sağkalımda görev aldığı gösterilmiştir (156,157).

Karnitin vitagen aktivasyonuna yol açarak HSP'lerin, tiyoredoksinlerin ve sirtuinlerin sentezini düzenler. Karnitin redoks sinyaline katılımı ve transkripsiyon faktörlerini (Nrf2, peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör α , NF- κ B vb.) düzenlemesinin yanı sıra vitagen ağını aktive etmesi, L-karnitin ve türevlerinin antioksidan etkisinden sorumlu ana mekanizmadır (158).

Sinaptik plastisite, sinapslarda hem yapısal hem de işlevsel olarak meydana gelen, öğrenmeyi ve hafızayı etkileyen değişiktir (159). Bilişsel işlev bozukluğunun sinaptik plastisitedeki azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (160). Siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB), öğrenme ve hafızada kritik bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Fosforilasyon (pCREB) ile aktive edildikten sonra, hafıza oluşumu ve sinaptik plastisiteden sorumlu olan beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) transkripsiyonunu başlatır. BDNF ve/veya pCREB'in azaltılmış ifadesi, sinaptik plastisiteyi azaltabilir (161). Ek olarak, NF-κB aktivasyonunun, BDNF üretimini engelleyerek ve dolayısıyla sinaptik plastisiteyi azaltarak bilişsel fonksiyon bozukluğunu indüklediği bulunmuştur (162). Karnitin BDNF düzeylerinin arttırması, NF-κB sinyal yolunun inhibisyonuna yol açması, asetilkolin sentezini arttırması ile sinaptik plastisiye koruduğu bilinmektedir. Mekansal hafıza ve nörodavranış deneylerinde performansta iyileşme gözlenebilir (163).

2.9. Nöroinflamasyon ve Oksidatif Stres

Lipopolisakkarit, TLR tarafından tanınarak NF-κB sinyal yolunun aktifleşmesine neden olup sistemik inflamatuvar yanıt oluşturur. İnflamasyon; oksidatif stres, DNA hasarı oluşturarak mikrogliaları uyarır. Bunun sonucunda mikroglialar fagositoz, inflamatuvar sitokin salınımı, apoptoz ve ROS üreterek nöroinflamasyona yol açar. Reaktif oksijen radikalleri nöronlarda, mitokondriyal işlev bozukluğu yaparak ROS üretimine ve doku hasarına katkıda bulunur. NF-κB sinyal yolu, oksidatif stres ile ortaya çıkan mitokondri işlev bozukluğu sonucunda aktifleşebilmektedir. Bazı nörodejeneratif hastalıkların temelinde mitokondriyal işlev bozukluğu olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal hasarı hedef alan tedavi yaklaşımlarının da nöroinflamasyonu azaltacağı düşünülmektedir. İnflamatuvar süreçlerde proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile mikrogliyalardan iNOS eksprese edilir. Önemli bir nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer hastalığında iNOS aktivitesinin artışı ve NO düzeylerindeki artış sonucu proteinlerin yapısı bozularak nöronal dokularda hasar oluşur (22).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Biriminin TTU-2022-8650 proje numarasıyla desteklediği çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Üretimi Deneysel Araştırma Merkezi ile Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız, SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan, 17.02.2022 tarih ve 23 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurul kurallarına uygun şekilde yapılmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Wistar Albino türü 32 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce hayvanların gerekli sağlık kontrolleri yapıp, canlı ağırlıkları belirlenmiştir. Deney süresince sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ve 23°C sıcaklık koşullarında tutulmuş, yeterli miktarda yem ve suyla beslenmişlerdir. Günlük kafes temizlikleri yapılarak kafeslerin altına odun talaşı koyulmuştur.

Sıçanlar 4 gruba ayrılmış olup Euro tip 4 kafeslerde barındırılmıştır. Kontrol (K, n=8), Lipopolisakkarit (LPS, n=8), LPS+Karnitin (KarLPS, n=8) ve Karnitin (Kar, n=8) olacak şekilde ayrılmıştır (Tablo 3.1). Altı aylık, kiloları 250-400 gram arasındaki sıçanların bakımı SDÜ Deney Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır.

Tablo 3.1. Deney grupları

	Grup adı	Sayı(n)
Grup 1	Kontrol (K)	8
Grup 2	Lipopolisakkarit (LPS)	8
Grup 3	Lipopolisakkarit+Karnitin (KarLPS)	8
Grup 4	Karnitin (Kar)	8



Resim 3.1. Kafeste barındırılan sıçanlar

3.1.2. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit, sıçan nöroinflamasyon modelini tetiklemek için çokça kullanılmaktadır. Tek doz LPS uygulamasının bile SSS'de aylarca süren inflamasyon oluşturduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (164,165). Bununla birlikte, standart bir uygulama prosedürü yoktur. Tekrarlanan aralıklı LPS uygulaması ile modellenen kronik tekrarlanan periferik inflamasyonun bilişsel fonksiyonlar üzerine etkilerini araştıran çalışma az sayıda mevcuttur. Sıçanlardaki inflamasyon yükünün bilişsel işlev üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmamızda, literatüre katkıda bulunmak için yetişkin sıçanları aralıklı LPS endotoksinine maruz bıraktık (166,167). Sıçanların kanına veya vücuduna yüksek seviyelerde endotoksin uygulanması, mikrogial aktivasyonu, bellek bozukluğunu, beyin sinapslarının ve nöronların kaybını indükler (168). Ağırlıklarına göre, LPS için belirlenen 3 mg/kg dozunda, sıçanların o gün alacağı dozlar hesaplanmıştır. Yüksek doz LPS (Sigma-Aldrich, USA, L2630; Escherichia coli O111:B4) 3 mg/kg dozda ip olarak deneylerin ilk günü LPS ve KarLPS gruplarına uygulanmıştır (169). Daha sonra LPS birer hafta arayla 3 kez daha düşük doz 250 µg/kg olarak LPS ve KarLPS gruplarındaki sıçanlara ip enjekte edilmiştir (170,171). Kontrol grubuna da aynı hacimde ip serum fizyolojik verilmiştir (169). Enjeksiyonlar deney hayvanları laboratuvarında veteriner hekim gözetiminde yapılmıştır. Son LPS dozundan 1 hafta sonra 7 aylık olan sıçanlar öğrenme, nörodavranış, lokomotor aktivitenin test edileceği "Öğrenme

laboratuvarına" taşınarak adapte olmaları için 3 gün beklenmiştir. Öğrenme Laboratuvarı "Deney Hayvanları Laboratuvarı"na bitişik binada bulunan, 2 odadan oluşan bir laboratuvardır. Bir oda barınma ve beslenme için kullanılmış olup diğer odada öğrenme, hafıza, nörodavranışsal parametreler ve lokomotor aktivitenin değerlendirildiği sistemler mevcuttur.

3.1.3. L-Karnitin

L-karnitin için belirlenen günlük dozumuz 300 mg/kg (Sigma-Aldrich, USA, C0283) olup KarLPS ve LPS gruplarına kilogramlarına göre hesaplanan miktarda ip enjekte edilmiştir (169). Lipopolisakkaritin ilk doz uygulamasından bir gün sonra, karnitin enjeksiyonu başlamış olup 28 gün boyunca subkronik karnitin uygulaması yapılmıştır (172,174). Lipopolisakkarit uygulaması sonrası nöroinflamasyon oluşumu çeşitli çalışmalarla değerlendirilmiştir. Enjeksiyon sonucu hipokampüste inflamasyonun maruziyet sonrası 1. günden başladığı bulunmuştur. Enjeksiyon sonrası inflamasyon saatler içinde başlamakla birlikte 6 ile 24 saatte başlayabildiğini gösteren çalışmaların bulunmasından dolayı karnitin uygulamasına, LPS uygulamasından bir gün sonra başlanmıştır (175). Lipopolisakkarit uygulaması sonrası KarLPS grubuna karnitin enjeksiyonuna başlamak için 1 gün beklenmiştir. Dolayısıyla Kar grubuna da KarLPS grubu ile aynı gün karnitin enjeksiyonları başlanmıştır. Yirmi sekiz günlük karnitin enjeksiyonu sonrası sıçanlar öğrenme, nörodavranış, lokomotor aktivite testlerinin yapılacağı "Öğrenme laboratuvarına" taşınmıştır.

3.1.4. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2. Santrifüj: Nüve NF 1200 R model soğutmalı (Türkiye)
3. Derin dondurucu: Kirsch Bosch -80°C (Almanya)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipet: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)

7. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
8. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
9. Biyokimya analizörü: Beckman Coulter AU5800 (Japonya)
10. Cam-Teflon homojenizatör
11. ELİSA plate yıkayıcı: Bio-tek marka ELx 50 model otomatik strip yıkayıcı (ABD)
12. ELİSA okuyucu: Rayto RT-6000 Microplate Reader (Çin)
13. İdrar Santrifüj Tüpü 15 ml (Isolab Almanya)

3.1.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1- Lipopolisakkarit (Escherichia coli lipopolisakkarit, O111:B4) (L2630, Sigma)
- 2- Fosfat buffer salin tablet (P4417, Sigma)
- 3- L-karnitin (Sigma-Aldrich, USA, C0283)
- 4- Ketazol %10 (Ketamin hidroklorür 100 mg) (Richter Pharma, Avusturya)
- 5- Rompun %2 enjeksiyonluk Çözelti 25 ml (Bayer, Almanya)

3.1.6. Kullanılan Reaktif Malzemeleri

- 1- SunRed Rat TNF- α ELİSA kiti katalog no: 201-11-0765 (Çin)
- 2- SunRed Rat IL-18 ELİSA kiti katalog no: 201-11-0118 (Çin)
- 3- Rel Assay Diagnostics Total Antioksidan Status (Türkiye)
- 4- Rel Assay Diagnostics Total Oksidan Status (Türkiye)

3.1.7. Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu; pH: 7,4 fosfat buffer salin tabletten (P4417, Sigma) bir tablet alınıp 200 ml suya karıştırılarak yapılmıştır. Toplamda bir litre fosfat tamponu hazırlanmıştır.

3.1.8. Serum ve Hipokampüs TNF- α ve IL-18 Düzeylerin Çalışma Prensibi

3.1.8.1. Serum ve Hipokampüs TNF- α Çalışma Prensibi

Sıçan serum ve hipokampüsünde TNF- α düzeyinin kantitatif ölçümü çift antikor sandviç enzim-bağlı immünsorbent test [enzym-linked immunosorbent assay (ELİSA)] yöntemiyle ticari kit (SunRed, Şangay, Çin) ile çalışılmıştır.

Kit 6 nokta kalibratör içermektedir (40 ng/l, 80 ng/l, 160 ng/l, 320 ng/l, 640 ng/l, 1280 ng/l). Standartlar çalışılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen optik dansite verileri alınmıştır. Çalışma bitiminde standartların optik dansite-konsantrasyon grafiği elde edilmiş ve numunelerin konsantrasyonu bu grafikten faydalanılarak ng/l cinsinden hesaplanmıştır. Sensitivitesi 5.127 ng/l'dir.

3.1.8.2. Serum ve Hipokampüs IL-18 Çalışma Prensibi

Sıçan serum ve hipokampüsünde IL-18 düzeyinin kantitatif ölçümü çift antikor sandviç enzim-bağlı immünsorbent test [enzym-linked immunosorbent assay (ELİSA)] yöntemiyle ticari kit (SunRed, Şangay, Çin) ile yapılmıştır.

Kit 6 nokta kalibratör içermektedir (5 ng/l, 10 ng/l, 20 ng/l, 40 ng/l, 80 ng/l, 160 ng/l). Standartlar çalışılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen optik dansite verileri alınmıştır. Çalışma bitiminde standartların optik dansite-konsantrasyon grafiği elde edilmiş ve numunelerin konsantrasyonu bu grafikten faydalanılarak ng/l cinsinden hesaplanmıştır. Sensitivitesi 0.472 ng/l'dir.

3.1.9. Serum ve Hipokampüs Total Oksidan Durum (TOS) ve Total Antioksidan Durum (TAS) Çalışma Prensibi

Örneklerde spektrofotometrik yöntem ile Rel Assay Diagnostics kitleri kullanılarak total antioksidan durum (TAS) ve total oksidan durum (TOS) çalışılmıştır. Her iki kitinde Beckman Coulter AU5800 otoanalizörüne aplikasyonu yapılmıştır.

TAS prensibi:

Örnek içindeki antioksidan maddeler, kit içindeki reaktiflerden olan koyu mavi-yeşil renkteki ABST radikal solusyonunu renksiz forma indirgemıştır ve reaksiyon karışımının 660 nm'deki absorbans değişimi ölçülmüştür. Absorbans değişimi, numunedeki TAS miktarı ile korelidir. Yöntemin kalibrasyonu stabil antioksidan standart solüsyonu (E vitamini analogu) Trolox Equivalent ile yapılmıştır (176).

TOS prensibi:

Örnek içindeki oksidan maddeler, ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyon haline okside etmiştir. Ferrik iyon formu, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirmiştir. Renk oluşumu; numunedeki oksidan moleküllerin miktarı ile orantılı olduğundan, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve TOS değeri elde edilmiştir. Yöntemin kalibrasyonu hidrojen peroksit ile yapılmıştır (176).

Elde edilen TAS ve TOS sonuçlarından OSI değerleri hesaplanır. TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./lt) değerinin TAS (mmol Trolox equiv./lt) değerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanmıştır.

3.1.10. Genetik Analiz için Kullanılan Sarf ve Ekipmanlar

- 1- Roche, TriPure Isolation Reagent Cat. No. 11 667 165 001 200 ml
- 2- Merck, Isopropanol Cat. No. 109634
- 3- Merck, EtOH Cat. No. 100983
- 4- Invitrogen™ UltraPure™ Dnase/Rnase-Free Distilled Water Catalog No. 10-977-023
- 5- Thermo RevertAid RT Reverse Transcription Kit Cat. No. K1691
- 6- Roche, LightCycler® 480 SYBR Green I Master Cat. No. 4707516001
- 7- Roche, ® 480 Multiwell Plate 96, White Product No. 04729692001
- 8- SOLAB, Filtreli pipet uçları (10,100,1000 μl) *Cat. No. TF-R-S-010 pipet ucu – filtreli – ISOLAB – şeffaf – 10 μl – kutu – steril 96 adet/kutu *Cat. No. TF-R-S-100 pipet ucu – filtreli – ISOLAB – şeffaf – 100 μl - kutu –

steril 96 adet/kutu *Cat. No. TF-R-S-1000 pipet ucu – filtreli – ISOLAB – şeffaf – 1000 µl – kutu – steril 96 adet/kutu

9- Thermo, 0,2 mL PCR tüpü Catalog number: AB0620 Tubes, 0.2 mL, flat cap

10- ISOLAB, 1,5 mL steril mikrosantrifüj tüpü Cat. No. 078.03.022

11- Primers From Macrogen

3.1.11. Genetik Analiz için Kullanılan Cihazlar

- -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific – U535)
- -20°C derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Nanodorop 2000 (Thermo Scientific)
- Allegra X-15R Refrigerated Centrifuge (Beckman Coulter)
- Thermal Block (Biosan TS100-C)
- Vorteks cihazı (Biosan V-1 Plus)
- Santrifüj (Hettich Universal 320R)
- Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied)
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics)

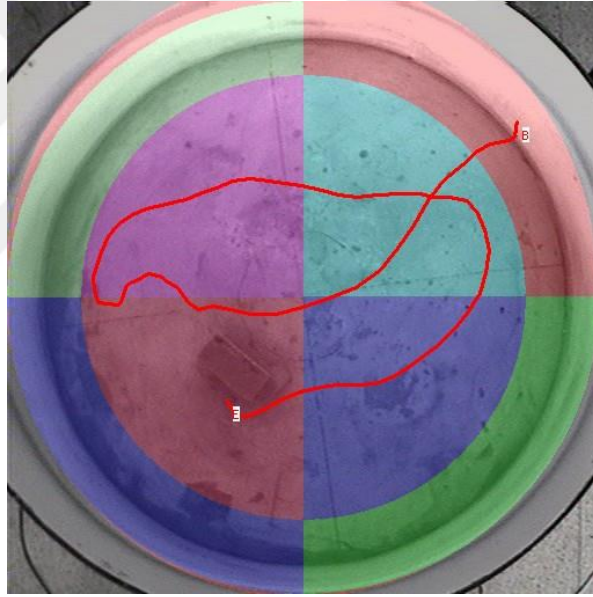
3.2. Yöntem

3.2.1. Öğrenme ve Davranışsal Testler

3.2.1.1. Morris Su Labirenti - Morris Water Maze

Morris su labirenti, hipokampüse dayalı mekansal hafızayı değerlendiren bilişsel fonksiyonları gösteren bir testtir. Su labirenti, 150 cm çaplı, 80 cm yüksekliğinde dairesel galvanik metalden yapılmış ve iç yüzeyi beyaz bir havuzdur. Labirentin olduğu yer güneş ışığı almayacak şekilde düzenlenmiştir ve labirentin dört tarafına yukarı yönde bakacak şekilde yerleştirilmiş lambalarla dolaylı olarak aydınlatma sağlanmıştır. Su labirenti etrafında sabit olan bazı görsel ipuçları (lambaların birine bağlanan kurdele, tablo, sandalye) vardır. Deneyden önce su

labirentine su doldurulup 23°C'ye ısıtılması sağlanmıştır. Sonra koyu sarı toz boya suda çözündürülüp suyun renklenmesi sağlanmıştır. “Smart Versiyon 2.5” programıyla (Smart Video-Tracking, Panlab, Barcelona, İspanya) havuz “1. kadrant”, “2. kadrant”, “3. kadrant” ve “4. kadrant” olarak dört kadrana ayrılmıştır. Gizli platform su yüzeyinin 2 cm altında olacak şekilde yerleştirilmiş ve gizli platformun bulunduğu bu kadrant “hedef kadrant” olarak belirlenmiştir. Su labirentinde tüm öğrenme egzersizleri boyunca ve bellek testinde, platform bulma süreleri, katedilen mesafe, yüzme hızları, hedef kadranda geçirilmiş olan süre gibi veriler bu program yoluyla kayıt altına alınmıştır. Su labirentinin üst kısmında, tüm egzersizler ve hafıza testi süresince sıçanların hareketlerini kaydeden bir video kamera (Sony SSC-DC398P, Japonya) elde edilen verileri, bilgisayara aktarmakta ve veriler Smart 2.5 programı tarafından işlenmektedir.



Resim 3.2. Bir sıçanın Morris su labirentinde izlediği yol ve Morris su labirentindeki kadrantlar

3.2.1.1.1. Deney Prosedürü

Deney boyunca sıçanlar havuza koyulurken, sıçanların yüzünün labirentin duvarına bakacak şekilde olmasına özen gösterilmiştir. Havuzdan çıkarılan sıçanlar havlu ve 40W beyaz ampul altında kurutulup kafese tekrar koyulmuştur. Egzersizlerde sıçanlar, hedef kadrant dışı kadrantlardan spontan (zon 1, 2 ve 4) olarak suya bırakılmıştır. Bir günde sıçanlara toplamda 5 egzersiz yaptırılmıştır. Morris

protokolü uygulanmış olup, mekansal ipucu ve yönsel stratejiler kullanılarak platformun yerini öğrenme egzersizi art arda 4 gün yapılmıştır. Sıçanlara egzersiz sırasında yüzmeleri için 60 saniyelik (s) zaman verilmiştir. Sıçanlar, birinci gün gizli platformu 60 s içinde bulamamışsa elle gizli platforma yönlendirilip, platformu öğrenmesi ve bu platformun sudan kurtuluş olduğunu anlaması amacıyla platformda 30 s durmasına ve çevreyi algılamasına izin verilmiştir. İkinci günde sıçanlar 60 s’de platformu bulamamışsa deneyi yapan kişi sıçanları platforma yönlendirmiştir fakat bu kez platformda 15 s durmalarına izin verildikten sonra platformdan alınmıştır. Diğer günler sıçanlar platformu bulamamışsa yönlendirme yapılmaksızın alınmıştır. Dördüncü gün tüm sıçanlar toplam 20 kere öğrenim egzersizi yapmıştır (177,178).

Beşinci günde “Probe trial” testi yapılmıştır. Bu testte hedef kadradaki gizli platform kaldırılıp, sıçanlar, saklı platformun bulunmadığı diğer kadrardan (1., 2. ve 4. kadranda) bırakılmış ve 60 s yüzmesine izin verilmiştir. Bu süre içinde daha önce saklı platformun bulunduğu hedef kadranda (3. kadranda) geçirdikleri süre kaydedilmiştir. Bu süre mekansal hafızanın göstergesi olarak değerlendirilmiştir (177,178). Bu değerlendirmeden 2 saat sonra yine 5. günde sıçanlara bu testin ipucu içeren formu “Visible (görünür) Platform” testi uygulanmıştır. Bu test LPS ve L-karnitinin sıçanlarda görme, lokomotor aktivite ya da motivasyon üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yapılmıştır. Bu test yapılırken görünür platform hedef kadrandan farklı kadrarlara taşınmış (1., 2. ve 4.) ve sıçanlar her defasında hedef (3.) kadrandan bırakılmıştır. Görünür platformu bulma süreleri kayıt altına alınmıştır.

3.2.1.2. Açık Alan Testi-Open Field Test

“Açık alan testi” lokomotor aktivite, eksploratuar (keşifçi) davranış paterni ve anksiyeteye ilişkin davranışları değerlendirmek için yapılmaktadır. Bu test için 100x100 cm bir kare alan ve 40 cm yüksekliğinde duvara sahip, siyah renk ahşap bir platform kullanılmaktadır. Platformun tabanı beyaz renkle çizilip 16 eşit kareye ayrılmıştır. Platformun çevresindeki 4 lamba duvara yansıtılıp dolaylı olarak aydınlatma sağlanmıştır. Hayvanlar sessiz bir ortamda test edilmiş olup, 5 dakikalık (dk) sürede hayvanların hareketleri, platformu tepeden kaydeden bir video kamerayla kaydedilmiştir (Sony SSC-DC398P, Japonya). “Smart versiyon 2.5” programı kullanılarak platformun video kamerayla alınan görüntüsü dış, orta, merkez alanlar

olmak üzere iç içe hayali 3 kadrana oluşturulmuş ve bu kadrarlarda kalma süresi ayrı ayrı kayıt altına alınmıştır. Tüm sıçanlar “açık alan testi”nde değerlendirilmiş ve 5 dk sürede platformu keşfetmelerine izin verilip davranışları skorlanmıştır (179,180). Davranış skorlaması şu şekilde yapılmıştır: Çizgi sayısı (line crosses): en az 3 ayağıyla geçtiği çizgi sayısı, bu veri sıçanın lokomotor davranışının (horizontal lokomotor aktivite) bir formudur. Şahlanma (rearing): Arka iki ayağı üstünde ayağa kalkıp koklama hareketinin sayısı, duvara tırmanma (walling): platformun duvarına iki ayağı üstünde kalkıp tırmanma hareketinin sayısı, kenarda kalma süresi (edge duration): aparatın kenarında, dış kadrarında geçirdiği süre, merkezde kalma süresi (centre duration): aparatın merkezinde geçirdiği süre ve merkez karedeki aktivite sayısı (center square activity): kare alanın tam ortasına çizilmiş 25cmx25cm“lik merkez kareden geçme sayısını ifade etmektedir. Ayrıca her bir sıçanın bu süre içerisindeki dışkı ve idrar yapma sayısı kaydedilmektedir. Geçtiği çizgi sayısı, şahlanma sayısı, duvara tırmanma sayısı, merkez karedeki aktivite sayısı ve aparatın merkezinde geçirdiği sürenin fazlalığı artmış lokomotor aktivite ve keşifçi davranışı gösterirken, aparatın kenarında geçirdiği sürenin fazlalığı, aparatın içinde hareketin ve geçilen çizgi sayısının azlığı, dışkı ve idrar yapma sayısında artış, keşifçi davranış azalması ve yüksek anksiyete düzeyini göstermektedir (181).



Resim 3.3. Açık alan testi uygulamasındaki bir sıçan

3.2.1.3. Zorlanmış Yüzme Testi (Forced Swim Test)

Sıçanlar 20 cm çaplı şeffaf, içine 30 cm derinliğinde su konulmuş bir silindirik aparata 6 dakika süresince bırakılmış ve tavana yerleştirilen kamera ile

görüntüleri kaydedilerek aktif olarak yüzdükleri süre ve yüzmeden bekledikleri, batmaya başladıkları süreler, Smart V2.5 programı ile kaydedilmiştir. Sıçanlar, deney başladığında yüzerek, çırpınarak ya da sıçrayarak silindirin kenarlarına tırmanmaya ve kaçmaya çalışacaktır. Sıçanlar bir süre sonra kaçamayacaklarını anladıklarındaysa davranışsal çaresizlik olarak değerlendirilen hareketsiz kalma, mücadeleyi bırakma ve teslim olma hali gerçekleşir. Sıçanların hareketsiz kaldıkları sürenin artmış olması ruh halinde düşüş ile ilişkilendirilir (182).

3.2.2. Hipokampüs Dokusunun Elde Edilmesi

Sıçanlara öğrenme deneylerini tamamladıktan 1 gün sonra ip olarak %10 ketamin HCl (90 mg/kg)-%2 ksilazin HCl (10 mg/kg) anestezisi uygulanmıştır. Abdominal insizyon ile vena cava inferiordan eksanguinasyon yapılmış ve kanları alınmıştır. Soğuk fosfat tamponu ile ıslatılmış buz aküleri üzerinde, her sıçanın kafatası kemikleri orta hattan başlanarak dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp, her iki hemisfer ayrılıp, frontal loplara kesi atılmış ve düz kenar elde edilmiştir. Beyin dokusu frontal kısım üzerinde dik şekilde konulup hipokampüsler bu pozisyonda özel olarak yaptığımız aparatlarla beyin dokusundan ayrılmıştır. Sıçanların hipokampüslerinin yarısı soğuk fosfat tamponu dolu ependorf tüplerine konulup biyokimyasal analiz için ayrılmıştır. Diğer yarısı histopatolojik analiz için formol içeren kaplara ve genetik analiz içinde soğuk serum fizyolojik bulunan ependorflara ayrılmıştır.



Resim 3.4. Hipokampüs çıkarmak için kullandığımız aparatlar

Biyokimyasal analiz için her gruptaki sıçanların hipokampus örnekleri tek tek tartılıp fosfat tamponu içinde önce cam teflon homojenizasyon aparatı yardımıyla 15-20 darbe uygulanarak parçalanmıştır. Sonrasında sonikatörde (UW- 2070 Bandelin Electronic, Almanya) 30 sn tutulmuştur. Homojenizasyon tamamlanmıştır. Bu basamakların hepsi soğuk zincire uygun şekilde yapılmıştır. Doku homojenatları 10000 g'de ve +4 °C'de on dk santrifüj edilip, 2 adet porsiyonlanmıştır.

Genetik analiz için soğuk serum fizyolojik içine alınan hipokampus örnekleri NLRP3 ve IL-18 gen ekspresyon düzeyleri ölçülmek üzere -80°C'de saklanmıştır.

Histopatolojik analiz için formol içine alınan hipokampus dokusu hemotoksilen-eozin (H-E) ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelenene kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.3. Serum Numunelerin Elde Edilmesi

Tüm sıçanların kanları anestezi altında sakrifikasyon sonrası jelli sarı kapaklı biyokimya tüplerine alınmıştır. Kanlar serumları ayrılmak üzere 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Serumlar üç ependorfa porsiyonlanmıştır.

Serum ve hipokampus dokusundan ticari rat spesifik ELİSA kitleriyle TNF- α (SunRed) ve IL-18 (SunRed) çalışılmıştır. Ayrıca serum ve hipokampus dokularından TAS ve TOS çalışılmıştır. Hipokampus TNF- α ve IL-18 sonuçları, doku protein miktarı ile karşılaştırılarak gram protein başına miktar olarak verilmiştir.

3.2.4. Histokimyasal Preparat Hazırlıkları

3.2.4.1. Doku Örneklerinde Histolojik Çalışma

3.2.4.1.1. Doku Takip Çalışmaları ve Kesitlerin Eldesi

En az 2 gün %10 nötral formalin solüsyonunda fikse edilen örnekler, bir gece akan suda yıkandıktan sonra sırasıyla aşağıdaki aşamalardan geçirilmiştir.

a) Suyun dokulardan uzaklaştırılması (Dehidratasyon)

Örnekler farklı derecedeki alkollerde birer saat bekletildi.

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%50	bir saat bekletildi.
%70	bir saat bekletildi.
%80	bir saat bekletildi.
%90	bir saat bekletildi.
%96	bir saat bekletildi.
%100	bir saat bekletildi.
%100	bir saat bekletildi.
%100	bir saat bekletildi.

b) Şeffaflandırma

Her üç dk'da bir kontrol edilerek ksilolde 3-10 dk bekletildi.

c) Parafin emdirmeye

Sıvı parafin (60 °C etüvde) 30 dk bekletildi.

Katı parafin (oda sıcaklığında) 1 gece bekletildi.

d) Gömme

Sert parafin, içerisine gömülen dokularla tabakalar halinde hazırlandı.

e) Kesit alma

Elde edilen parafin tabakalardan kızaklı mikrotom ile 3-4 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.2.4.2. Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması (H-E)

Histokimyasal değerlendirme için elde edilen preparatlara Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yapıldı. Boyama aşamaları aşağıda belirtilmiştir.

Yapılan işlemSüre

1. Deparafinizasyon

- | | |
|--------------|-------------------|
| A) 60°C etüv | 45 dk bekletildi. |
| B) Ksilol I | 20 dk bekletildi. |
| C) Ksilol II | 20 dk bekletildi. |

2. Alkol serisi

- | | |
|--------|-------------------|
| A) %96 | 10 dk bekletildi. |
| B) %90 | 10 dk bekletildi. |
| C) %80 | 10 dk bekletildi. |
| D) %70 | 10 dk bekletildi. |

3. Distile Su 5 dk bekletildi.

4. Hematoksilen 2 dk bekletildi.

5. Çeşme suyu 5 dk bekletildi, sonrasında akan suda 2-3 kez yıkandı.

6. Asit alkol 3-4 sn

7. Çeşme suyu 5 dk bekletildi, sonrasında akan suda 2-3 kez yıkandı.

8. Eozin 2 dk bekletildi.

9. Çeşme suyu 5 dk sonra akan suda 2-3 kez yıkandı.

10. %70-%80-%90 alkol serisinden sırasıyla batırıp çıkarılarak geçirildi.

11. Ksilol bir gece bekletildi.

12. Kapatma (Entellan)

Beyin dokusu kesitlerinde, kontrol ve deney gruplarında histokimyasal yöntemler uygulandıktan sonra dokudaki hasarlanma-iyileşme değerleri; kamera destekli binoküler ışık mikroskobu (ECLIPSE Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan) ile karşılaştırılmıştır.

3.2.5. Hipokampus NLRP3 VE IL-18 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tayini

3.2.5.1. RNA İzolasyon Protokolü

Tüm ratlara ait doku örnekleri üzerine 1 ml tripure isolation reagent (DNA, RNA ve protein izolasyonu için kullanılan reaktif) eklenmiştir ve homojenizatör kullanılarak seramik boncuklar yardımıyla parçalanmıştır. Bu aşamada tüpteki doku parçalanarak homojen bir görünüm almıştır. Tripure isolation reagent etkisiyle pembe renk oluşmuştur. Daha sonra tüpler buz üzerine alınıp 2 dk, sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Tüplere 200 µl kloroform eklenmiş, 5 dk daha bekletilmiştir. Kloroform, homojen şekle gelen dokuda faz oluşumunu sağlayarak RNA, DNA ve proteinin ayrı fazlarda eldesine aracı olmaktadır. Tüpler 12000 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilmiş olup, 3 faz oluşmuştur. RNA izolasyonu için renksiz olan en üstteki 1. faz başka ependorf tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklenerek 25°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. 12000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilip, süpernatantı atılmıştır. Elde edilen çökelek üzerine 1 ml %75 etanol eklenmiştir. 7500 g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatantı atılmıştır. 57°C'de etanol uzaklaştırılarak, kalan çökeleğe 50-100 µl RNase içermeyen su pipetlenmiştir. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları belirlenmiştir.

3.2.5.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilmiş olan RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazı ile spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir.

3.2.5.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, Thermo Scientific™ RevertAid RT Reverse Transcription Kit kullanılarak belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Her örnek için RNA + Random + Hexamer primer (1 µl) + Nükleaz free su'dan 12 µl eklenmiştir. Oluşturulan 12 µl RNA örneği karışımı 65°C'de 5 dk bekletildikten sonra buz üstünde soğutulmuştur. Son hacim 20 µl olacak şekilde belirtilen reaksiyon bileşenleri RNA örnekleri

üzerine eklenerek 0,2 µl'lik polimerize zincir reaksiyonu [*Polymerase Chain Reaction (PCR)*] tüplerinde karıştırılmıştır ve Thermal Cycler cihazına yerleştirilip 25°C'de 5 dk, 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 5 dk olarak hazırlanan program ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 2).

Tablo 3.2. NLRP3 ve IL-18 için cDNA sentez protokolü

Bileşenler (Tek reaksiyon için)	Hacim
RNA örneği	12 µl
5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock Rnase İnhibitör (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid RT (200 U/µl)	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

Kontrol olarak Beta Aktin (ACTB) gen bölgesine ait diziler kullanılmıştır. Yetkili firma NLRP3 ve IL-18 genine ait Forward ve Reverse primerleri tasarlamıştır. Primer dizileri verilmiştir.

NLRP3:

F: 5'-TTTCCCAGACCCTCATGTTG-3'

R: 5'-GGTGCTGAGACTTGAGAAGAG-3'

IL-18:

F: 5'-GGATGTCTACCCTCTCCTGTAA-3'

R: 5'-GTCCTGGCACACGTTTCT-3'

Beta Aktin (ACTB):

F: 5'-ACCACCATGTACCCAGGCATT-3'

R: 5'-CCACACAGAGTACTTGCGCTCA-3'

3.2.5.4. Real Time PCR (RT-PCR)

Sentezlenen cDNA'lar, belirtilen gen bölgeleri için dizayn edilen primerler ile LightCycler® 480 SYBR Green I Master kullanılarak Roche LightCycler 480 II

cihazıyla çalışılmıştır. Çalışmada ACTB geni referans (kontrol) gen olarak alınmış, target genler ile beraber aşağıda belirtilen şekilde hazırlanıp ve cihaza yüklenmiştir.

Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için bileşenlerin her birinden (cDNA hariç) eklenip ve reaksiyon sayısı ile çarpılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Plate'lere her bir reaksiyon için 16 µl reaksiyon karışımından transfer edilmiştir. 2 µl cDNA örneği her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde eklenmiştir (Tablo 3.3). Hazırlanan platelerin üzeri kapatılarak plate santrifüj cihazı ile santrifüj edilmiştir. Real Time PCR cihazına yerleştirilmiştir. Örneklerin RT-PCR ile ekspresyonlarına bakılmıştır. Aşağıda belirtilen cihaz protokolü ile çalışma yapılmıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.3. Reaksiyon karışımı

Bileşenler (Tek reaksiyon için)	Hacim
Su, PCR-grade	6,4 µl
Forward primer (F) (ara stok 10 µM)	0,8 µl
Reverse primer ® (ara stok 10 µM)	0,8 µl
Enzim karışımı (Light Cycler 480 SYBR Green I Master	10 µl
	+
cDNA	2 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl

18 µl Reaksiyon Mix + 2 µl cDNA = 20 µl Total Reaksiyon Hacmi

Tablo 3.4. Cihaz protokolü

Program adı	PRE-İNKÜBASYON	AMPLİFİKASYON			MELTING CURVE			SOĞUTMA
Analiz Modu	Yok	Kuantifikasyon Modu			Erime Eğrisi Modu			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Hedef Sıcaklık [°C]	95	95	57	72	95	62	97	40
Süre	00:05:00	00:00:10	00:00:15	00:00:10	00:00:05	00:01:00	00:00:00	00:00:30
Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]	4,8	4,8	2,5	4,8	4,8	2,5	0,11	2,5
Okuma Modu	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Continuous	Yok

3.2.5.5. Analiz

Real Time PCR analizi sonucunda elde edilen veriler Absolute Quantification ve Advanced Relative Quantification yöntemleriyle analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçlarda Relative Quantification yapabilmek için Fold Change metodu kullanılmıştır. Bu metod ile Target gen Ct değerleri ACTB ile normalize edilmiştir. Normalize değerler, kontrol grupları ile oranlanarak Fold Change değerleri bulunmuştur.

- 2'den büyük ise anlamlı Target Up Regülasyon,
- 2'den düşük ise anlamlı Target Down Regülasyon durumunu ifade eder.
- -2 ve 2 aralığındaki değerler ise anlamsız olarak tanımlanır.

3.3. İstatistiksel Analiz

Morris su labirenti verileri Levene homojenite testi ile değerlendirilmiş, verilerin homojen dağıldığı saptandıktan sonra su labirenti verilerinden ilk 4 günlük öğrenme periyodu için, her grup kendi içinde 1. günden 4. güne, günler arası değişim 'tekrarlanan ölçümlerde varyans analizi' ile değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlılığın hangi günden kaynaklandığını saptamak amacıyla ardından Bonferroni düzeltmeli t test uygulanmış ve $p < 0.01$ anlamlı kabul edilmiştir. Tüm eğitim günlerinde ve test gününde, su labirenti verileri açısından kontrol ve deney grupları arasında fark olup olmadığı ise tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için Post hoc Bonferroni test ile değerlendirme yapılmıştır.

Açık alan testi ve zorlanmış yüzme testi verileri Kruskal Wallis test ile değerlendirilmiştir. İkili karşılaştırmalar Mann Whitney U test ile yapılmıştır.

Serum ve hipokampus dokusunda TNF- α , IL-18 düzeyleri, hipokampüste IL-18 ve NLRP3 ekspresyonları, serum oksidatif durumu değerlendirdiğimiz TAS, TOS düzeylerini değerlendirmek üzere önce Levene homojenite testi yapılmış, homojen dağılan veriler tek yönlü varyans analizi ve ardından Post hoc Bonferroni test ile değerlendirilmiştir. Hipokampüsteki TAS, TOS, OSI düzeyleri ise Kruskal Wallis

test ile değerlendirilmiştir. İkili karşılaştırmalar Mann Whitney U test ile yapılmıştır. İstatistik programı olarak SPSS 22 yazılımı kullanılmıştır.

Histolojik çalışmaların istatistik değerlendirmeleri için, SPSS 18 yazılımı ve InStat 3.0 yazılımları kullanılmıştır ve ikili grup karşılaştırmaları için parametrik olmayan Mann Whitney U testi uygulanarak, 0,05'in altındaki p değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir (183).



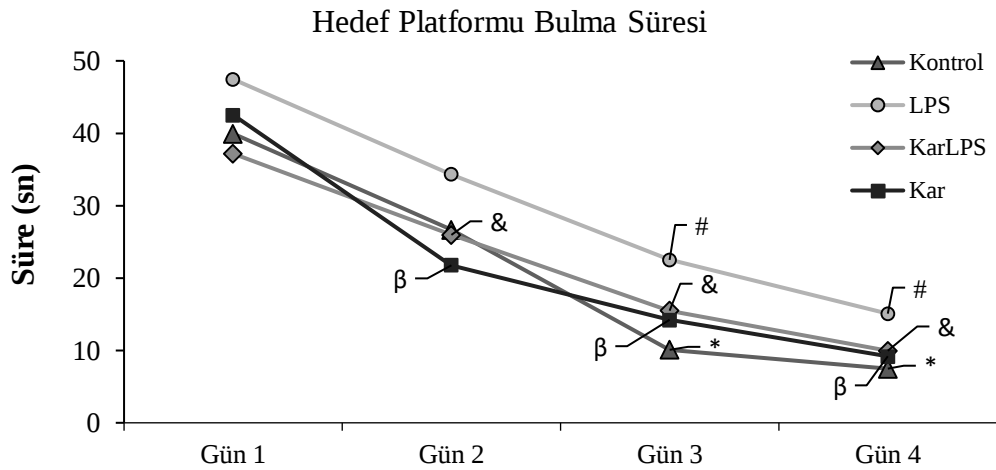
4. BULGULAR

4.1. Morris Su Labirenti Verileri

4.1.1. Eğitim Dönemi Verileri

Hedef platformu bulma süresi açısından eğitim dönemi (1.-4. gün) verileri her bir grup kendi içinde günler arasında karşılaştırılmıştır ve bu amaçla tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi yapılmış Mauchly'nin Küresellik varsayımı sağlanmadığı için ($p=0,002$) Greenhouse-Geisser düzeltmeleri F değeri için tercih edilmiştir ($df=1,23$, $F=34,71$, $p<0,001$). Ardından hangi günler arasında farklılık olduğunu saptamak amacıyla ikili karşılaştırmalar yapılmıştır ve bulgular aşağıdaki gibidir:

K grubu ve LPS gruplarında hedef platformu bulma süresi açısından 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmanın 3. gün başladığı (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,001$), ancak KarLPS ve Kar grubunda bu azalmanın 2. gün başladığı görülmüştür (sırasıyla $p=0,003$, $p<0,001$). Eğitim dönemi sonunda tüm gruplar Morris su labirentinde saklı platformu bulmayı öğrenmiştir (Grafik 4.1).



Grafik 4.1. Morris su labirentinde eğitim döneminde her bir grubun kendi içinde 1.-4. gün sürecinde hedef platformu bulma süresi

*' Kontrol grubunda, '#' LPS grubunda, '&' KarLPS grubunda, 'β' ise Kar grubunda 1. gün ortalamasına göre anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$). Veriler tekrarlanan ölçümlerde varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

Eğitim döneminde hedef platformu bulma süresi açısından her bir gün için gruplar karşılaştırıldığında 1. gün ($df=3$, $F=3,07$, $p=0,023$), 3. gün ($df=3$, $F=20,79$, $p<0,001$) ve 4. günde ($df=3$, $F=6,03$, $p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Hedef platformu bulma süresi açısından 1. eğitim gününde LPS ile KarLPS grubu arasında anlamlı farklılık varken ($p=0,02$), 3. eğitim gününde LPS grubu ile K, KarLPS ve Kar grubu arasında anlamlı farklılık saptanmış olup diğer gruplara göre hedef platformu bulma süresi anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,001$, $p<0,001$). Benzer şekilde 4. eğitim gününde de LPS grubu ile K, KarLPS ve Kar grupları arasında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,046$, $p=0,025$). K grubu ile Kar grubu ve KarLPS grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$, $p>0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Morris su labirentinde eğitim döneminde hedef platformu bulma süresinin gün içi gruplar arası karşılaştırması (sn)

Süre (sn)	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Gün 4
Kontrol	39,94±8,48	26,70±7,03	10,08±1,01*	7,48±1,48*
LPS	47,45±8,90	34,32±7,30	22,50±4,97	15,08±5,91
KarLPS	37,17±6,37*	25,95±4,88	15,49±2,42*	9,95±3,89*
Kar	42,53±4,99	21,75±6,16	14,23±3,06*	9,19±2,09*

‘*’, aynı eğitim gününde LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0,05$). Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Veriler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

4.1.2. Morris Su Labirenti Test Günü Verileri (Probe Test-Visible Test)

Morris su labirenti test günü verilerinden hedef kadranda geçirilen süre ve hedef kadranda katedilen mesafe açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla $df=3$, $F=8,10$, $p<0,001$, $df=3$, $F=3,48$, $p=0,029$), görünür platformu bulma süreleri açısından gruplar arasında farklılık yoktur ($df=3$, $F=0,62$, $p=0,60$). Hedef kadranda geçirilen süre LPS grubunda K, KarLS, Kar gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,001$, $p=0,021$, $p=0,002$). Hedef kadranda geçirilen süre açısından KarLPS grubunda LPS grubuna göre anlamlı bir iyileşme söz konusudur ($p=0,021$). Hedef kadranda katedilen mesafenin LPS grubunda K grubuna göre anlamlı düzeyde kısa olduğu görülmüştür ($p=0,031$). KarLPS grubunda LPS grubuna göre hedef kadranda katedilen mesafe daha fazla olmasına rağmen

istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,320$) (Tablo 4,2).K ve Kar grupları arasında hedef kadranda geçirilen süre, hedef kadranda katedilen mesafe, görünür platformu bulma süresi açısından anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$, $p>0,05$, $p>0,05$).

Tablo 4.2. Morris su labirentinde test günü verileri

	Hedef kadranda geçirilen süre (sn)	Hedef kadranda katedilen mesafe (cm)	Görünür platformu bulma süresi (sn)
Kontrol	23,30±3,27*	259,27±38,42*	5,88±3,57
LPS	16,97±2,49	193,98±30,37	7,45±1,93
KarLPS	21,56±3,02*	237,37±56,38	6,47±1,91
Kar	22,85±2,64*	246,94±42,72	6,53±1,095

‘*’, test gününde LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

4.2. Açık Alan Testi Sonuçları

Açık alan testi verileri Kruskal Wallis test ile değerlendirilmiştir. Değerlendirilen verilerden katedilen yol, hız, duvara tırmanma+şahlanma hareketi açısından anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,022$, $p=0,001$). Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu LPS ile K grubu arasında katedilen yol ve hız açısından anlamlı bir düşüş görülmüş ($p=0,049$, $p=0,021$), ve yine LPS ile KarLPS grupları arasında katedilen yol ve hız açısından anlamlı bir düşüş bulunmuştur ($p=0,001$, $p=0,01$). LPS ile Kar grubu arasında katedilen yol açısından anlamlı fark saptanırken hız açısından anlamlı bir fark yoktur ($p=0,01$, $p=0,05$). Duvara tırmanma ve şahlanma sayıları bir arada değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$). LPS grubunda bu bulgu açısından K, KarLPS ve Kar gruplarına göre anlamlı bir düşüş söz konusudur ($p=0,003$, $p<0,001$, $p<0,001$). Diğer parametreler açısından bir farklılık saptanamamıştır (Tablo 4.3). K ve Kar grubu arasında açık alan testinde bakılan tüm parametreler açısından anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.3. Açık alan testi verilerinin gruplar arası karşılaştırılması

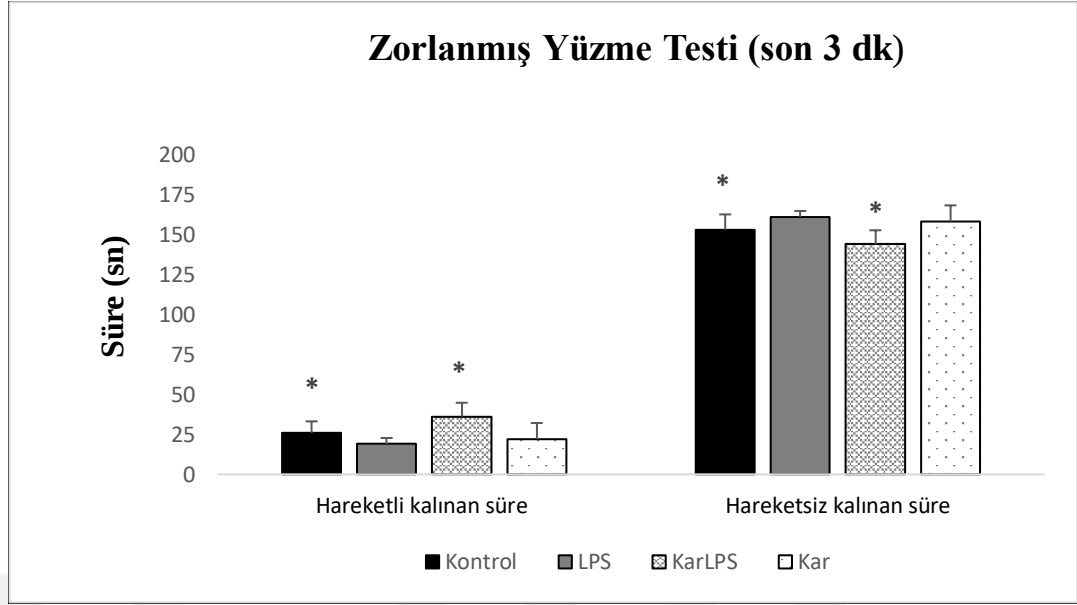
	Kontrol	LPS	KarLPS	Kar
Dış kadrana giriş sayısı	6,87±2,85	6,12±2,35	6,62±3,06	7,25±4,46
İç kadrana giriş sayısı	9,00±3,89	8,50±3,62	9,62±5,04	9,50±5,70
Merkeze giriş sayısı	2,12±1,12	2,37±1,76	2,87±2,23	3,37±2,38
Geçtiği çizgi sayısı	39,37±8,91	38,75±10,02	38,75±2,60	37,25±8,13
Hız (cm/sn)	13,27±0,58*	12,54±0,93	14,56±1,47*	13,56±1,08
Katedilen toplam yol (m)	1,64±0,26*	1,30±0,18	1,94±0,12*	1,66±0,09*
Şahlanma sayısı	18,25±5,91*	7,87±3,35	17,50±4,75*	19,00±3,50*
İdrar yapma sayısı	7,12±5,91	9,37±5,73	7,87±3,87	8,37±5,34
Dışkılama sayısı	5,12±0,99	3,75±1,38	3,87±1,24	3,25±1,58

‘*’, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). Açık alan testi verileri Kruskal Wallis test ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

4.3. Zorlanmış Yüzme Testi Sonuçları

Zorlanmış yüzme testi verileri 0-6 dakikalık verileri Kruskal Wallis test ile değerlendirilmiştir. Hareketlilik süresi ve hareketsiz kalınan süre açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla $p=0,034$, $p=0,036$). Mann Whitney U test ile ikili karşılaştırmaları yapıldığında K-LPS ($p=0,13$, $p=0,16$), K-Kar ($p=0,44$, $p=0,44$), K-KarLPS ($p=0,13$, $p=0,13$) arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ancak LPS ile KarLPS grupları arasında hareketlilik süresi ve hareketsiz kalınan süre açısından anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p=0,028$, $p=0,028$). KarLPS grubunda LPS grubuna göre hareketsiz kalınan sürenin daha az olduğu olduğu tespit edilmiştir.

Tüm grupların son 3 dakikadaki performansları değerlendirildiğinde her iki parametre (hareketsiz kalınan süre, hareketlilik süresi) açısından da anlamlı farklılık göze çarpmaktadır (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,003$). LPS grubunda K grubu ve KarLPS’ye göre hareketsiz kalınan sürede anlamlı bir artış, hareketli olunan sürede de anlamlı bir azalma görülmüştür ($p=0,028$, $p<0,001$) (Grafik 4.2). K ve Kar grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).



Grafik 4.2. Zorlanmış yüzme testi verilerinin gruplar arası karşılaştırılması

Zorlanmış yüzme testi verileri Mann Whitney U test ile değerlendirilmiştir.

‘*’, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir, ($p < 0,05$).

4.4. Serum ve Hipokampüste İnflamatuar Sitokinlerin Sonuçları

Serum TNF- α ve IL-18 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla $df=3$, $F=5.05$, $p=0,006$; $df=3$, $F=8.46$, $p < 0,001$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak üzere yapılan Post hoc Bonferroni testi sonucu serum TNF- α düzeyi açısından LPS grubunda K ve Kar grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yükseklik saptanmıştır (sırasıyla LPS-K $p=0,03$, LPS-Kar $p=0,007$), KarLPS grubunda ise LPS grubuna göre TNF- α düzeyi düşmüştü olsa da bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (LPS-KarLPS $p=0,12$). Serum IL-18 düzeyleri açısından LPS grubunun IL-18 düzeylerinin tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla LPS-K $p=0,001$, LPS-KarLPS $p=0,009$, LPS-Kar $p=0,002$) (Tablo 4.4).

Hipokampus dokusunda TNF- α ve IL-18 düzeylerini incelediğimizde her iki parametre açısından da gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmıştır (sırasıyla $df=3$, $F=6.27$, $p=0.004$; $df=3$, $F=5.65$, $p=0,006$). TNF- α düzeyleri açısından LPS grubu tüm gruplardan anlamlı düzeyde yüksektir (LPS-K $p=0,012$, LPS-KarLPS $p=0,006$, LPS-Kar $p=0,042$). IL-18 düzeyi açısından yine istatistiksel farklılığın kaynağı LPS grubu olarak görülmüştür, LPS-K $p=0,01$, LPS-KarLPS $p=0,024$, LPS-Kar $p=0,031$ ’dir.

Hipokampus dokusunda ve serumda K ve Kar grubu arasında TNF- α , IL-18 düzeyleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$, $p>0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Serum ve hipokampüste IL-18, TNF- α sitokinlerinin gruplar arası karşılaştırılması

	Serum IL-18 (ng/l)	Serum TNF-α (ng/l)	Hipokampus IL-18 (ng/g)	Hipokampus TNF-α (ng/g)
Kontrol	25,87$\pm$4,52*	108,33$\pm$18,39*	76,25$\pm$21,78*	310,64$\pm$104,79*
LPS	43,47 $\pm$ 13,87	135,52 $\pm$ 13,39	189,67 $\pm$ 94,30	595,17 $\pm$ 228,01
KarLPS	29,47$\pm$5,17*	113,70 $\pm$ 12,11	87,76$\pm$34,17*	294,45$\pm$91,69*
Kar	26,81$\pm$3,69*	103,39$\pm$24,63*	91,45$\pm$35,15*	353,86$\pm$77,93*

‘*’, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.5. Serum ve Hipokampüste Oksidatif Stres Parametrelerinin Sonuçları

Serumdaki TAS, TOS ve OSI verilerinin tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesinde TOS ve OSI’de istatistiksel anlamlılık saptanmıştır (sırasıyla $df=3$, $F=0.67$, $p=0,57$; $df=3$, $F=3.84$, $p=0,02$; $df=3$, $F=4.27$, $p=0,013$). Bu anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak üzere Post hoc Bonferroni test ile değerlendirilmiş olup TOS ve OSI düzeyi LPS grubunda K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p=0,018$, $p=0,021$). Her ne kadar KarLPS grubunda LPS grubuna göre TOS ve OSI düzeyi düşmüş olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p=0,31$, $p=0,25$). Serum TAS, TOS ve OSI değerleri incelendiğinde K ve Kar grupları arasında, Kar ve KarLPS grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p>0,05$, $p>0,05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Serum oksidatif stres parametrelerinin sonuçları ve gruplar arası karşılaştırılması

	Serum TAS (mmol Trolox Eq/L)	Serum TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	OSI (Arbitrary Unit)
Kontrol	1,09 $\pm$ 0,35	7,44$\pm$2,97*	0,72$\pm$0,34*
LPS	0,97 $\pm$ 0,03	10,14 $\pm$ 1,01	1,04 $\pm$ 0,13
KarLPS	1,02 $\pm$ 0,06	8,45 $\pm$ 0,68	0,82 $\pm$ 0,07
Kar	1,14 $\pm$ 0,34	8,08 $\pm$ 0,87	0,73 $\pm$ 0,13

‘*’, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). Serum TAS, TOS ve OSI verileri tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Hipokampus dokusunda TAS, TOS ve OSI verileri Levene homojenite testi ile değerlendirilmiş ve veriler homojen dağılmadığı için Kruskal Wallis test ile değerlendirilme yapılmıştır. Her 3 parametre açısından da (TAS, TOS ve OSI) istatistiksel anlamlılık saptanmıştır (sırasıyla $p=0,008$; $p=0,001$; $p=0,001$). Bu anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak üzere Mann Whitney U test ile değerlendirilmiş olup TOS ve OSI düzeyleri LPS grubunda K, KarLPS, Kar grubuna göre anlamlı düzeyde yükselmiş (sırasıyla LPS-K: $p=0,002$, $p=0,002$; LPS-KarLPS: $p=0,004$, $p=0,002$; LPS-Kar: $p=0,002$, $p=0,004$), TAS düzeyi ise LPS grubunda K, KarLPS, Kar grubuna göre anlamlı derecede azalma saptanmıştır ($p=0,004$, $p=0,002$, $p=0,041$) (Tablo 4.6). K ve Kar grubu arasında hipokampüste TAS, TOS, OSI değerleri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Hipokampus oksidatif stres parametrelerinin sonuçları ve gruplar arası karşılaştırılması

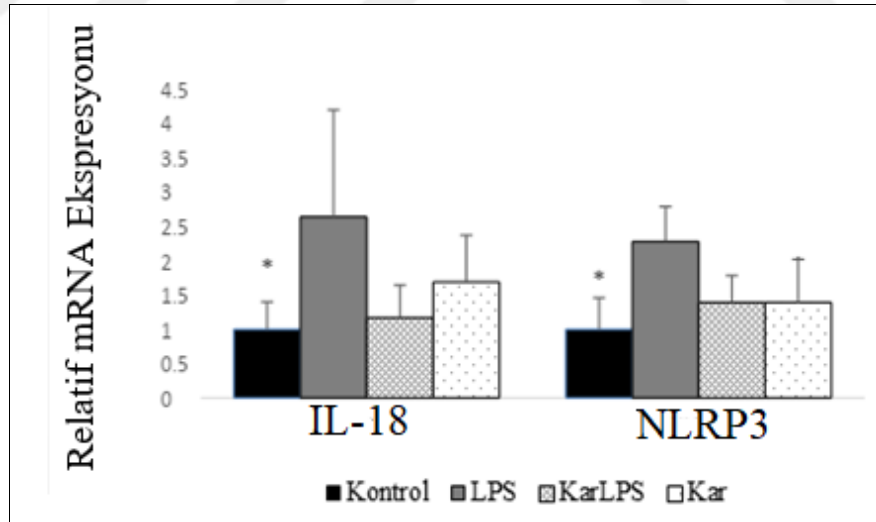
	Hipokampus TAS (mmol Trolox Eq/L)	Hipokampus TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	OSI (Arbitrary Unit)
Kontrol	2,68$\pm$0,36*	58,08$\pm$9,46*	2,19$\pm$0,44*
LPS	1,76 $\pm$ 0,45	98,42 $\pm$ 8,53	6,18 $\pm$ 3
KarLPS	2,78$\pm$0,35*	78,22$\pm$10,28*	2,82$\pm$0,37*
Kar	2,45$\pm$0,66*	73,90$\pm$9,30*	3,21$\pm$0,97*

‘*’, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). Hipokampus TAS, TOS ve OSI verileri Mann Whitney U test ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.6. Hipokampüste NLRP3 ve IL-18 Ekspresyon Bulguları

Hipokampus dokusunda IL-18 ekspresyonu incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($df=3$, $F=3,91$, $p=0,024$). K grubu ile LPS grubu arasında anlamlı farklılık saptanırken (K-LPS $p=0,033$), K grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (K-KarLPS $p>0,05$, K-Kar $p>0,05$) (Tablo 4.7). İstatistiksel farklılık LPS grubundan kaynaklanmakta olup LPS grubunda K grubuna göre IL-18 düzeyi daha yüksek saptanmıştır. LPS grubunda IL-18 gen ekspresyon düzeyinin K grubuna göre 2,64 kat up regüle olduğu görülmüştür (Grafik 4.3).

Hipokampüste NLRP3 ekspresyonunu değerlendirdiğimizde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($df=3$, $F=4,781$, $p=0,011$). Ardından yapılan Post hoc test ile K grubu ile KarLPS ve Kar grupları arasında IL-18 ve NLRP3 ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmadığı (sırasıyla $p>0,05$, $p>0,05$) ancak yine anlamlılığın LPS grubundan kaynaklandığı ve LPS grubu ile K grubu arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür (LPS-K; $p=0,009$) (Tablo 4.7). LPS grubunda NLRP3 gen ekspresyon düzeyinin K grubuna göre 2,30 kat up regüle olduğu saptanmıştır (Grafik 4.3).



Grafik 4.3. Hipokampüste NLRP3 ve IL-18 relatif mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

‘*’, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi, Post hoc Bonferroni test ile değerlendirilmiştir.

Tablo 4.7. Hipokampüste NLRP3 ve IL-18 relatif mRNA ekspresyon düzeyleri

	IL-18 mRNA	NLRP3 mRNA
Kontrol	0,99±0,40*	0,82±0,45*
LPS	2,62±1,56	1,89±0,51
KarLPS	1,16±0,47	1,15±0,39
Kar	1,68±0,68	1,15±0,62

‘*’, LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). Veriler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama± standart sapma olarak verilmiştir.

4.7. Hipokampüste Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubu ile deney gruplarına ait beyin doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Refaiy ve arkadaşlarının yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirilmiştir (184).

Beyin doku kesitlerinin H-E boyamalarında kontrol grubuyla deney grupları arasında histolojik olarak anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.8). Kontrol grubuna ait beyin doku kesitleri normal histolojik yapıda gözlemlenirken kısmen de olsa bazı kesitlerde; nöropil vakuolizasyonu ve nöronlarda piknotik nukleus şeklinde bulgular gözlemlenmiştir ($p>0,05$), (Tablo 4.8, Resim 4.1, H-E x100).

Lipopolisakkarit verilen gruba ait dokularda, kontrol grubuna göre önemli yapısal değişiklikler görülmüştür ($p<0,05$). Bu değişiklikler; nöron dejenerasyonu, nöron sayısında azalma, hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonu, nöropil vakuolizasyonu, nöronlarda piknotik nukleus şeklinde gözlemlenmiştir (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$) (Tablo 4.8, Resim 4.2, H-E x100).

Lipopolisakkarit verildikten sonra karnitin uygulanan sıçanlara ait doku kesitlerinde, LPS grubuna kıyasla nöron dejenerasyonu, hemorajik alanlar, mononükleer hücre infiltrasyonu, nöropil vakuolizasyonu, nöronlarda piknotik nukleus histopatolojik bulgularının çoğunda azalma gözlemlenmiş olup (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$) nöron sayısındaki azalmanın da daha az olduğu bulunmuştur ($p=0,004$). Sadece karnitin verilen gruba ait doku kesitleri ise histolojik olarak kontrol grubuna yakın özellikteyken bazı örneklerde nöropil

vakuolizasyonu, nöronlarda piknotik nukleus ve hemorajik alanlara rastlanmıştır (sırasıyla p=0,768, p=0,818, p=0,487) (Tablo 4.8, Resim 4.3 - 4.4, H-E x100).

Tablo 4.8. Gruplar arasındaki histopatolojik bulguların derecelendirilmesi

Gruplar	K	LPS	KarLPS	Kar
Nöron Dejenerasyonu	-	++/+++	++	-
Nöron Sayısında Azalma	-	+++	++	-
Hemorajik Alanlar	-	+++	++	-/+
Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	-	++	+	-
Nöropil Vakuolizasyonu	-/+	+++	+++	-/+
Nöronlarda Piknotik Nukleus	-/+	+++	+++	-/+

Kontrol ve deney gruplarına ait doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (- /+++) arası skorlanarak değerlendirilmiştir.

-: Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

+: Hafif derecede,

++: Orta derecede,

+++ : Ciddi derecede yapısal değişikliğin olmasını ifade etmektedir.

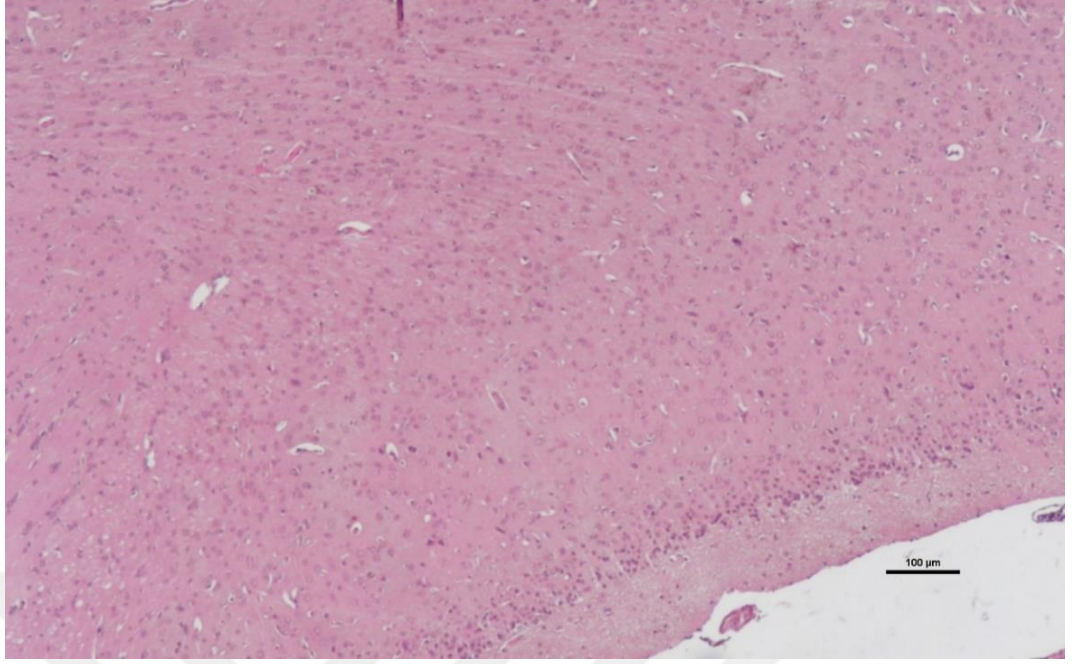
Tablo 4.9. Gruplar arasındaki histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Kontrol	LPS	KarLPS	Kar
Nöron Dejenerasyonu	0.75 ± 0.29	14.25 ± 3.26 ^a	13.17 ± 1.35 ^{a,b}	0.65 ± 0.19
Nöron Sayısında Azalma	0.49 ± 0.22	15.75 ± 2.29 ^a	12.15 ± 2.16 ^{a,b}	0.39 ± 0.27
Hemorajik Alanlar	0.65 ± 0.19	15.25 ± 1.60 ^a	12.15 ± 1.25 ^{a,b}	0.87 ± 0.36
Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	0.59 ± 0.29	13.25 ± 1.32 ^a	11.15 ± 1.46 ^{a,b}	0.55 ± 0.19
Nöropil Vakuolizasyonu	0.95 ± 0.44	15.05 ± 1.39 ^a	14.15 ± 3.15 ^{a,b}	0.85 ± 0.45
Nöronlarda Piknotik Nukleus	0.87 ± 0.35	16.07 ± 2.28 ^a	15.15 ± 3.22 ^{a,b}	0.88 ± 0.25

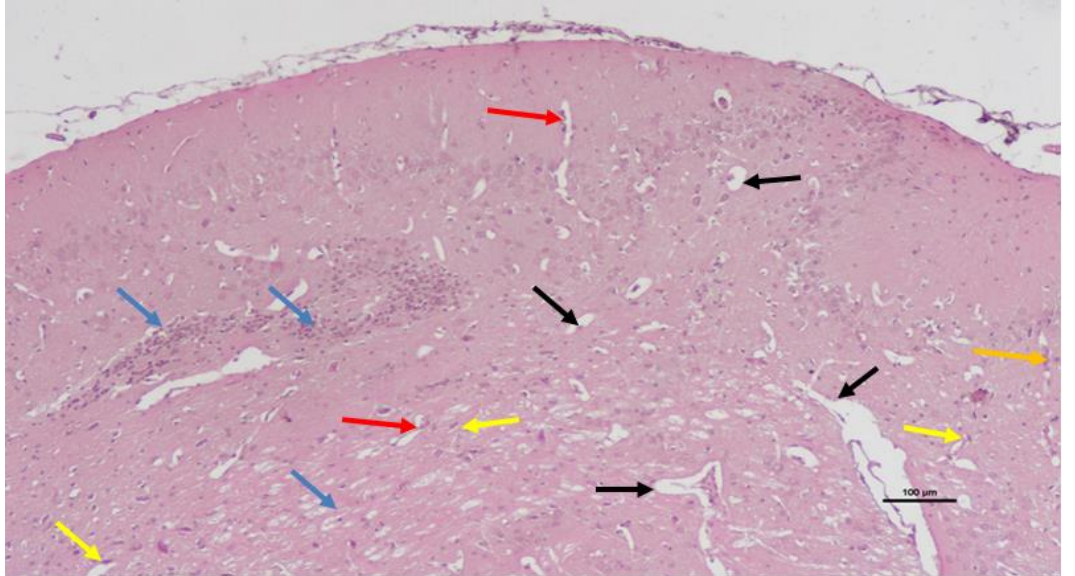
Gruplar arasındaki histopatolojik bulgular Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama ± SD olarak ifade edilmektedir.

^a K ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artış olduğunu ifade eder (p<0.05).

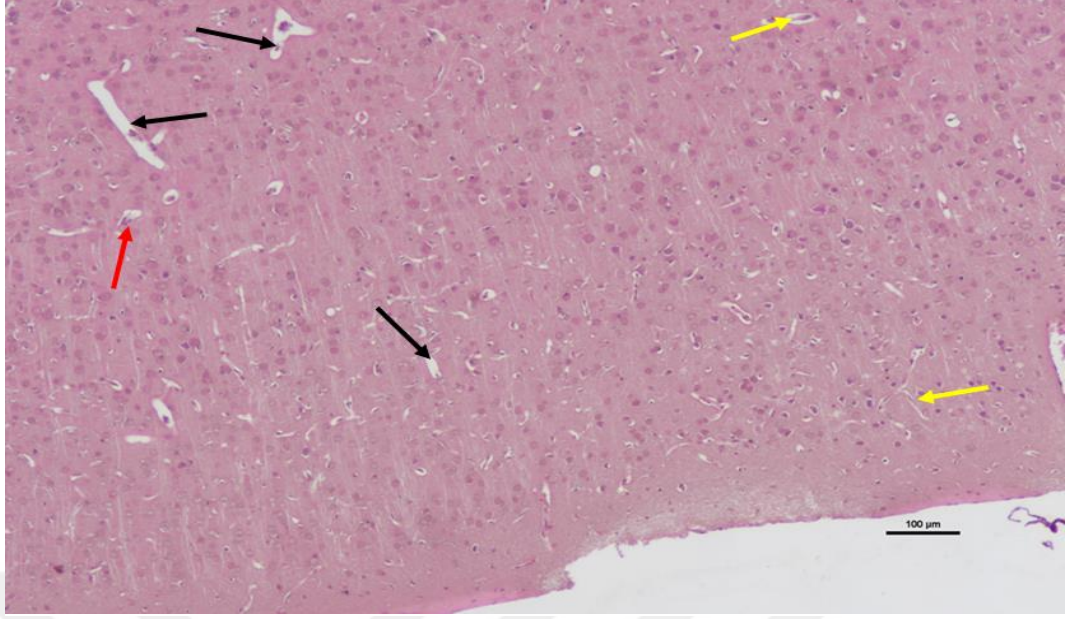
^b LPS ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalma olduğunu ifade eder (p<0,05).



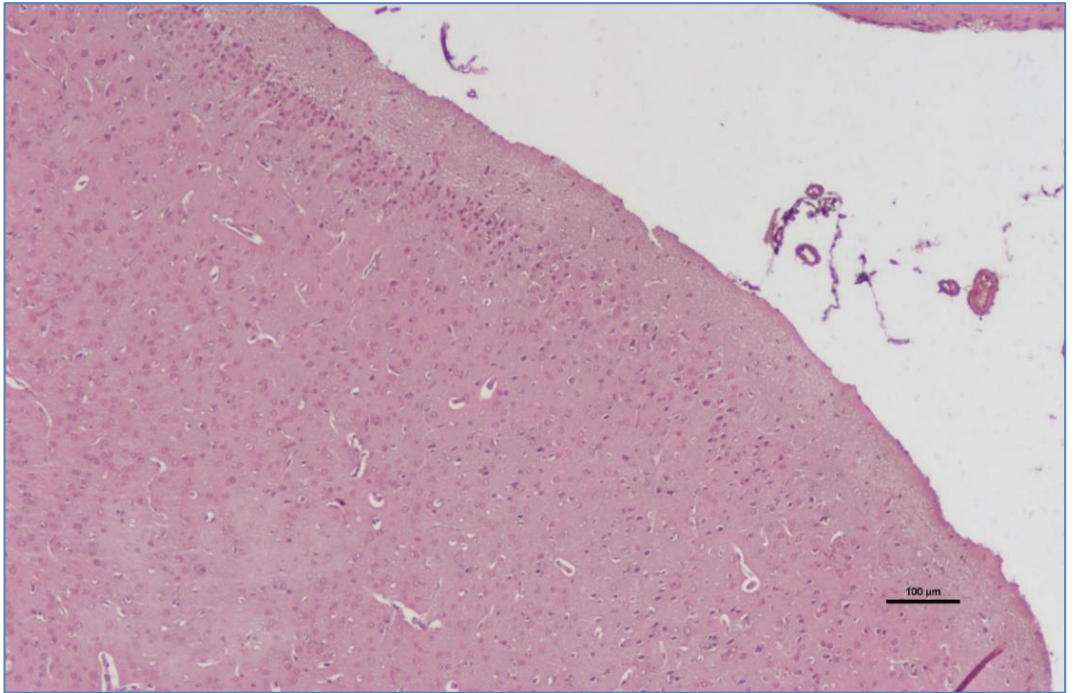
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait beyin doku kesiti. Normal histolojik yapılar dışında kısmen de olsa bazı alanlarda nöropil vakuolizasyonu ve nöronlarda piknotik nukleus gibi bulgulara rastlanmıştır, (H-E, x100).



Resim 4.2. LPS grubuna ait beyin doku kesiti. Kontrol ve karnitin verilen gruplara kıyasla histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı oklar; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; nöron dejenerasyonunu, turuncu oklar; hemorajik alanları ve mavi oklar; mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermektedir, (H-E, x100).



Resim 4.3. LPS+Karnitin grubuna ait beyin doku kesiti. Histopatolojik bulgulara LPS grubuna kıyasla azalmalar gözlenmiştir. Siyah oklar; nöropil vakuolizasyonunu, sarı oklar; nöronlarda piknotik nukleusu, kırmızı oklar; lewy cisimciklerini göstermektedir, (H-E, x100).



Resim 4.4. Karnitin grubuna ait beyin doku kesiti. Normal histolojik yapılar dışında kısmen de olsa bazı alanlarda nöropil vakuolizasyonu, nöronlarda piknotik nukleus ve hemorajik alanlar gözlemlenmiştir, (H-E, x100).

5. TARTIŞMA

Nöroinflamasyonun, nörodejeneratif hastalıkların ve bilişsel fonksiyon bozukluğunun başlatılması ve sürdürülmesinde katkıda bulunduğu bilinmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezi belirsizliğini korumaktadır ve bu hastalıklar için etkin tedavi arayışları hala sürmektedir. Bu nedenle, uygun bir deneysel modelde nöroinflamasyonla ilişkili bilişsel fonksiyon bozukluğu ve nörodejeneratif hastalıkların araştırılması önemlidir (35). Biz de bu amaçla LPS uygulaması ile nöroinflamasyon modeli oluşturduk ve subkronik L-karnitin uygulamasının (4 hafta) bu tabloya etkilerini araştırdık. LPS ilk olarak 3 mg/kg dozunda uygulanıp akut inflamasyon tetiklenmiş, ardından inflamasyonu sürdürmek için haftada bir 250 µg/kg düşük dozda çalışma sonuna kadar LPS uygulaması yapılarak nöroinflamasyon modeli oluşturulmuştur. Lipopolisakkaritin ilk doz uygulamasından bir gün sonra, karnitin enjeksiyonu başlamış olup 28 gün boyunca subkronik karnitin uygulaması eş zamanlı olarak yapılmıştır. LPS uygulanan sıçanların hem serum hem de hipokampus dokusunda proinflamatuvar sitokinlerin (IL-18, TNF-α) arttığı, aynı zamanda hipokampus dokusunda IL-18 ve NLRP3 gen ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Bu veriler nöroinflamasyon tablosunun oluştuğunu göstermektedir. Ek olarak LPS uygulanan grupta K ve Kar grubuna göre hipokampusün histopatolojik değerlendirmesi sonucu hipokampüste nöron dejenerasyonunda artış, nöron sayısında azalma, hemorajik alanlarda artış, nöronlarda piknotik nukleus artışı, nöropil vakuolizasyon artışı, mononükleer hücre infiltrasyonunda artış saptanmıştır. Bu olumsuz etkiler KarLPS grubunda kısmen hafiflemiştir. Aynı zamanda LPS uygulanan sıçanların serumlarında ve hipokampus dokusunda oksidatif stresin artmış olduğu da saptanmıştır. KarLPS grubunda ise LPS grubuna göre hipokampüste oksidatif stresin azaldığı gözlenmiştir. Serum ve hipokampus dokusunda LPS uygulaması ile yükselen IL-18 düzeyleri L-karnitin uygulaması ile kontrol grubu düzeyine düşmüştür. TNF-α açısından serumda L-karnitin'in düzeltici/iyileştirici etkisi anlamlı değil iken hipokampus dokusunda L-karnitin TNF-α düzeyini düşürerek kontrol grubu düzeyine çekmiştir. LPS uygulamasının IL-18 ve NLRP3 mRNA ekspresyonunda artışa neden olduğu ancak çalışmamızda kullandığımız doz

ve süre ile L-karnitin uygulamasının ekspresyon üzerine bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Literatürde farklı LPS dozları ile oluşturulan nöroinflamasyon modelleri ve beyin dokusunda çeşitli parametreler üzerine etkilerini ortaya koyan çalışmalar vardır (169,185). Bizim modelimizin de bu verilerle uyumlu şekilde olduğunu gözlemledik. Nöroinflamasyon modelinde serum ve doku düzeyinde inflamatuvar sitokin ölçümleri yaygın olarak çalışılmıştır. Badshah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelere 2 günde bir toplam 7 kez 250 µg/kg dozunda ip LPS verilmiştir. LPS'nin hipokampüste TNF-α düzeyi, reaktif oksijen türevleri ve mitokondriyal apoptozu kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (186). Kitazawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelere haftada 2 kez 0,5 mg/kg, 6 hafta ip LPS verilmiştir. Altı hafta sonunda LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre mikrogial aktivasyonda ve proinflamatuvar sitokin olan IL-1 düzeyinde artış görülmüştür (187). Raeufy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanlara ip 500 µg/kg LPS enjeksiyonu ve sonrasında 30, 60, 100 mg/kg dozlarda 6 gün boyunca ip karnitin verilmiştir. LPS uygulaması sonrası sıçanlarda TLR/NF-κB yolunun aktivasyonu, karnitin uygulaması sonrası ise bu yolağın inaktivasyonu sonucu LPS kaynaklı nöroinflamasyonun azaldığı saptanmıştır (188). Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelere 5 mg/kg tek doz ip LPS verilmiş, 3 gün sonra hipokampüste TNF-α ve IL-18 düzeyi ölçülmüştür. LPS uygulanan gruptaki sıçanların hipokampüsünde TNF-α ve IL-18 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Serumda bakılan TNF-α düzeylerinin LPS grubunda bulunan sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (189).

Bossu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, LPS grubundaki sıçanlara 1 kez ip 5 mg/kg LPS yapılmıştır. Yedinci gün ve 10. ayda hipokampus ve serumda TNF-α, IL-18 düzeyleri ölçülmüştür. Bunların sonucunda 7. günde LPS grubunda, hipokampus ve frontal kortekste TNF-α düzeyinde anlamlı artış görülmüştür. İnterlökin 18 düzeyinde ise, beyin bölgelerinde kontrol grubuna göre artış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Onuncu aydaki testlerde TNF-α ve IL-18 düzeyi, hipokampus, frontal korteks ve serebellumda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Serumda kısa süreli proinflamatuvar sitokin artışı ile santral sinir

sistemine geçen sitokinlerin kronik nöroinflamasyondan sorumlu olduğu düşünülmüştür (165). Bu çalışmalarda uygulanan L-karnitin dozu ve süresinde farklılık olmakla beraber bizim çalışmamızla uyumlu şekilde LPS ile indüklenen nöroinflamasyonu L-karnitin uygulaması hafifletmekte hatta düzeltmektedir.

Kazak ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı araştırmada, çalışmanın 3. günü kontrol hariç tüm gruplara tek doz 3 mg/kg LPS, profilaksi ve tedavi için, iki farklı gruba 5 gün boyunca günde bir kez 100 mg/kg ve 300 mg/kg asetil L-karnitin uygulanmıştır. LPS grubu beyin dokusu BDNF düzeyinin, kontrol ve 100 mg/kg asetil L-karnitin verilmiş olan gruplara göre düşük olduğu bulunmuştur. Literatürdeki diğer verilerin aksine 300 mg/kg asetil L-karnitin verilen grubun ise TNF- α konsantrasyonunun, kontrol ve LPS gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (169). Bu çalışmanın verileri bizim çalışmamızla kısmen çelişmektedir, ancak 300 mg/kg L-karnitin uygulaması sadece 5 gün yapılmış ve akut etki değerlendirilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda bu süre 28 gündür ve L-karnitin bu süreç sonunda TNF- α düzeyini hipokampüste anlamlı düzeyde düşürmüştür. Bu çelişkinin L-karnitin'in akut etki ve kronik etkiden kaynaklanabileceği kanısındayız.

Literatürde yapılan birçok çalışmada NLRP3 inflamazom yolunun inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli olduğu vurgulanmıştır (61). Dominguni ve arkadaşları sıçanlarda sepsis ilişkili nöroinflamasyon oluşturduktan 24 saat sonra hipokampus dokusunu incelemiştir. Sepsis oluşturulan gruptaki sıçanların hipokampusleri incelendiğinde IL-18 ile NLRP3 proteinlerinde artış saptanmıştır (190). Bian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanlara 2 günde bir 500 μ g/kg dozunda LPS ip 2 hafta uygulanmış ve LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla hipokampus NLRP3 ekspresyonunda anlamlı artış görülmüştür (191). Vizuete ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanlara ip 1 mg/kg LPS verilmiştir. Hipokampus 6 ve 24 saat sonra incelenmiş ve 6. saatte NLRP3 proteinini kodlayan mRNA'nın arttığı gösterilmiştir (192). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, fareler 4 hafta boyunca hafif şiddette strese maruz bırakılmış, 4 hafta sonunda strese maruz kalan farelerin hipokampuslerinde kontrol grubuna göre Western blot yöntemiyle ölçülen NLRP3 proteini anlamlı düzeyde artmış bulunmuştur. Lipopolisakkarit uygulamasının beyinde TLR'ye bağlanarak NF- κ B gen

transkripsiyonunu aktive ettiği ve bu yolla NLRP3 geninin ekspresyonu arttırdığı ve ardından, IL-18 ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler aktive olarak nöroinflamasyon olduğu ileri sürölmüştür (193).

Bizim çalışmamızda kullanılan LPS dozu ve süresinde farklılık olmasına rağmen benzer şekilde bizim çalışmamızda da LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre IL-18 ve NLRP3 mRNA ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır ancak bu tabloya uyguladığımız L-karnitin süresi ve/veya dozu ile iyileştirici bir etki saptanamamıştır.

Santral sinir sisteminde mikrogliyal aktivasyon sonucu, kronik inflamasyon olduğuunda oksidatif nitrozatif stres meydana gelir. Oluşan oksidatif nitrozatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, ROS üretiminde artış ve inflamatuvar yanıtın şiddetlenmesine yol açar. İnflamasyon ve oksidatif stres iç içe girer (46). Karnitinin antioksidan etkisi; serbest radikalleri doğrudan süpürmesi, stres koşullarında mitokondri bütönlüğünün korunması ve ROS oluşumunun önlenmesi, ksantin oksidaz ve NADPH oksidazlar gibi ROS üreten enzimlerin inhibe edilmesi, antioksidan enzimlerin (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz vb.) ve küçük antioksidan moleköllerin (glutatyon) ek sentezi, NF- κ B'nin inhibisyonu yoluyla redoks sinyalinin etkileme üzerinedir (158)

Kang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, erkek sıçanlara 3 gün ip LPS verilmiş ve enjeksiyonundan hemen sonra hipokampüste ölçümler yapılmıştır. Lipopolisakkarit grubunda kontrol grubuna göre ölçölen H₂O₂, NO ve malondialdehit düzeylerinin arttığı, SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (194). Aslankoç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, dişi sıçanlara 5 mg/kg tek doz LPS uygulanmıştır. Altı saat sonrasında sıçanlar sakrifiye edilip hipokampüste TAS, TOS çalışılmıştır. Oksidatif stres belirteçlerinin, TOS ve OSI seviyelerinin LPS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur (sırasıyla p=0,022, p=0,019) (195). Savran ve arkadaşları dişi sıçanlara 5 mg/kg LPS enjeksiyonu yapmıştır. Dördüncü gün hipokampus ve beyin dokusunda TAS seviyelerini önemli ölçüde azaltmış, TOS ve OSI seviyelerinin LPS ile önemli ölçüde artmış olduğu bulunmuştur (196). Bu çalışmalar farklı dozlarda LPS uygulaması ile beyin, hipokampus dokusunda oksidatif stres artışını ortaya

koymuştur. Bizim alışmamızda da benzer şekilde LPS uygulaması oksidatif stresi arttırmıştır.

Raeufy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, erkek sıçanlara ip 500 µg/kg LPS enjeksiyonu ve sonrasında 30, 60, 100 mg/kg dozlarda 6 gün boyunca ip karnitin verilmiştir. Karnitinin uygulamasının, TLR4/NF-κB yolunun baskılanması, oksidatif stresi azaltarak LPS kaynaklı nöroinflamasyona karşı nöroprotektif etkide bulunduğu gösterilmiştir (188). Biz alışmamızda TAS, TOS ve OSI düzeylerini serum ve hipokampus dokusunda analiz ettik, LPS'nin oksidatif stresi ve OSI'yi anlamlı düzeyde arttırdığını buna karşı L-karnitinin SSS'de koruyucu etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Lipopolisakkaritin hipokampus histopatolojisindeki etkilerinin, artan mikrogliyal aktivasyona ve mikrogliyalardan fazla miktarda proinflamatuvar sitokin salınımına bağlı olduğu düşünülmektedir (30). Nöroinflamasyonda, hipokampüste histopatolojik olarak nöron sayısında azalma ve nöron dejenerasyonunun oluştuğu saptanmıştır. Khan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ip LPS, farelere 0,25 mg/kg/gün dozunda 7 gün uygulanmıştır. Beyin korteksi ve hipokampusnde immünohistokimyasal incelemeyle (Nissl boyama) canlı nöron reaktivitesi ve dansitesi değerlendirilmiş, fare korteks ve hipokampusndeki nöronal hayatta kalma reaktivitesini kontrol grubu farelere kıyasla azalttığını göstermiştir. Dolayısıyla, LPS verilen grupta korteks ve hipokampüste nöron kaybı kontrol grubuna kıyasla daha fazla bulunmuştur (197). Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, erkek sıçanlara 2 günde bir 2 hafta boyunca ip 500 µg/kg LPS uygulanmıştır, ilk LPS enjeksiyonundan 15 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Hipokampusün histokimyasal incelemesinde kontrol grubunda herhangi bir anormallik bulunmazken, LPS grubunda nöronlarda dejenerasyon ve piknotik nukleus grlmştir (198). Tunç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 13 gün boyunca 1 mg/kg dozunda ip LPS verilmiş ve kontrol grubunda bulunan sıçanların beyin dokuları histolojik olarak normal iken LPS uygulanan sıçanların nöronlarında dejeneratif değişiklikler, büzülmüş ve asidofilitesi artmış sitoplazma, küçülmüş ve koyu renkli görünüm almış piknotik nukleuslar görülmüş ve bu sonuç anlamlı olarak değerlendirilmiştir (199).

Tüm bu veriler bizim çalışmamızla uygun şekilde LPS ile indüklenen nöroinflamasyonun olumsuz sonuçlarını desteklemektedir. LPS uygulaması sonrası karnitin uygulanan grupta, LPS grubuna göre histopatolojik bulgularda düzelme bulunmuş olup karnitin uygulaması bu olumsuz sonuçları kısmen düzeltmiş ancak kontrol grubu düzeyine getirememiştir.

Öğrenme ve davranış deneyleri incelendiğinde tüm grupların eğitim dönemi sonunda Morris su labirentinde saklı platformu bulmayı öğrendikleri ancak öğrenme hızları açısından farklılık gösterdikleri görülmüştür. Birinci, 3. ve 4. eğitim günlerinde LPS grubu ile KarLPS grubu performansı arasında anlamlı bir fark saptanmış, LPS grubu tüm günlerde anlamlı düşük performans göstermiştir. Ayrıca 3. ve 4. günlerde sadece KarLPS grubu ile değil kontrol ve Kar grubu ile de LPS grubu arasında anlamlı farklılık söz konusudur. Eğitim dönemi sonunda tüm gruplar sistemin amacını anlamış ancak LPS grubu öğrenme süresi açısından diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düşük performans göstermiştir. Test gününde ‘Hedef kadranda geçirilen süre (sn)’ açısından LPS grubu verisi tüm gruplara göre daha kısayken KarLPS grubunda anlamlı bir iyileşme sağlanmış ve K grubu düzeyinde bir performans söz konusu olmuştur. Açık alan testinde sistemi tanımayı amaçlayan keşifçi davranışın göstergesi duvara tırmanma ve şahlanma verisi açısından LPS grubu en düşük performansı gösterirken KarLPS grubunda anlamlı bir düzelme sağlanmıştır. Sistemde katedilen toplam mesafe ve hız açısından değerlendirildiğinde yine LPS grubunun en düşük performansı gösterdiği, buna karşılık KarLPS grubunda anlamlı bir düzelme ile kontrol grubu seviyesinin yakalandığı görülmüştür. Zorlanmış yüzmeye testinde sıçanların yaşamayı isteme ve sistemden kurtulma isteğini özellikle son 3 dakikada değerlendirdiğimizde LPS grubunda hareketsiz kalınan süre daha uzunken, kontrol ve KarLPS gruplarında hareketlilik süresi anlamlı düzeyde yüksektir. Davranış deneylerinin verileri subkronik L-karnitin uygulamasının LPS ile oluşturulan nöroinflamasyon karşısında hipokampal mekansal hafıza ve nörodavranışsal açıdan iyileşme sağladığını desteklemektedir.

Literatürde LPS uygulamasının öğrenme ve hafızayı bozduğuna ve/veya nörodavranışsal olumsuz etkiler yarattığına dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (166,198,200-204).LPS ile indüklenen nöroinflamasyona cevaben bozulan bilişsel fonksiyona L-karnitin’in etkisini araştıran çalışmalar kısıtlıdır. Farklı uygulamalarla

oluşturulan bilişsel fonksiyon bozukluğuna L-karnitin'in olumlu etkileri yayınlanmıştır (172,174). Nouri ve arkadaşlarının yetişkin sıçanlarda valproik asit kaynaklı bilişsel fonksiyon bozukluğuna karşı L-karnitinin koruyucu etkisini araştırdığı çalışmada, 50 mg/kg/gün ip L-karnitin 28 gün boyunca sıçanlara uygulanmıştır. Morris su labirenti deneyinde karnitin alan grubun hedef platformu bulma süresinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde kısaldığı bulunmuştur (172).



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Nörodejeneratif hastalıklar günümüzde önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir ve en önemli sebeplerinden biri nöroinflamasyondur. Nörodejeneratif hastalıkların etyopatogenezi ve tedavi arayışları hala sürmektedir. Bu nedenle, uygun bir hayvan deneyi modelinin oluşturulması, nöroinflamasyonla ilişkili bilişsel fonksiyon bozukluğu ve nörodejeneratif hastalıkların araştırılması ve koruyucu ve/veya iyileştirici bir ajan geliştirilebilmesi için son derece önem taşımaktadır.

Morris su labirenti, açık alan ve zorlanmış yüzme testinde performansın LPS grubunda diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düşük olduğu bulunmuştur. Hipokampus IL-18, TNF- α , TOS, OSI düzeyleri ve NLRP3, IL-18 gen ekspresyon düzeyleri LPS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. LPS grubunda kontrol grubuna göre serumda IL-18, TNF- α düzeyleri ile TOS ve OSI düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır.

Karnitin, nöroinflamasyon üzerine etkisini değerlendirdiğimizde, öğrenme ve nörodavranış deneylerinde L-karnitin uygulaması performanslarında anlamlı bir iyileşme, hipokampüste IL-18, TNF- α düzeylerinde ve oksidatif stres düzeyinde azalma sağlarken NLRP3, IL-18 gen ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik yaratmamıştır. Subkronik L-karnitin uygulaması LPS ile oluşturulan nöroinflamasyon varlığında hipokampüste inflamasyonun göstergesi olan sitokinlerin düzeyini düşürebilmekte ancak bunu IL-18 ve NLRP3 mRNA ekspresyonu üzerinden gerçekleştirmemektedir, inflamasyonu azaltma şekli farklı bir mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir. Bu etki büyük ihtimalle antioksidan etkisi ile sağlanmaktadır.

Verilerimizin ışığında L-karnitin SSS'de inflamasyona bağlı oluşan hasarların azaltılmasında nöroprotektif bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği söylenebilir. Nöroinflamasyonla seyreden SSS hastalıklarında L-karnitin tedavi edici ve/veya destekleyici bir ajan olabileceğini ortaya koyan çalışmamızda nörodejeneratif hastalıkların seyrinde L-karnitin kullanımının önemli faydalar sağlayacağı tahmin edilmektedir. L-karnitin bu etkilerinin hangi doz ve sürede

nöroinflamasyon üzerindeki olumlu etkilerini sağladığına dair net verileri ortaya koyacak daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın kısıtlılığı, IL-18 ve NLRP3'ün western blotting ile protein ürünlerinin değerlendirilmemiş olmasıdır. Ek olarak fosforile NF- κ B'nin western blotting ile analizi karnitinin antiinflamatuvar etkisinin NF- κ B transkripsiyon faktörünü baskılaması aracılığıyla olup olmadığını gösteremedik.



ÖZET

Nöroinflamasyon Modelinde L-Karnitin Uygulamasının Bilişsel İşlevler ve NLRP3 Yolu, TNF-Alfa, IL-18 Üzerine Etkisi

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık problemi olan, nöroinflamasyonla ilgili seyreden nörodejeneratif hastalıklara bağlı giderek artan morbidite ve mortalite nedeniyle tedavi arayışları devam etmektedir. Çalışmamızda LPS ile oluşan nöroinflamasyon modeli üzerine L-karnitinin olası nöroprotektif, antiinflamatuvar, antioksidan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmamızda Wistar Albino türü 32 adet 4-6 aylık erkek sıçan kullanılmış olup 4 gruba ayrılmıştır. Gruplar K, LPS, KarLPS ve Kar grubu olarak eşit sayıda ayrılmıştır. LPS ve LPS+Karnitin gruplarına ilk gün 3 mg/kg ip LPS enjeksiyonu uygulanmıştır. Daha sonra LPS birer hafta aryla 3 kez 250 µg/kg idame dozu olarak LPS ve LPS+Karnitin gruplarına ip enjekte edilmiştir. Karnitin, 300 mg/kg dozda ip olarak KarLPS ve Kar gruplarına 28 gün boyunca uygulanmıştır. K grubundakilere eş hacimde ip serum fizyolojik uygulanmıştır. Daha sonra sıçanların Morris su labirent testi, açık alan testi ve zorlanmış yüzme testindeki performansları değerlendirilmiştir. Bu testlerden sonra hipokampüste sitokinler, TAS, TOS düzeyleri, NLRP3 ve IL18 ekspresyon düzeyleri, histokimyasal incelemeler, serumda sitokin, TAS, TOS düzeyleri değerlendirilmiştir.

Öğrenme deneylerinde LPS grubunda performansın diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Hipokampüste IL-18, TNF- α , TOS, OSI düzeyleri, NLRP3 ve IL-18 ekspresyon düzeyleri LPS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Serumda IL18, TNF- α düzeyleri ile TOS ve OSI düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Hipokampus dokusu histopatolojik olarak değerlendirildiğinde LPS grubuna ait dokularda, kontrol grubuna göre önemli yapısal değişiklikler görülmüştür.

Kar+LPS grubunda LPS grubuna göre öğrenme deneylerinde performanslarında anlamlı bir iyileşme, hipokampüste IL-18, TNF- α , TOS, OSI düzeylerinde azalma ve histokimyasal değerlendirmede nöroinflamatuvar histopatolojik bulgularda anlamlı olarak azalma olduğu görülmüştür. Serumda IL-18 düzeyinde anlamlı bir düşüş görülmüştür.

Çalışmamızda, karnitin SSS'de inflamasyona bağlı oluşan hasarların azaltılmasında nöroprotektif bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceğini öngörmekteyiz ancak en iyi sonucu alabilmek için doz, sıklık ve kullanım süresini açısından daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: IL-18, Karnitin, LPS, NLRP3, Nöroinflamasyon

ABSTRACT

Effects of L-Carnitine Administration on Cognitive Functions and NLRP3 Pathway, TNF-Alpha, IL-18 in Neuroinflammation Model

Due to the increasing morbidity and mortality related to neurodegenerative diseases characterized by neuroinflammation, is an important health problem in our country as well as in the world, and the search for treatment of these diseases are still continued. In our study, we aimed to evaluate the possible neuroprotective, antiinflammatory and antioxidant effects of L-carnitine on LPS-induced neuroinflammation model.

In our study, 32 male Wistar Albino rats, aged 4-6 months, were divided into 4 groups. The groups were divided equally as C, LPS, CarLPS and Car groups. LPS and LPS+Carnitine groups received 3 mg/kg ip LPS injection on the first day. Then, LPS was injected LPS and LPS+Carnitine groups at a dose of 250 µg/kg per week as a maintenance dose for 3 weeks. Carnitine was administered at a dose of 300 mg/kg ip to the CarLPS and Car groups for 28 days. An equal volume of ip saline was administered to the C group. Then, the performance of the rats in Morris water maze, open field task and forced swimming task were evaluated. After these tests, cytokine levels, NLRP3 and IL18 expression levels and histochemical evaluations in the hippocampus, and cytokine, TAS and TOS levels in hippocampi and serum were evaluated.

In learning and neurobehavior experiments, it was found that the performance of the LPS group was significantly lower than the other groups. IL-18, TNF- α , TOS, OSI levels, NLRP3 and IL-18 expression levels in the hippocampus were significantly higher in the LPS group compared to the control group. IL-18, TNF- α levels, TOS and OSI levels were found to be increased in serum. When the hippocampus tissue was evaluated histopathologically, significant structural changes were observed in the tissues of the LPS group compared to the control group.

In the Car+LPS group, there was a significant improvement in their performance in learning and neurobehavior experiments, a decrease in IL-18, TNF- α , TOS, OSI levels in the hippocampus and a significant decrease in neuroinflammatory histopathological findings in histochemical evaluation compared to the LPS group. A significant decrease was observed in serum IL-18 level.

In our study, we suggest that carnitine may be used as a neuroprotective treatment option in the reduction of inflammation-induced damage in the CNS, however, more studies are needed in order to specify the dose, frequency and usage period to get the best result

Keywords: Carnitine, IL-18, LPS, Neuroinflammation, NLRP3

KAYNAKLAR

1. Pintado C, Gavilán MP, Gavilán E, Garcia-Cuervo L, Gutierrez A, Vitorica J et al. Lipopolysaccharide induced neuroinflammation leads to the accumulation of ubiquitinated proteins and increases susceptibility to neurodegeneration induced by proteasome inhibition in rat hippocampus. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 87. doi.org/10.1186/1742-2094-9-87.
2. Zanelli SA, Solenski NJ, Rosenthal RE, Fiskum G. Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1053:153-161. doi:10.1196/annals.1344.013.
3. Traina G. The neurobiology of acetyl-L-carnitine. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016; 21(7): 1314-1329. doi:10.2741/4459.
4. Akther M, Haque ME, Park J, Kang TB, Lee KH. NLRP3 ubiquitination-a new approach to target NLRP3 inflammasome activation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(16): 8780. doi:10.3390/ijms22168780.
5. Izgüt-Uysal VN, Ağaç A, Derin N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J Gastroenterol*. 2001; 36(4): 231-236. doi:10.1007/s005350170108.
6. Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. L-Carnitine protects plasma components against oxidative alterations. *Nutrition*. 2011; 27(6): 693-699. doi:10.1016/j.nut.2010.06.009.
7. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016; 353(6301): 777-783. doi:10.1126/science.aag2590.
8. Leicht H, König HH, Stuhldreher N, Bachmann C, Bickel H, Fuchs A et al. Predictors of costs in dementia in a longitudinal perspective. *PLoS One*. 2013; 8(7): e70018. doi:10.1371/journal.pone.0070018.
9. Vezzani A. Epilepsy and inflammation in the brain: Overview and pathophysiology. *Epilepsy Curr*. 2014; 14(1): 3-7. doi:10.5698/1535-7511-14.s2.3.
10. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World*. 2018; 11(5): 627-635. doi:10.14202/vetworld.2018.627-635.
11. Dey A, Kang X, Qiu J, Du Y, Jiang J. Anti-inflammatory small molecules to treat seizures and epilepsy: From bench to bedside. *Trends Pharmacol Sci*. 2016; 37(6): 463-484. doi:10.1016/j.tips.2016.03.001.
12. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016; 139(2): 136-153. doi:10.1111/jnc.13607.
13. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci Res*. 2014; 79: 1-12. doi:10.1016/j.neures.2013.10.004.
14. Kempuraj D, Thangavel R, Selvakumar GP, Zaheer S, Ahmed M, Raikwar SP et al. Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2017; 11: 216. doi:10.3389/fncel.2017.00216.
15. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *J Neuroinflammation*. 2004; 1(1): 14. doi:10.1186/1742-2094-1-14.
16. Kielian T. Multifaceted roles of neuroinflammation: The need to consider both sides of the coin. *J Neurochem*. 2016; 136(1): 5-9. doi:10.1111/jnc.13530.
17. McManus RM, Heneka MT. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: New insights. *Alzheimers Res Ther*. 2017; 9(1): 14. doi:10.1186/s13195-017-0241-2.
18. Meneses G, Cárdenas G, Espinosa A, Rassy D, Pérez-Osorio IN, Bárcenaet B et al. Sepsis: Developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2019; 1437(1): 43-56. doi:10.1111/nyas.13985.

19. Venneti S, Wiley CA, Kofler J. Imaging microglial activation during neuroinflammation and alzheimer disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009; 4(2): 227-243. doi:10.1007/s11481-008-9142-2.
20. Perry VH. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol.* 1998; 90(2): 113-121. doi:10.1016/s0165-5728(98)00145-3.
21. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007; 10(11): 1387-1394. doi:10.1038/nn1997.
22. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: A general review. *Int J Neurosci.* 2017; 127(7): 624-633. doi:10.1080/00207454.2016.1212854.
23. Park SE, Sapkota K, Kim S, Kim H, Kim SJ. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2microglial cells. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(3): 1008-1025. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01389.x.
24. Mazeraud A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy and physiology of brain dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med.* 2016; 37(2): 333-345. doi:10.1016/j.ccm.2016.01.013.
25. Steardo LJ, Bronzuoli MR, Lacomino A, Esposito G, Steardo L, Scuderi C et al. Neuroinflammation turn on the flame in alzheimer's disease? focus on astrocytes. *Front Neurosci.* 2015; 9: 259. doi:10.3389/fnins.2015.00259.
26. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1): 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
27. Kreisl WC, Kim MJ, Coughlin JM, Henter ID, Owen DR, Innis RB et al. PET imaging of neuroinflammation in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2020; 19(11): 940-950. doi:10.1016/S1474-4422(20)30346-X.
28. Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. Inflammatory process in alzheimer's disease. *Front Integr Neurosci.* 2013; 7: 59. doi:10.3389/fnint.2013.00059.
29. Miklossy J. Chronic inflammation and amyloidogenesis in alzheimer's disease -- role of spirochetes. *J Alzheimers Dis.* 2008; 13(4): 381-391. doi:10.3233/jad-2008-13404.
30. Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, De Oliveira ACP. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(9): 2293. doi:10.3390/ijms20092293.
31. Auer GK, Weibel DB. Bacterial cell mechanics. *Biochemistry.* 2017; 56(29): 3710-3724. doi:10.1021/acs.biochem.7b00346.
32. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(1): 8-14. doi:10.1038/nrmicro2266.
33. Ohanian SH, Schwab JH. Persistence of group a streptococcal cell walls related to chronic inflammation of rabbit dermal connective tissue. *J Exp Med.* 1967; 125(6): 1137-1148. doi:10.1084/jem.125.6.1137.
34. Flierl MA, Stahel PF, Rittirsch D, Huber-Lang M, Niederbichler AD, Hoesel LM, et al. Inhibition of complement C5a prevents breakdown of the blood-brain barrier and pituitary dysfunction in experimental sepsis. *Crit Care.* 2009; 13(1): 12. doi:10.1186/cc7710.
35. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 5790. doi:10.1038/s41598-019-42286-8.
36. Özbek M, Hitit M, Ergün E, Beyaz F, Ergün L. Toll benzeri reseptörler. 2017. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 5(2): 180-192.

37. Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: From local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012; 303(5): 355-363. doi:10.1152/ajplung.00069.2012.
38. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011; 30(1): 16-34. doi:10.3109/08830185.2010.529976.
39. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5): 373-384. doi:10.1038/ni.1863.
40. Beutler B. TLR4: Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12(1): 20-26. doi:10.1016/s0952-7915(99)00046-1.
41. Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3: 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00003.
42. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, TLR-4. *Immunology.* 2004; 113(2): 153-162. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x.
43. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: Mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1): 209. doi:10.1038/s41392-020-00312-6.
44. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen EF, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a TLR-4 dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(14): 8514-8519. doi:10.1073/pnas.1432609100.
45. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol.* 2007; 208(1): 1-25. doi:10.1016/j.expneurol.2007.07.004.
46. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011; 107(1): 57-64. doi:10.1093/bja/aer093.
47. Zakaria R, Wan Yaacob WM, Othman Z, Long I, Ahmad AH, Al-Rahbi B. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: A model of alzheimer's disease. *Physiol Res.* 2017; 66(4): 553-565. doi:10.33549/physiolres.933480.
48. Choi DY, Lee JW, Lin G, Lee YK, Lee YH, Choi IS. Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF- κ B signaling pathway. *Neurochem Int.* 2012; 60(1): 68-77. doi:10.1016/j.neuint.2011.11.005.
49. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav Brain Res.* 2001; 124(1): 47-54. doi:10.1016/s0166-4328(01)00232-7.
50. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2): 24-32. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016.
51. Kanneganti TD. The inflammasome: Firing up innate immunity. *Immunol Rev.* 2015; 265(1): 1-5. doi:10.1111/imr.12297.
52. Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions. *Cell.* 2016; 165(4): 792-800. doi:10.1016/j.cell.2016.03.046.
53. Li Y, Lv J, Shi W, Feng J, Liu M, Ganet S et al. Inflammasome Signaling: A novel paradigm of hub platform in innate immunity for cancer immunology and immunotherapy. *Front Immunol.* 2021; 12: 710110. doi:10.3389/fimmu.2021.710110.
54. Xue Y, Enosi Tuipulotu D, Tan WH, Kay C, Man SM. Emerging activators and regulators of inflammasomes and pyroptosis. *Trends Immunol.* 2019; 40(11): 1035-1052. doi:10.1016/j.it.2019.09.005.
55. Kesavardhana S, Kanneganti TD. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *Int Immunol.* 2017; 29(5): 201-210. doi:10.1093/intimm/dxx018.

56. Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan KY, Lim C, Harapas CR, et al. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *J Biol Chem.* 2018; 293(49): 18864-18878. doi:10.1074/jbc.RA118.004350.
57. Rathinam VAK, Chan FK. Inflammasome, inflammation, and tissue homeostasis. *Trends Mol Med.* 2018; 24(3): 304-318. doi:10.1016/j.molmed.2018.01.004.
58. Cornut M, Bourdonnay E, Henry T. Transcriptional regulation of inflammasomes. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(21): 8087. doi:10.3390/ijms21218087.
59. Shi M, Zhang P, Vora SM, Wu H. Higher-order assemblies in innate immune and inflammatory signaling: A general principle in cell biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2020; 63: 194-203. doi:10.1016/j.ceb.2020.03.002.
60. Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: Effectors of pyroptosis. *Trends Cell Biol.* 2017; 27(9): 673-684. doi:10.1016/j.tcb.2017.05.005.
61. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012; 481(7381): 278-286. doi:10.1038/nature10759.
62. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(6): 397-411. doi:10.1038/nri3452.
63. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015; 21(7): 677-687. doi:10.1038/nm.3893.
64. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16(1): 23-31. doi:10.1016/j.mib.2012.11.008.
65. Paget C, Doz-Deblauwe E, Winter N, Briard B. Specific NLRP3 inflammasome assembling and regulation in neutrophils: relevance in inflammatory and infectious diseases. *Cells.* 2022; 11(7): 1188. doi:10.3390/cells11071188.
66. Jiang H, Yiqing Y, Jiang W, RongBin Z. NLRP3 inflammasome: Activation, regulation, and role in diseases. *Sci. Sin. Vitae.* 2017; 47: 125–131.
67. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Claire Jumeau C, Giurgea I, Amselem Set al. Photoaging and skin cancer: Is the inflammasome the missing link?. *Mech Ageing Dev.* 2018; 172: 131-137. doi:10.1016/j.mad.2018.03.003.
68. Lee SM. Role of NLRP3 inflammasome in pathogenesis of pulpal disease. University of Pennsylvania Dental Medicine. *Doctoral Thesis*, (Thesis Supervisor: PhD. Dr. Anh D. Le), 2015; 1-66.
69. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(13): 3328. doi:10.3390/ijms20133328.
70. Lamkanfi M, Kanneganti TD. NLRP3: An immune sensor of cellular stress and infection. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(6): 792-795. doi:10.1016/j.biocel.2010.01.008.
71. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(8): 477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0.
72. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci.* 2016; 41(12): 1012-1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002.
73. González-Moro A, Valencia I, Shamoon L, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C, Cuesta F. NLRP3 inflammasome in vascular disease: A recurrent villain to combat pharmacologically. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(2): 269. doi:10.3390/antiox11020269.
74. Govindarajan V, De Rivero Vaccari JP, Keane RW. Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets. *J Neuroinflammation.* 2020; 17(1): 260. doi:10.1186/s12974-020-01944-9.

75. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013; 38(6): 1142-1153. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.016.
76. Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun*. 2013; 31: 105-114. doi:10.1016/j.bbi.2012.12.008.
77. Haneklaus M, O'Neill LA, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: Recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(1): 40-45. doi:10.1016/j.coi.2012.12.004.
78. Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine*. 2011; 56(2): 140-144. doi:10.1016/j.cyto.2011.08.022.
79. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*. 2002; 35(3): 419-432. doi:10.1016/s0896-6273(02)00794-8.
80. Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res*. 1997; 48(4): 287-298. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19970515)48:4<287:aid-jnr1>3.0.co;2-7.
81. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007; 18(3-4): 335-343. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.04.002.
82. Kaneko M, Stellwagen D, Malenka RC, Stryker MP. Tumor necrosis factor- α mediates one component of competitive, experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Neuron*. 2008; 58(5): 673-680. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.023.
83. Krueger JM. The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(32): 3408-3416. doi:10.2174/138161208786549281.
84. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: Implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 2008; 5: 45. doi:10.1186/1742-2094-5-45.
85. Frankola KA, Greig NH, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF- α to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011; 10(3): 391-403. doi:10.2174/187152711794653751.
86. Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor- α and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012; 7(1): 42-59. doi:10.1007/s11481-011-9287-2.
87. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25(4): 453-472. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.016.
88. Jablonska A, Lukomska B. Stroke induced brain changes: Implications for stem cell transplantation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011; 71(1): 74-85.
89. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: A reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59(1): 13-23. doi:10.1016/s0006-2952(99)00296-8.
90. Van Berlo D, Knaapen AM, van Schooten FJ, Schins RP, Albrecht C. NF-kappaB dependent and independent mechanisms of quartz-induced proinflammatory activation of lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*. 2010; 7: 13. doi:10.1186/1743-8977-7-13.
91. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1(4): a000034. doi:10.1101/cshperspect.a000034.
92. Muhammad M. Tumor necrosis factor alpha: A major cytokine of brain neuroinflammation. In: *Cytokines*, Behzadi P, Eds. London, Intechopen, 2020: p. 27-41.

93. Dinarello CA. Novel targets for interleukin 18 binding protein. *Ann Rheum Dis.* 2001; 60 (3): 18-24. doi:10.1136/ard.60.90003.iii18.
94. Hedtj rn M, Leverin AL, Eriksson K, Blomgren K, Mallard C, Hagberg H. Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2002; 22(14): 5910-5919. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-14-05910.2002.
95. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12(1):53-72. doi:10.1016/s1359-6101(00)00015-0.
96. Conti B, Park LC, Calingasan NY, et al. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999; 67(1): 46-52. doi:10.1016/s0169-328x(99)00034-0.
97. Felderhoff-Mueser U, Schmidt OI, Oberholzer A, B hrer C, Stahel PF. IL-18: A key player in neuroinflammation and neurodegeneration?. *Trends Neurosci.* 2005; 28(9): 487-493. doi:10.1016/j.tins.2005.06.008.
98. Alboni S, Cervia D, Ross B, Montanari C, Gonzalez AC, Sanchez-Alavez M et al. Mapping of the full length and the truncated interleukin-18 receptor alpha in the mouse brain. *J Neuroimmunol.* 2009; 214(1-2): 43-54. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.06.016.
99. Ojala JO, Sutinen EM, Salminen A, Pirttil  T. Interleukin-18 increases expression of kinases involved in tau phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neuroimmunol.* 2008; 205(1-2): 86-93. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.09.012.
100. Wang MJ, Huang HY, Chen WF, Chang HF, Kuo JS. Glycogen synthase kinase-3  inactivation inhibits tumor necrosis factor-  production in microglia by modulating nuclear factor  B and MLK3/JNK signaling cascades. *J Neuroinflammation.* 2010; 7: 99. doi:10.1186/1742-2094-7-99.
101. Alboni S, Cervia D, Sugama S, Conti B. Interleukin 18 in the CNS. *J Neuroinflammation.* 2010; 7: 9. doi:10.1186/1742-2094-7-9.
102. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci.* 2014; 34: 6-17. doi:10.1159/000360925.
103.  zci Y, Erba  YC. Hippocampus: its structure and functions. *T rk N ro ir Derg.* 2015; 25(3): 287-295.
104. Gilbert PE, Brushfield AM. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: A process oriented behavioral assessment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33(5): 774-781. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.03.037.
105. Park D, Bae S, Yoon TH, Ko J. Molecular mechanisms of synaptic specificity: Spotlight on hippocampal and cerebellar synapse organizers. *Mol Cells.* 2018; 41(5): 373-380. doi:10.14348/molcells.2018.0081.
106. Catani M, Dell'acqua F, Thiebaut de Schotten M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013; 37(8): 1724-1737. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.07.001.
107. Noh H, Jeon J, Seo H. Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain. *Neurochem Int.* 2014; 69: 35-40. doi:10.1016/j.neuint.2014.02.008.
108. Quan N, Sundar SK, Weiss JM. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* 1994; 49(1-2): 125-134. doi:10.1016/0165-5728(94)90188-0.
109. Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery.* 1987; 101(6): 746-752.
110. Azmand MJ, Rajaei Z. Effects of crocin on spatial or aversive learning and memory impairments induced by lipopolysaccharide in rats. *Avicenna J Phytomed.* 2021;11(1):79-90.

111. Liu Y, Zhang Y, Zheng X, Fang T, Yang X, Luo X et al. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):112. doi:10.1186/s12974-018-1141-5.
112. Elul R. Regional differences in the hippocampus of the cat. Specific discharge patterns of the dorsal and ventral hippocampus and their role in generalized seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1964; 16: 470-488. doi:10.1016/0013-4694(64)90089-6.
113. Harmeyer J. The physiological role of l-carnitine. *Lohman Information*. 2002; 27: 15-21.
114. Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem*. 1988; 57: 261-283. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.001401.
115. Cave MC, Hurt RT, Frazier TH, Matheson PJ, Garrison RN, McClain CJ et al. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. *Nutr Clin Pract*. 2008; 23(1): 16-34. doi:10.1177/011542650802300116.
116. Rebouche CJ, Chenard CA. Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: Identification and quantification of urinary and fecal metabolites. *J Nutr*. 1991; 121(4): 539-546. doi:10.1093/jn/121.4.539.
117. Karadeniz A, Simsek N, Cakir S. Haematological effects of dietary l-carnitine supplementation in broiler chickens. *Revue Méd. Vét*, 2008; 159(8-9): 437-444.
118. Strijbis K, Vaz FM, Distel B. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life*. 2010; 62(5): 357-362. doi:10.1002/iub.323.
119. Li N, Zhao H. Role of carnitine in non-alcoholic fatty liver disease and other related diseases: An update. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 689042. doi:10.3389/fmed.2021.689042.
120. Çitil M, Veteriner hekimlikte karnitin (carnitine). *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*. 2002; 8(1): 77-82.
121. Matsumura M, Hatakeyama S, Koni I, Mabuchi H. Effect of l-carnitine and palmitoyl-l-carnitine on erythroid colony formation in fetal mouse liver cell culture. *Am J Nephrol*. 1998; 18(5): 355-358. doi:10.1159/000013376.
122. Stanley CA. Carnitine deficiency disorders in children. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1033: 42-51. doi:10.1196/annals.1320.004.
123. Coşkun Ö, Öter ŞK. Genel bilgiler ve egzersiz ile ilişkisi; Fizyolojik ve morfolojik etkileri. *Eğitimde Bilimde Haberde Sağlık*. 2001; 3(1): 11-22.
124. Engel AG, Rebouche CJ. Carnitine metabolism and inborn errors. *J Inherit Metab Dis*. 1984; 7(1): 38-43. doi:10.1007/BF03047372.
125. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev*. 1983; 63(4): 1420-1480. doi:10.1152/physrev.1983.63.4.1420.
126. Karayaylalı İ, Güvenç B, Tamer L, Gürbüz E, Adam SM, Paydaş S et al. Kronik hemodiyaliz hastalarında l-karnitin ilavesinin lipid profili, Ca²⁺ Mg²⁺ ATPaz, Na⁺ K⁺ ATPaz ve intrasellüler Ca²⁺ üzerine etkisi. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 1997; 22(3): 152-157.
127. Hülsmann WC, Peschechera A, Arrigoni-Martelli E. Carnitine and cardiac interstitium. *Cardioscience*. 1994; 5(2): 67-72.
128. Pepine CJ. The therapeutic potential of carnitine in cardiovascular disorders. *Clin Ther*. 1991; 13(1): 1-2.
129. McGarry JD, Sen A, Esser V, Woeltje KF, Weis B, Foster DW. New insights into the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. *Biochimie*. 1991; 73(1): 77-84. doi:10.1016/0300-9084(91)90078-f.
130. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 3. Cilt 6. 'cı baskı. Ankara. 1993; 11-2505.

131. Zelnik N, Fridkis I, Gruener N. Reduced carnitine and antiepileptic drugs: Cause relationship or co-existence?. *Acta Paediatr.* 1995; 84(1): 93-95. doi:10.1111/j.1651-2227.1995.tb13494.x.
132. Aoshima S, Fujisawa S, Kobayashi A. Changes in the subcellular distribution of free carnitine and its acyl derivatives in diabetic rat hearts following treatment with l-carnitine. *Jpn Heart J.* 1993; 34(6): 763-772. doi:10.1536/ihj.34.763.
133. Nemoto S, Aoki M, Dehua C, Imai Y. Effects of carnitine on cardiac function after cardioplegic ischemia in neonatal rabbit hearts. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71(1): 254-259. doi:10.1016/s0003-4975(00)02023-3.
134. Kanter M, Topcu-Tarlacalisir Y, Parlar S. Antiapoptotic effect of l-carnitine on testicular irradiation in rats. *J Mol Histol.* 2010; 41(2-3): 121-128. doi:10.1007/s10735-010-9267-5.
135. Ribas GS, Biancini GB, Mescka C, Wayhs CY, Sitta A, Wajner M et al. Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: A beneficial effect of l-carnitine supplementation. *Cell Mol Neurobiol.* 2012; 32(1): 77-82. doi:10.1007/s10571-011-9736-8.
136. Izgüt-Uysal VN, Agaç A, Derin N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J Gastroenterol.* 2001; 36(4): 231-236. doi:10.1007/s005350170108.
137. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond).* 2010; 7: 30. doi:10.1186/1743-7075-7-30.
138. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000; 63(7): 1035-1042. doi:10.1021/np9904509.
139. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sci.* 2006; 78(8): 803-811. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.103.
140. Baumgartner M, Blum L. L-carnitine. l-versus or d, occurrence, metabolism, biosynthesis, animal feeding studies, regulations, lonza Ltd. Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002, Basel. 1997; 1-7.
141. Umutlu U. L-karnitin uygulamasının ratlarda bazı lipit parametreleri üzerine etkisi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, (Tez danışmanı: Doç. Dr. Ramazan Çöl) 2012; 12-19.
142. Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydlowska W. Influence of l-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res.* 2001; 51(1): 21-29. doi:10.1016/s0008-6363(01)00313-3.
143. Dhalla NS, Dixon IMC, Shah KR, Ferrari, R. Beneficial effects of l-carnitine and derivatives on heart membranes in experimental diabetes. In: L-carnitine and its role in medicine: From function to therapy; Ferrari R, DiMauro S, Sherwood G, Eds. London, UK, 1992; p. 411-426.
144. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994; 78(6): 915-918. doi:10.1016/0092-8674(94)90266-6.
145. Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem.* 2009; 16(19): 2373-2394. doi:10.2174/092986709788682155.
146. Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Songet MD et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide.* 2010; 23(3): 214-219. doi:10.1016/j.niox.2010.06.005.
147. Clarkson PM. Nutritional ergogenic aids: Carnitine. *Int J Sport Nutr.* 1992; 2(2): 185-190. doi:10.1123/ijns.2.2.185.
148. Önal A, Astarçioğlu H, Örmən M, Atila K, Sarıoğlu S. Sıçandaki renal iskemi-reperfüzyon hasarında l-karnitinin koruyucu etkisi. *Ulusal Travma Dergisi.* 2004; 10(3): 160-167.
149. Salama A, Fayed HM, Elgohary R. L-carnitine alleviated acute lung injuries induced by potassium dichromate in rats: Involvement of Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Heliyon.* 2021;7(6):e07207. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07207.

150. Lee BW, Ha JH, Shin HG, Jeong SH, Jeon DB, Kim JH et al. *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* attenuates oxidative stress and inflammatory responses in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury and TNF- α -stimulated NCI-H292 cells. *antioxidants* (Basel). 2020;9(3):198. doi:10.3390/antiox9030198.
151. Sun Y, Xia Y, Liu X, Liu J, He W, Ye H et al. Dexmedetomidine alleviates LPS-induced acute lung injury via regulation of the p38/HO-1 pathway. *Mol Med Rep.* 2020;22(3):2442-2450. doi:10.3892/mmr.2020.11330.
152. Peltoniemi M, Kaartenaho-Wiik R, Säily M, Sormunen R, Paakkö P, Holmgren A et al. Expression of glutaredoxin is highly cell specific in human lung and is decreased by transforming growth factor-beta in vitro and in interstitial lung diseases in vivo. *Hum Pathol.* 2004;35(8):1000-1007. doi:10.1016/j.humpath.2004.04.009.
153. Liu RM, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(1): 1-15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.026.
154. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in alzheimer's disease brain: Central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med.* 2001;7(12):548-554. doi:10.1016/s1471-4914(01)02173-6.
155. Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Pennisi G, Calafato S, Bellia F et al. Cellular stress response: A novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res.* 2008; 33(12): 2444-2471. doi:10.1007/s11064-008-9775-9.
156. Yurinskaya MM, Mit'kevich VA, Barykin EP, Garbuz DG, Evgenev MB, Makarov AA et al. *Mol biol (Mosk).* 2015; 49(6): 1030-1034. doi:10.7868/S0026898415060233.
157. Dukay B, Csoboz B, Tóth ME. Heat-shock proteins in neuroinflammation. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 920. doi:10.3389/fphar.2019.00920.
158. Surai PF. Antioxidant action of carnitine: Molecular mechanisms and practical applications. *EC Veterinary Science.* 2015: 66-84.
159. Hasan A, Nitsche MA, Rein B, Schneider-Axmann T, Guse B, Gruber O et al. Dysfunctional long-term potentiation-like plasticity in schizophrenia revealed by transcranial direct current stimulation. *Behav Brain Res.* 2011; 224(1): 15-22. doi:10.1016/j.bbr.2011.05.017.
160. Lv C, Ma Q, Han B, Li J, Geng Y, Zhang X et al. Long-term DL-3-n-butylphthalide treatment alleviates cognitive impairment correlate with improving synaptic plasticity in SAMP8 mice. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:200. doi:10.3389/fnagi.2018.00200.
161. Liao D, Lv C, Cao L, Yao D, Wu Y, Long M et al. Curcumin attenuates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors via restoring changes in oxidative stress and the activation of Nrf2 signaling pathway in rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:9268083. doi:10.1155/2020/9268083.
162. Wang SB, Jia JP. Oxymatrine attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35(3): 331-338. doi:10.1038/aps.2013.158.
163. Morid OF, Menze ET, Tadros MG, George MY. L-carnitine modulates cognitive impairment induced by doxorubicin and cyclophosphamide in rats; Insights to oxidative stress, inflammation, synaptic plasticity, liver/brain, and kidney/brain axes. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2023;10.1007/s11481-023-10062-1. doi:10.1007/s11481-023-10062-1.
164. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 2007; 55(5): 453-462. doi:10.1002/glia.20467.
165. Bossù P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D et al. A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- α and IL-18. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 101. doi:10.1186/1742-2094-9-101.

166. Engler-Chiurazzi EB, Russell AE, Povroznik JM, McDonald KO, Porter KN, Wang DS et al. Intermittent systemic exposure to lipopolysaccharide-induced inflammation disrupts hippocampal long-term potentiation and impairs cognition in aging male mice. *Brain Behav Immun*. 2023;108:279-291. doi:10.1016/j.bbi.2022.12.013.
167. Marottoli FM, Katsumata Y, Koster KP, Thomas R, Fardo DW, Tai LM. Peripheral inflammation, Apolipoprotein E4, and Amyloid- β interact to induce cognitive and cerebrovascular dysfunction. *ASN Neuro*. 2017; 9(4): 1759091417719201. doi:10.1177/1759091417719201.
168. Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):180. doi:10.1186/s12974-019-1564-7.
169. Kazak F. Farelerde lipopolisakkarit ile oluşturulan nöroenflamasyonda beyinde gelişen oksidatif stres yangı ve BDNF düzeyi üzerine asetil l-karnitinin etkisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Samsun. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gül Fatma Yarım), 2017; 1-117.
170. Zhu B, Wang ZG, Ding J, Liu N, Wang DM, Ding LC et al. Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus. *Exp Ther Med*. 2014;7(3):750-754. doi:10.3892/etm.2014.1479.
171. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Cyclooxygenase inhibition attenuates endotoxin-induced spatial learning deficits, but not an endotoxin-induced blockade of long-term potentiation. *Brain Res*. 2005; 1038(2): 231-237. doi:10.1016/j.brainres.2005.01.035.
172. Nouri E, Karimi SA, Raoufi S, Zarei M. Protective effects of l-carnitine against valproic acid-induced memory impairment and anxiety-like behavior in adult rat. *Physiol Behav*. 2022;253:113853. doi:10.1016/j.physbeh.2022.113853.
173. Goo MJ, Choi SM, Kim SH, Ahn BO. Protective effects of acetyl-l-carnitine on neurodegenerative changes in chronic cerebral ischemia models and learning-memory impairment in aged rats. *Arch Pharm Res*. 2012; 35(1): 145-154. doi:10.1007/s12272-012-0116-9.
174. Ueno Y, Koike M, Shimada Y, Shimura H, Hira K, Tanaka R et al. L-carnitine enhances axonal plasticity and improves white-matter lesions after chronic hypoperfusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35(3): 382-391. doi:10.1038/jcbfm.2014.210.
175. Fu HQ, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N et al. Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *PLoS One*. 2014; 9(8): e106331. doi:10.1371/journal.pone.0106331.
176. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005; 38(12): 1103-1111. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.
177. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984; 11(1): 47-60. doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4.
178. Doguc DK, Delibas N, Vural H, Altuntas I, Sutcu R, Sonmez Y. Effects of chronic scopolamine administration on spatial working memory and hippocampal receptors related to learning. *Behav Pharmacol*. 2012; 23(8): 762-770. doi:10.1097/FBP.0b013e32835a38af.
179. Brotto LA, Barr AM, Gorzalka BB. Sex differences in forced-swim and open-field test behaviours after chronic administration of melatonin. *Eur J Pharmacol*. 2000; 402(1-2): 87-93. doi:10.1016/s0014-2999(00)00491-x.
180. Mesembe O, Bisong S, Ekong M, Ekeoma A. Neurobehavioural activity in albino Wistar rats in the open field maze following long term tobacco diet ingestion. *The Internet Journal of Neurology*. 2008; 10(2): 345-363.
181. Ceyhan BM, Gultekin F, Doguc DK, Kulac E. Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning and memory in rats. *Food Chem Toxicol*. 2013; 56: 145-148. doi:10.1016/j.fct.2013.02.016.

182. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 2012; 7(6): 1009-1014. doi:10.1038/nprot.2012.044.
183. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research. *Vet Pathol.* 2013; 50(6): 1007-1015. doi:10.1177/0300985813485099.
184. Refaiy A, Muhammad E, ElGanainy EO. Semiquantitative smoothelin expression in detection of muscle invasion in transurethral resection and cystectomy specimens in cases of urinary bladder carcinoma. *Afr J Urol* 17. 2011; 6–10. doi.org/10.1007/s12301-011-0002-6.
185. Skrzypczak-Wiercioch A, Sałat K. Lipopolysaccharide-induced model of neuroinflammation: Mechanisms of action, research application and future directions for its use. *Molecules.* 2022; 27(17): 5481. doi: 10.3390/molecules27175481.
186. Badshah H, Ikram M, Ali W, Ahmad S, Hahm JR, Kim MO. Caffeine may abrogate LPS-induced oxidative stress and neuroinflammation by regulating Nrf2/TLR4 in adult mouse brains. *Biomolecules.* 2019; 9(11): 719. doi: 10.3390/biom9110719.
187. Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005; 25(39): 8843-8853. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2868-05.2005.
188. Jamali-Raeufy N, Alizadeh F, Mehrabi Z, Mehrabi S, Goudarzi M. Acetyl-L-carnitine confers neuroprotection against lipopolysaccharide (LPS) -induced neuroinflammation by targeting TLR4/NFκB, autophagy, inflammation and oxidative stress. *Metab Brain Dis.* 2021; 36(6): 1391-1401. doi: 10.1007/s11011-021-00715-6.
189. Zhu W, Cao FS, Feng J, Chen HW, Wan JR, Lu Q et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to long-term behavioral alterations in mice injected with lipopolysaccharide. *Neuroscience.* 2017; 343: 77-84. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.037.
190. Dominguni D, Michels M, Wessler LB, Streck EL, Barichello T, Dal-Pizzol F. Mitochondrial protective effects caused by the administration of mefenamic acid in sepsis. *J Neuroinflammation.* 2022; 19(1): 268. doi: 10.1186/s12974-022-02616-6.
191. Bian H, Wang G, Huang J, Liang L, Zheng Y, Wei Y et al. Dihydrolipoic acid protects against lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and neuroinflammation via regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling in rat. *J Neuroinflammation.* 2020; 17(1): 166. doi: 10.1186/s12974-020-01836-y.
192. Vizuete AFK, Fróes F, Seady M, Zanotto C, Bobermin LD, Roginski AC et al. Early effects of LPS-induced neuroinflammation on the rat hippocampal glycolytic pathway. *J Neuroinflammation.* 2022; 19(1): 255. doi: 10.1186/s12974-022-02612-w.
193. Zhang Y, Liu L, Liu YZ, Shen XL, Zhang T, Wang W et al. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015; 18(8): pyv006. doi: 10.1093/ijnp/pyv006.
194. Kang JY, Lee JS, Seol IC, Kim YS, Park MS, Yoo HR. Pharmacological effects of gamikmijihwang-tang on the lipopolysaccharide-induced hippocampus oxidation and inflammation via regulation of SIRT6. *Pharmaceuticals.* 2022; 15(3): 293. doi: 10.3390/ph15030293.
195. Aslankoc R, Savran M, Ozmen O, Asci S. Hippocampus and cerebellum damage in sepsis induced by lipopolysaccharide in aged rats - pregabalin can prevent damage. *Biomed Pharmacother.* 2018; 108: 1384-1392. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.162.
196. 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; 42(5): 1913-1924. doi: 10.1007/s10753-019-01053-7.
197. 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.* 2018; 9: 1383. doi: 10.3389/fphar.2018.01383.

198. Dang R, Zhou X, Tang M, Xu P, Gang X, Liu Y et al. Fish oil supplementation attenuates neuroinflammation and alleviates depressive-like behavior in rats submitted to repeated lipopolysaccharide. *Eur J Nutr.* 2018; 57(3): 893-906. doi: 10.1007/s00394-016-1373-z.
199. Tunç S. Beyin nöroinflamasyon modelinde resveratrolün oksidatif ve histopatolojik değişiklikler ile SIRT1 geni ifadesi üzerine etkileri. İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Malatya (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yılmaz Çiğremiş), 2019; 1-55.
200. Khan MS, Muhammad T, Ikram M, Kim MO. Dietary supplementation of the antioxidant curcumin halts systemic LPS-induced neuroinflammation-associated neurodegeneration and memory/synaptic impairment via the JNK/NF- κ B/Akt signaling pathway in adult rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 7860650. doi: 10.1155/2019/7860650.
201. Song JH, Lee JW, Shim B, Lee CY, Choi S, Kang C et al. Glycyrrhizin alleviates neuroinflammation and memory deficit induced by systemic lipopolysaccharide treatment in mice. *Molecules.* 2013; 18(12): 15788-15803. doi: 10.3390/molecules181215788.
202. Arshad HM, Ahmad FU, Lodhi AH. Methanolic extract of aerva javanica leaves prevents LPS-induced depressive like behavior in experimental mice. *Drug Des Devel Ther.* 2022; 16: 4179-4204. doi: 10.2147/DDDT.S383054.
203. Wang W, Lu Y, Xue Z, Li C, Wang C, Zhao X et al. Rapid-acting antidepressant-like effects of acetyl-L-carnitine mediated by PI3K/AKT/BDNF/VGF signaling pathway in mice. *Neuroscience.* 2015; 285: 281-291. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.025.
204. Lee B, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Inhibitory effect of carvacrol on lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2020; 24(1): 27-37. doi: 10.4196/kjpp.2020.24.1.27.

EKLER

Ek 1. Materyal Kullanım İzni

9.03.2023 09:56

Posta -

- Outlook

RE: could you help me. the publication permission

8.03.2023 Çar 03:47

Kime:

Hello. Yes, you can use the figure as long as you cite it or if you modify it you should indicate that.

Best regards

De:

Enviado: martes, 28 de febrero de 2023 9:20

Para:

Asunto: could you help me. the publication permission

Hello my teacher. I'm a medical doctor. My name is . I am working in the research and practice hospital of in turkey. I would like to use it in my specialty thesis in medicine, if you have the permission of your publication (

NLRP3 Inflammasome in Vascular Disease: A Recurrent Villain to Combat Pharmacologically. *Antioxidants*. 2022; 11(2):269. <https://doi.org/10.3390/antiox11020269> p:3 figure 1: NLRP3 inflammasome priming and activation.). Could you help. Thanks.

Ek 2. Materyal Kullanım İzni

01.02.2023 09:57

Posta -

- Outlook

Re: could you help me. the publication permission

28.02.2023 Sal 07:46

Kime:

Hello Sonmez,

Yes, you can.

You should mention that that image was adapted from my thesis.

Good luck for your research.

Thank you.

보낸 사람:

보낸 날짜: 2023년 2월 28일 화요일 오전 3:13

받는 사람:

제목: could you help me. the publication permission

Hello my teacher. I'm a medical doctor. My name is . I am working in the research and practice hospital of in turkey. I would like to use it in my specialty thesis in medicine, if you have the permission of your publication (Lee, S.-M., Role of NLRP3 Inflammasome in Pathogenesis of Pulpal Disease. 2015. p:4 figure 1:NLRP3 inflammasome assembly). Could you help. Thanks.

Ek 3. Etik Kurul Onayı



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
17.02.2022	02	23

SDÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 17.02.2022 tarihinde saat-10:00'da toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;

Karar: 23- Proje Yürütücüsü: Prof. Dr.Duygu KUMBUL DOĞUÇ (Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.) Yürütücülüğünde,

Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Duygu Kumbul Doğuş, Arş.Grv. Dr.Sönmez Şevik, Dr. Öğr. Üyesi Kuyuş Hekimler Öztürk, Arş.Gör. Dr. Meltem Özgöçmen'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı "Nöroinflamasyon modelinde L-karnitin uygulamasının bilişsel işlevler ve NLRP3 yolu, TNF-alfa, IL18 üzerine etkisi" başlıklı SDÜ Bilimsel Araştırma Projesi etik kurulumuzca oybirliği ile UYGUNLUĞUNA karar verilmiştir.

Doç. Dr. Esat GÜLLE Başkan	Prof. Dr. İbrahim Metin ÇIRIŞ Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Münire ÇAKIR ÜYE
Doç. Dr. Onfer ÇELİK ÜYE	Prof. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ ÜYE	Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE
KATILMADI Doç. Dr. Müge ÇINA ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Kefa Alperen ÖZTÜRK ÜYE	Öğ. Gör. İbrahim ONARAN (HÜDAL Sorumlu Veteriner Hekimi) ÜYE
Ortman Müh. Serkan GÖNENÇ SIVİL ÜYE	KATILMADI Vet. Hekim Ayşegül AVŞAR SIVİL ÜYE	