

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ENDOTOKSEMİNİN NEDEN OLDUĞU KAN BEYİN
BARIYERİ HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN
KORUYUCU ETKİSİ**

**Hazırlayan
Kübra Tuğçe KALKAN**

**Danışman
Doç.Dr. Arzu YAY**

Doktora Tezi

**Aralık 2020
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ENDOTOKSEMİNİN NEDEN OLDUĞU KAN BEYİN
BARİYERİ HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN
KORUYUCU ETKİSİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Kübra Tuğçe KALKAN**

**Danışman
Doç. Dr. Arzu YAY**

**İkinci Danışman
Prof.Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU**

**Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 11.2018/25 nolu proje ile desteklenmiştir**

**Aralık 2020
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Kübra Tuğçe KALKAN



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

‘‘Endotokseminin Neden Olduğu Kan Beyin Bariyeri Hasarı Üzerine Melatoninin Koruyucu Etkisi’’adlı Doktora Tezi Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Kübra Tuğçe KALKAN

Danışman

Doç. Dr. Arzu YAY

Histoloji-Embriyoloji AD Başkanı

Prof. Dr. Birkan YAKAN

Doç.Dr. Arzu YAY danışmanlığında **Kübra Tuğçe KALKAN** tarafından hazırlanan “**Endotokseminin Neden Olduğu Kan Beyin Bariyeri Hasarı Üzerine Melatoninin Koruyucu Etkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../.../2020

Jüri

İmza

Danışman : Doç.Dr. Arzu YAY

.....

(Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye :Prof. Dr. Birkan YAKAN

.....

(Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye :Prof. Dr. Erdoğan UNUR

.....

(Anatomi AD)

Üye :Dr. Öğr. Üyesi Halime YILDIZ

.....

(Kırşehir Ahievran Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye :Prof. Dr. Erdoğan UNUR

.....

(Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD)

Onay

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.....tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../.../2020

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim sürecimde her sıkıntıda kapısını çaldığım, sabırla bana yol gösteren, beni bilgilendiren ve en önemlisi akademik kimliğe sahip olmanın ötesinde önce adaletli ve dürüst bir insan olmayı benimseten değerli hocam, doktora tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Arzu YAY'a,

Bu proje için gereken tüm desteği veren Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

İkinci danışmanım Bezmialem Vakıf Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU'na,

Tez sürecimi ilerletirken resmi işlerimi kolaylaştıran hocam, Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Birkan YAKAN'a,

Tezimin yazım aşamasında, bilgilerini benimle paylaşan Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Gözde Özge ÖNDER'e,

Tezimde yer alan Western Blot ile ilgili bölümde desteğini esirgemeyen, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarından sonuna kadar faydalanmamı sağlayan, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Birsan ELİBOL'a, Western Blot yöntemini öğreten arkadaşım Arş. Gör. Şule TERZİOĞLU UŞAK'a,

Tezimde yer alan ELISA methodu için bana yardım eden, vakitlerini ayıran ve bunu mutlulukla yapan arkadaşlarım Arş. Gör. Betül YALÇIN ve Öğretim Görevlisi Özge CENGİZ MAT'a, Öğretim Görevlisi Ayşe Ceyhan'a, istatistiksel analiz aşamasında yol gösteren arkadaşım Arş. Gör. Ayşegül YABACI' ya,

Tezimin deneysel aşamasını planlayabilme konusunda desteğini gördüğüm Doç. Dr. Meltem KUMAŞ'a ve Dr. Öğretim Üyesi Emine Rümeysa HEKİMOĞLU'na,

Yaşamım boyunca duruşunu hep örnek aldığım, benim için maddi manevi her imkanını ortaya koyan, bana sonsuz güven duyan, eğitimimin temellerini atan büyükbabam emekli öğretmen Mustafa COŞKUN'a, canım anneme ve babama,

Lisansüstü eğitimime başladığım andan bu zamana kadar hayatıma dahil olan, sevincimi ve umutsuzluğumu çok derinden hissededen, büyük fedakarlıklar yapan yol arkadaşım, canım eşim Serkan KALKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

ENDOTOKSEMİNİN NEDEN OLDUĞU KAN BEYİN BARIYERİ HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN KORUYUCU ETKİSİ

Kübra Tuğçe KALKAN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
Doktora Tezi, Eylül 2020
Danışman: Doç. Dr. Arzu YAY**

ÖZET

Bu çalışmada endotokseminin neden olduğu kan beyin bariyeri hasarı üzerine melatoninin olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu çalışmada, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden temin edilen 42 adet Spraque-Dawley cinsi erişkin dişi sıçan kullanıldı. Denekler rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n=8), LPS grubu (n=13); (7,5 mg/kg/tek doz lipopolisakkarit/i.p), LPS+melatonin grubu (n=13); (7,5 mg/kg/tek doz lipopolisakkarit/i.p+10mg/kg/gün/i.p melatonin) ve melatonin grubu (n=8); (10mg/kg/gün/i.p. melatonin). Deney sonunda anestezi altında sıçanlar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Doku örnekleri %10'luk formalinde fikse edildikten sonra rutin histolojik doku takip basamaklarından geçirilerek parafin bloklara gömüldü. 5 µm kalınlığında alınan kesitlerde doku morfolojisini değerlendirmek için hematoksiyen-eozin ve krezil viyole boyama metodları uygulandı. Kan beyin bariyerinde ZO-1, okludin ve TLR-4 ifadeleri immünohistokimyasal ve western blot metodları ile değerlendirildi. Ayrıca, dokulardan hazırlanan homojenatlarda SOD, CAT, GSH-Px, TGF-β, TNF-α, IL-1β, NF-κB seviyeleri ELISA metodu ile değerlendirildi. LPS uygulanan grupta sitoplazmik vakuollü ve düzensiz piknotik çekirdeğe sahip olan dejeneratif nöronlar, soluk boyanmış nekrotik nöronlar ve vasküler konjesyon gözlemlendi. Ayrıca bu grupta ZO-1 ve okludin ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azaldığı fakat TLR-4 ekspresyonunun ise arttığı belirlendi. Bu skorları koruyucu amaçla kullanılan melatonin düzeltti. Sonuç itibarıyla melatonin kullanımı ile beyin dokusunda ciddi düzelmeler meydana gelmekte ve koruyucu amaçlı kullanılan melatonin sepsis hasarını inhibe etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Lipopolisakkarit, Melatonin, Beyin, Sıçan

PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN ON BLOOD BRAIN BARRIER DAMAGE CAUSED BY ENDOTOXEMIA

Kübra Tuğçe KALKAN

**Erciyes University, Institute Of Health Sciences
Department of Histology and Embryology
PhD Thesis, September 2020
Supervisor: Asc. Prof. Dr. Arzu YAY**

ABSTRACT

In this study we established to investigate the protective effect of melatonin on blood brain barrier damage caused by endotoxemia. In this study, 42 adult female Sprague-Dawley rats that obtained from Bezmialem Foundation University Experimental and Clinical Research Centre, were used. Rats were separated into four groups randomly. Control group (n=8), LPS group (n=13); 7,5 mg/kg/day (intraperitoneal) lipopolysaccharide was administered to rats, LPS+melatonin group (n=13); 7,5 mg/kg/day lipopolysaccharide + 10mg/kg/day melatonin was administered to rats (intraperitoneal) and melatonin group (n=8); 10 mg/kg/day melatonin (intraperitoneal) was administered to rats. Only one dose of lipopolysaccharide was administered. Melatonin treatment started one week before lipopolysaccharide administration and lasted at the end of the experiment. The rats were decapitated under ketamine anesthesia and the brain tissues were removed. At the end of the experiment, immunohistochemical as well as Western Blot method for ZO-1, occludin and TLR-4 expression in brain tissue and ELISA for SOD, CAT, GSH-Px, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , NF- κ B levels in brain tissue were performed. Degenerate neurons with cytoplasmic vacuoles and irregular pycnotic nuclei, pale stained necrotic neurons and vascular congestion was observed to applied LPS in the group. In the group LPS, ZO-1 and occludin expression were decreased compared to control group, but tissue TLR-4 expression was higher in LPS administered group than control group. These scores were improved by the melatonin for protective purposes. As a result of application of melatonin create a very serious change on brain tissue and the melatonin for protective purposes inhibited sepsis damage.

Key Words: Lipopolysaccharide, Melatonin, Brain, Rat.

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ	3
2.2. BEYİN GELİŞİMİ.....	4
2.3. BEYİN ANATOMİSİ.....	5
2.3.1. Rombensefalon.....	5
2.3.1.1. Serebellum (Beyincik).....	5
2.3.1.2. Medulla Oblangata (Omurilik Soğanı)	6
2.3.1.3. Pons (Köprü).....	6
2.3.2. Mesensefalon.....	6
2.3.3. Trunkus serebri.....	6
2.3.4. Prosensefalon	6
2.3.4.1. Telensefalon.....	6
2.3.4.2. Diensefalon	7
2.4. BEYİN HİSTOLOJİSİ.....	7

2.4.1. Beyin Korteksi.....	7
2.4.1.1. Beyin Korteksinin Nöron Tipleri	7
2.4.1.2. Beyin Korteksinin Sinir Lifleri	9
2.4.2. Beyin medullası.....	11
2.4.3. Meninksler	12
2.4.3.1. Dura mater	12
2.4.3.2. Araknoid mater	13
2.4.3.3. Pia mater	13
2.5. KAN BEYİN BARIYERİ (KBB).....	15
2.5.1. Kan Beyin Bariyerinin Tarihçesi.....	15
2.5.2. Kan Beyin Bariyerinin Gelişimi.....	16
2.5.3. Kan Beyin Bariyerinin Anatomisi ve Fizyolojisi.....	16
2.5.3.1. Endotel Hücreleri	17
2.5.3.2. Bazal membran	18
2.5.3.3. Astrositler ve Perisitler	18
2.5.4. Kan-Beyin Bariyerinin Sıkı Bağlantı Yapıları.....	20
2.5.4.1. Okludin	20
2.5.4.2. Skaffold Proteinleri	21
2.5.5. Kan Beyin Bariyeri Fonksiyonları	21
2.5.5.1. İyon Düzenlenmesi.....	21
2.5.5.2. Nörotransmitter Düzenlenmesi	22
2.5.5.3. Makromoleküller.....	22
2.5.5.4. Nörotoksinler	23
2.5.5.5. Beynin Beslenmesi	23
2.5.6. Kan-Beyin Bariyerinde Madde Taşınımı.....	24
2.6. ENDOTOKSEMİ	25

2.6.1. Sepsis	26
2.6.2. Sepsis Modeli Olarak Lipopolisakkarit	28
2.6.3. Toll Like Reseptörleri (TLR)	29
2.7. MELATONİN	30
2.7.1. Melatonin'in Tanımı ve Tarihçesi	30
2.7.2. Melatonin'in Biyosentezi, Salınımı ve Metabolizması	33
2.7.3. Melatonin'in MSS Üzerine Etkisi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Deneysel Prosedür	37
3.1.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	37
3.1.2. Deneyde Kullanılan Maddeler ve Uygulama	38
3.2. Histopatolojik Analizler	39
3.2.1. Hematoksilen-Eosin (H&E) Boyama Tekniği	40
3.2.2. Masson Trikrom (MT) Boyama Tekniği	41
3.2.3. Kresyl violet (KV) Boyama Metodu	41
3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Metodu	42
3.4. Western Blot Metodu.....	44
3.4.1. Protein İzolasyonu	44
3.4.2. Protein Konsantrasyonlarının Ölçümü	44
3.4.3. Protein Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez	44
3.4.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi	45
3.4.5. Antikor İnkübasyonu ve Membran Proteinlerinin Görüntülenmesi.....	46
3.4.6. Protein Görüntülerinin Analizlenmesi.....	48
3.5. ELISA Metodu	49
3.5.1. MDA, SOD, CAT, GSH-Px Tayini.....	50
3.5.2. TGF- β , TNF- α , IL-1 β , NF- κ B Tayini.....	50

3.6. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	53
4.1. Vücut Ağırlığına Ait Bulgular	53
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	54
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	58
4.3.1. Zonula Okludens Ekspresyonu.....	58
4.3.2. Okludin Ekspresyonu	60
4.3.3. TLR-4 Ekspresyonu.....	61
4.4. Western Blot Bulguları	63
4.4.1. Zonula Okludens western blot sonuçları	63
4.4.2. Okludin western blot sonuçları	64
4.4.3. TLR-4 western blot sonuçları.....	64
4.5. Biyokimyasal Bulgular	65
4.5.1. MDA, SOD, CAT, GSH-Px Bulguları	65
4.5.2. TGF- β , TNF- α , IL-1 β , NF- κ B Bulguları	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	70
6. KAYNAKLAR.....	79

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
ATSDR	: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
TJ	: Tight Junction
OKL	: Okludin
ZO	: Zonula okludens
ZO-1	: Zonula okludens-1
LPS	: Lipopolisakkarit
LBP	: Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
CD	: Cluster of differentiation
SIRS	: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
PAMPs	: Pathogen- associated molecular patterns
TLR	: Toll Like Reseptörü
HE	: Hemotoksilen-Eozin
MT	: Masson-Trikrom
KV	: Kresyl-Violet
DAB	: Diaminobenzidin
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
MDA	: Malondialdehit
PBS	: Fosfat tamponu
dH ₂ O	: Distile Su
SOD	: Süperoksit Dismutaz

CAT : Katalaz

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

TGF- β : Transforme Büyüme Faktör-Beta

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör-Alfa

IL-1 β : İnterlökin 1-beta

NF- κ B : Nüklear Faktör-Kappa Beta



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Beyin Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Genel Özellikleri	18
Tablo 3.1. Deney gruplarının dağılımı	38
Tablo 3.2. Deneysel çalışma takvimi	38
Tablo 3.3. Doku takip metodu	40
Tablo 3.4. Hematoksilen-Eosin (H&E) Boyama Metodu	40
Tablo 3.5. Masson Trikrom Boyama Metodu	41
Tablo 3.6. Kresyl Violet Boyama Metodu	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Beyin veziküllerinin gelişimini gösteren şematik çizim.....	5
Şekil 2.2.	Luxol fast blue ile boyanan beyin korteksinin 6 tabakadan oluştuğu görülüyor.	11
Şekil 2.3.	Beyin zarlarını gösteren şematik çizim.....	14
Şekil 2.4.	KBB Elemanlarının İlişkileri.....	17
Şekil 2.5.	Perisitlerin KBB'nin endotel hücreleri ile ilişkisi görülmektedir	19
Şekil 2.6.	KBB bölgesinde endotel hücrelerinin temas bölgelerindeki TJ yapılarının görünümü	21
Şekil 2.7.	KBB'nden geçerek beyne maddelerin taşınım yolları gösterilmiştir.	24
Şekil 2.8.	Gram negatif bakterinin hücre duvarında LPS'in konumu gösterilmiştir.....	26
Şekil 2.9.	Gram negatif bakterisinin hücre duvarında LPS ve TLR-4 ilişkisi görülmektedir.	30
Şekil 2.10.	Melatonin'in sirkadyen ritmi düzenlemedeki rolü gösterilmiştir	32
Şekil 2.11.	Melatonin hormonunun biyosentezi gösterilmiştir	34
Şekil 3.1.	Beyin kesitlerine ait preparatların immünohistokimyasal boyama esnasında nem kamerası içerisindeki görünümü.	43
Şekil 3.2.	A. Özel uçlu mikropipetlerle kuyucuklara protein yüklemesi B. Yükleminin tamamlanmasıyla belirlenen voltajda yürütme işleminin gerçekleşmesi.	45
Şekil 3.3.	Proteinlerin jelden membrana transfer aşaması.....	46
Şekil 3.4.	Membran proteinlerinin görüntülenmesinde kullanılan görüntüleme kabini ve görüntüleme sistemi.	47
Şekil 3.5.	Western Blot Image J Analizleme yöntemine göre bant yoğunluğunun ölçülmesindeki ilk basamak.	48
Şekil 3.6.	Western Blot Image J Analizleme yöntemine göre bant yoğunluğunun alansal hesabının değerlendirilmesi.	49
Şekil 3.7.	Mikroplate okuyucu ile ölçüm aşamasında bulunan 96'lık plaka.	51
Şekil 4.1.	Çalışma öncesi ve sonrasında tüm gruplara ait sıçanların vücut ağırlıklarının karşılaştırması.	54

Şekil 4.2.	Tüm deney gruplarına ait sıçan beyin korteksinden alınmış ışık mikroskopik görüntüler. Vasküler konjesyon (siyah ok) (H&E, X40).	55
Şekil 4.3.	MT boyama metodu uygulanmış deney gruplarında beyin korteksine ait ışık mikroskopik görüntüler.	56
Şekil 4.4.	KV boyama metodu uygulanmış deney gruplarında beyin korteksine ait ışık mikroskopik görüntüler.	57
Şekil 4.5.	KV boyama sonucu beyin korteks alanında belirlenmiş dejeneratif nöronların istatistiksel analizi.....	58
Şekil 4.6.	Deney gruplarına ait beyin korteksi kan damarları endotel hücrelerinde (siyah ok) ZO-1 ifadesi immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (X40).	59
Şekil 4.7.	Deney gruplarına ait ZO-1 immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi.	59
Şekil 4.8.	Deney gruplarına ait beyin korteksi kan damarları endotel hücrelerinde (siyah ok) okludin ifadesi immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (X40).	60
Şekil 4.9.	Deney gruplarına ait okludin immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi.	61
Şekil 4.10.	Deney gruplarına ait beyin korteksinde inflamasyon belirteci TLR-4 ifadesi (siyah ok) immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (X40).	62
Şekil 4.11.	Deney gruplarına ait TLR-4 immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi.	62
Şekil 4.12.	A. Deney gruplarına ait ZO-1 protein miktarının istatistiksel analizi.	63
Şekil 4.13.	A. Deney gruplarına ait okludin protein miktarının istatistiksel analizi.	64
Şekil 4.14.	A. Deney gruplarına ait TLR-4 protein miktarının istatistiksel analizi.	65
Şekil 4.15.	Deney gruplarına ait MDA, SOD, CAT, GSH-Px ELISA bulgularının istatistiksel analizi.	67
Şekil 4.16.	Deney gruplarına ait IL-1 β , NF- κ B, TGF- β , TNF- α , ELISA bulgularının istatistiksel analizi.	69

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endotoksemi, kanda endotoksinlerin varlığını ifade eder (Smith, 1996). Gram negatif bakterilerin hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasında konumlanan endotoksin sepsisi tetikleyen asıl moleküldür (Fısgın, 2004). Sepsis dünya çapında önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir (Salomão ve ark., 2019). Konakçı-mikroorganizma etkileşimini insan patofizyolojisi ile ilişkilendirmenin sonucunda sepsis ve septik şoka dair yapılan tüm tanımlar netlik kazanmaktadır. Sepsis 2016 yılında literatüre ‘insan hayatını tehdit eden organ fonksiyon bozukluğu’ şeklinde geçmiştir (Singer ve ark., 2016). Endotokseminin makrofajları uyarması çeşitli sitokinlerin salınımını tetikler (Gürkan ve Çobanlı, 1999). Makrofaj yüzeyindeki toll-like reseptörlerinin bakteriyel, viral ve fungal molekülleri tanımasını takiben sitokin yapımı ve inflamatuvar yanıt uyarılır (Varadaradjalou ve ark., 2003). Sepsis, hücre hipoksisi ve apoptozundan da sorumludur. Endotel disfonksiyonuna, kardiyovasküler hasara, intrasellüler homeostazda bozulmaya neden olur. Mikroorganizma ve ürünlerinin direkt veya sitokinlerin indirekt etkisi ile endotel hücreleri büyük oranda değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerle adezyon moleküllerinin etkinliği artar, böylece vazoaaktif maddeler ve inflamatuvar mediyatörler salınır. Yüksek oranda aktive olan endotel bir süre sonra kendine zarar verir hale gelir, mikrosirkülasyon bozulur, kapiller geçirgenlik artar (Öz, 2006). Sepsis kaskadının harekete geçmesiyle oluşan serbest radikaller ve proteazların sinir sistemi üzerinde de etkisi büyüktür. Enfeksiyon etkenine karşı gelişen immünolojik yanıt, tüm organ ve sistemlere zarar vermesinin yanında, sinir sistemi bariyerlerinden biri olan kan beyin bariyerinin (KBB) fonksiyonunu da bozar. Bu hayati bariyerin hasarı çeşitli nörolojik hastalıkların patogeneğinde etkin rol oynar. Bu süreçte ortaya çıkan nöroinflamasyon, Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları ve multiple skleroz başta olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıkların gelişimini tetikler (Allison ve Ditor, 2014; Nguyen ve ark., 2002).

Pineal bez tarafından özellikle karanlıkta salgılanan bir indolamin olan melatonin, sirkadiyen ritim düzenleyici olmasının yanı sıra antioksidan, antiinflamatuvar ve immünoregülatör etkilere sahiptir (Kuş ve Sarsilmaz, 2002). Lipofilik yapısı sayesinde melatonin hücrelere rahatça girebilmektedir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerini göstermesine katkı sağlar. Bazı çalışmalar melatoninin hücre nükleuslarında yüksek konsantrasyonda bulunduğunu göstermektedir (Reppart ve ark., 1996). Güçlü bir serbest radikal süpürücüsü olan melatonin, çeşitli antioksidan enzimlerin gen regülasyonunu da sağlayarak bu enzimlerin üretimlerini indükler (Rodriguez ve ark., 2004; Omurtag ve ark., 2008). Fizyolojik dozlarda bile etkinliği kanıtlanmış, güçlü bir antiinflamatuvar olan bu molekülün çeşitli patolojik durumlarda iyileştirici etkisi gösterilmiştir. Ayrıca yaşlı hayvanlarda yapılan çalışmalarda nörojenezi artırdığı saptanmıştır (Dubocovich, 1995). Sepsis modeli başta olmak üzere birçok inflamasyon modelinde nötrofil aktivasyonunun dokularda oluşturduğu oksidatif hasarı anlamlı olarak geri çevirir (Şener ve ark., 2005; Kaçmaz ve ark., 2005). Güçlü bir serbest radikal süpürücü olan melatonin konsantrasyonu yaşlandıkça azalma eğilimindedir (Manchester ve ark., 2015). Beyin dokusunun oksidatif hasara oldukça duyarlı olması, yaşlanma ile birlikte gelişen oksidatif hasar ve inflamasyon, melatonin tedavisinin yaşa bağlı merkezi sinir sistemi fonksiyonlarındaki değişime karşı koruyucu olabileceğini düşündürür. Tüm bunlar göz önüne alındığında orta yaşlardan itibaren melatonin desteğinin nöronal kayıp hızını azaltması kuvvetle muhtemeldir. Bilinen önemli bir yan etkisinin olmaması, beyin dokusuna hızlı ve etkili şekilde geçmesi nedeniyle özellikle seviyesinin azalmaya başladığı orta yaşlardan itibaren kullanılmasını, sinir sistemi fonksiyonlarının iyileştirilmesi açısından yararlı görünmektedir.

Bu çalışmada, sıçanlarda endotokseminin yol açtığı KBB değişikliklerini inceleyerek, bu değişiklikler üzerine farmakolojik dozda verilen melatoninin olası koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda melatoninin bu süreçteki etkinliği ve etkinlik derecesi araştırılacak, ayrıca bu etkinin KBB'nin hangi molekülleri üzerinden gerçekleştirdiği ile ilgili bilgiler elde edilecektir.

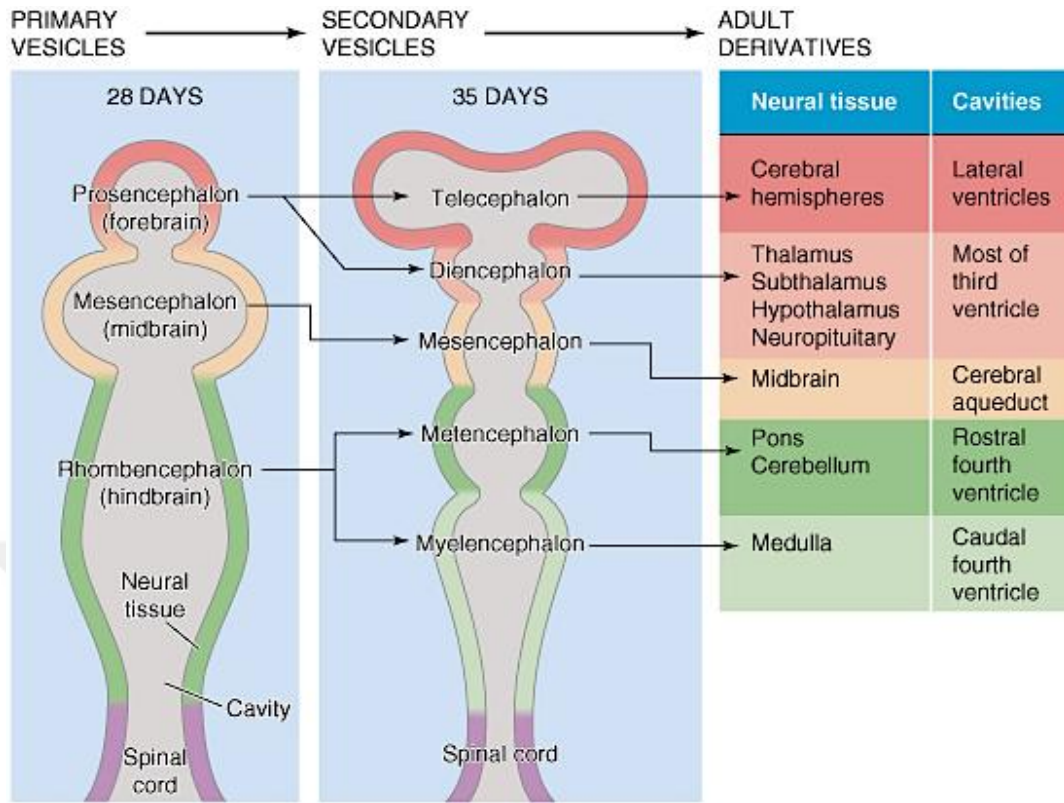
2.GENEL BİLGİLER

2.1. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ

Sinir sistemi, vücudun iç ve dış ortamda oluşan değişikliklere karşı en uygun cevabı vermesini sağlayan sistemdir. Sinir sistemi, anatomik olarak merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki kısımda incelenir. Çevreden gelen verilerin analiz edilip yorumlandığı ve bilişsel fonksiyonların yerine getirildiği bölgeler (tüm beyin yani ensefalon ve omurilik yani medulla spinalis) MSS'ni oluşturmaktadır. Vücudun çeşitli yerlerinden alınan uyarıları taşıyan periferik sinirler, gangliyonlar ve serbest sinir sonlanmaları ise PSS olarak tanımlanır. MSS'nin en önemli elemanı olan, kranial kavite içerisinde yer alan beyin, dışta yer alan korteks yani gri cevher ile içte yer alan medulla ya da beyaz cevherden oluşur. Vertebral kanal içerisinde bulunan medulla spinalis ise dışta yer alan beyaz cevher ve içte yer alan korteksten oluşur. Beyin ve medulla spinalis nöroglia olarak isimlendirilen özelleşmiş hücreler tarafından desteklenen nöronlardan oluşur. Farklı şekil ve büyüklükte olabilen nöronların 'perikaryon' olarak adlandırılan bir hücre gövdesi ile 'dendrit' ve 'akson' olarak adlandırılan iki tip uzantısı vardır. Perikaryon uyarı alıp, uyarıya uygun cevaplar hazırlayan merkezi kısımdır. Nöron gövdeleri sadece gri cevherde bulunur. Beyaz cevher ise nöroglia hücreleri ile sarıllı sinir liflerinden oluşur. Bu karmaşık sistemdeki her nöron bir diğeri ile en az bin bağlantıya sahip olup bir iletişim ağı halinde dağılmıştır (Taner, 2005). Beyin vücut ve zihin fonksiyonlarının çoğunu düzenleyerek düşünebilme ve hafıza gibi işlevlerin yanısıra çevredeki uyarıları alma ve bunları değerlendirme, motor aktiviteyi sağlama, endokrin ve somatik fonksiyonlar ile organların düzenli çalışmasını kontrol etmek gibi birden fazla göreve sahiptir (Arıncı, 2001).

2.2. BEYİN GELİŞİMİ

MSS ektodermal kaynaklı olup, ‘nöral plak’ adı verilen ektodermal bir kalınlaşmadan gelişir (Sadler, 2005). Bu plaktan nöral katlantılar, nöral tüp ve nöral krista oluşur. Nöral tüp MSS’ni meydana getirir. Nöral krista ise PSS ve otonom sinir sistemi’nin büyük kısmını yapan hücreleri şekillendirir (Moore ve Persaud, 1998). Nörulasyon olarak bilinen bir süreç yani nöral plak ve nöral tüp oluşumu 4. haftanın başında, 22-23. günlerde başlar. Nöral plağın lateral bölümleri 3. haftanın sonunda yukarıya doğru yükselerek nöral katlantıları meydana getirir. Gelişimin daha ileri aşamalarında, nöral katlantılar yükselirler, orta hatta birbirine yaklaşırlar ve sonuçta nöral tüpü oluşturmak üzere kaynaşırlar. Kaynaşma servikal bölgede başlar, kaudal ve sefalik yönlerde doğru ilerler. Embriyonun, kaudal ve kranial uçlarında kaynaşma daha geç meydana geldiğinden, amnion boşluğuyla nöral tüp arasında geçici bir ilişki kurulur. Kranial nöroporların kapanması, biri servikal bölgeden başlayan ilk kapanma noktasından başlayarak, diğeri de ön beyinden kranial ve kaudal yönlerde olmak üzere iki yönlüdür. Kranial nöropor 25. günde, kaudal nöropor ise 27. günde kapanır (Sadler, 2005). Bu deliklerin kapanması ile nöral tüpteki damar ağının gelişiminin tamamlanması eş zamanlıdır. Nöral tüp duvarları beyin ve omuriliği meydana getirmek için kalınlaşırken; nöral kanal beynin ventriküler sistemini ve omuriliğin santral kanalını şekillendirir. 4. somit çiftinin kranialinde kalan, daha geniş olan nöral tüp bölümü beyni oluşturur. Erken dönemdeki ilk boğumlanma ile üç ilkel beyin vezikülü ortaya çıkar. Bunlar prosensefalon (ön beyin vezikülü), mesensefalon (orta beyin vezikülü) ve rombensefalon’dur (arka beyin vezikülü) (Moore ve Persaud, 2018). Gelişimin 5. haftasında prosensefalon tam olmayan iki sekonder veziküle farklılaşır. Bunlar bir orta bölge ve iki lateral çıkıntıdan yani ilkel beyin hemisferlerinden oluşan telensefalon ile optik veziküllerin dışarıya doğru büyümesi ile özelleşen diensefalon’dur. Diensefalon’dan ilerleyen dönemlerde talamus, hipotalamus, epifiz, hipofiz ve retina gelişir. Mesensefalon’da bir bölünme gerçekleşmez. Rombensefalon ise iki veziküle ayrılır. Rombensefalonun kranial kısmı metensefalonu (serebellum ve pons), kaudal kısmı myelensefalonu (medulla oblongata) oluşturur. Gelişimin 5. haftasında bu oluşumlarla paralellik gösteren bir başka olay ise beyin korteksi katmanlarının şekillenmesidir (Moore ve Persaud, 2018).



Şekil 2.1. Beyin veziküllerinin gelişimini gösteren şematik çizim
(<http://ftp.columbia.edu/itc/hs/medical/humandev/2004/Chapt4-Ectoderm.pdf>)

2.3. BEYİN ANATOMİSİ

Toplam vücut ağırlığının %2'sini oluşturan insan beyni erişkinlerde 1400-1500 gr ağırlığındadır. Anatomik olarak üç ana bölümden oluşan beyin, omurilikten yukarıya doğru rombensefalon, mesensefalon ve prosensefalon şeklinde sıralanmaktadır.

2.3.1. Rombensefalon

Arka beyin olarak bilinen rombensefalon; serebellum (beyincik), medulla oblongata ve pons'dan meydana gelir.

2.3.1.1. Serebellum (Beyincik)

Rombensefalon'un metensefalon kısmından gelişen beyincik temel beyin ağırlığının %10'u kadardır. Tüm beyin nöronlarının yarısından fazlasını içerir (Taner ve ark., 2007). Hemisferium cerebelli denilen iki yan lobla bunları ortada birleştiren vermis cerebelli'den oluşur. Beyincik işlevsel olarak kasların çalışma derecesini düzenleyerek aktif hareketin dengeli olmasını sağlar (Arıncı, 2001).

2.3.1.2. Medulla Oblongata (Omurilik Soğanı)

Beyin sapının en alt kısmında yer alır. Medulla spinalis, pons ve serebellum arasında yerleşen koni şekilli bölgedir (Taner, 2005).

2.3.1.3. Pons (Köprü)

Serebellumun ön tarafında mesensefalon ile medulla oblongata arasında yer alan 2,5 cm uzunluğunda bir köprüdür. Ponsun arka yüzü medulla oblongata ile kesintisiz bir şekilde devam eder, ön ve yan yüzde sulcus bulbopontinus ile medulla oblongata'dan ayrılır (Arıncı, 2001).

2.3.2. Mesensefalon

Beynin en küçük parçası olan mesensefalon orta beyin vezikülünden oluşur. Bu parça gelişen beyin diğer bölümlerine göre az değişikliğe uğramış olup morfolojik anlamda beyin veziküllerinin en ilkelidir. Yaklaşık olarak 2 cm olup pons ile diensefalon arasında yer alır. Mesensefalon'un ortasından 3. ve 4. ventrikülleri birbirine bağlayan aqueductus cerebri geçer. Bu alan çok sayıda nükleus ile inen ve çıkan sinir lifi demetlerini içerir (Snell, 2011; Taner, 2005).

2.3.3. Trunkus serebri

Medulla oblongata, pons ve mesensefalon'a birlikte verilen ortak isimdir. Prosensefalon'un tabanından aşağıya doğru uzanan bu yapı beyin sapı olarak isimlendirilir. Birinci ve ikinci kranial sinirlerin dışında, tüm kafa çiftleri beyin sapına bağlanır (Dere, 2000).

2.3.4. Prosensefalon

Ön beyin kesesinden gelişen prosensefalon; telensefalon (beyin hemisferleri) ve diensefalon (ara beyin) olarak iki bölüme ayrılır.

2.3.4.1. Telensefalon

Beynin en geniş kısmı olup iki hemisferden oluşur. Serebral hemisferler fissura longitudinalis cerebri ile birbirinden, fissura transversa cerebri ile de beyincikten ayrılır. Korpus kallosum iki hemisferi birbirine bağlar (Gökmen, 2003). Hemisferlerin her birinin içinde beyin-omurilik sıvısı ile dolu olan ventriculus lateralis yer alır. Fonksiyonel bir kitle olan beyin dokusu esasen nöron gövdelerinden, uzantılarından, destek hücrelerinden ve kan damarlarından oluşan bir duvara benzer. Bu duvarın dış

bölümü ‘beyin korteksi’ adını alır. Nöron gövdeleri bu alanda yerleşir. Korteks yüzeyinde ‘girus’ denilen çıkıntılı kıvrımlar ve bu çıkıntıların arasında ‘sulkus’ denilen yarıklar vardır. Sulkusların bazıları daha büyük ve derin olup hemisferlerin loblara ayrılmasını sağlar. Bu loblar lobus frontalis, lobus parietalis, lobus temporalis, lobus occipitalis ve lobus insularis’tir. Bu loblara ilaveten anatomik olarak ayrı bir lob olmayan fakat limbik sisteme ait kortikal yapılar içerdiğinden dolayı ayrı bir lob olarak sınıflandırılan limbik lob bulunur. Hemisferlerin duvarının iç kısmında beyaz beyin dokusunda nöronların oluşturduğu kitleler yani bazal çekirdekler yer alır. Bu çekirdekler ‘‘motor çekirdek’’ olarak işlev görürler (Yıldırım, 2016).

2.3.4.2.Diensefalon

Beyin sapı ile hemisferler arasında yer alan beyin bölümüdür. Sağ ve sol yarımları arasında 3. ventrikül (ventrikulus tertius) yer alır. Üçüncü ventrikül foramen interventrikülare aracılığı ile sağ ve sol lateral ventriküllerle aqueductus serebri ile 4. ventrikülle ilişkilidir (Snell, 2011). Diensefalon’da epitalamus, metatalamus, hipotalamus, talamus ve subthalamus olmak üzere beş alt bölüm içerir (Dere, 2000).

2.4. BEYİN HİSTOLOJİSİ

Histolojik örneklerde MSS organlarının, histolojik özellikleri farklı iki bölümden oluştuğu görülür. Bu farklılıkta hücresel bileşenlerdeki farklılığın yanı sıra miyelinizasyon derecesindeki farklılığın da rolü vardır. Beyaz maddenin ana içeriğini miyelinli aksonlar ve miyelini oluşturan oligodendrositler meydana getirmektedir. Bu alanda nöron perikaryonlarına rastlanmaz. Gri maddede ise nöron perikaryonu, dendritler ve aksonlar, gliya hücrelerinin başlangıç bölümleri yer almaktadır. Bu bölge sinapsların oluştuğu alandır (Carneiro, 2006). Beyin ve beyincikte gri madde yani korteks yüzeye yakın periferik bölümde, beyaz madde ise daha derinlerde, merkezde bulunur. Medulla spinalis’de durum farklıdır. Beyaz madde periferde yer alırken gri madde ise H harfini andıracak şekilde merkezde yerleşir (Ross, 2014).

2.4.1.Beyin Korteksi

2.4.1.1.Beyin Korteksinin Nöron Tipleri

Nöronlar sinir sisteminin temel birimleridir. Uyarıları almak, iletmek, bilgi depolamak, belirli hücre aktivitelerini başlatmak ve ayrıca nörotransmitterleri salgılamak gibi pek çok önemli görevi yerine getirirler (Yıldırım, 2016). Çapları 5-150 µm arasında

değişkenlik gösterir. Şekilleri birbirinden farklı olabilir (Carneiro, 2006). Nöronlar perikaryon, dendrit ve akson olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır. ‘Perikaryon’ ifadesi Yunanca’da çevre anlamına gelen ‘peri’; kelimesi ile çekirdek anlamına gelen ‘karyon’ kelimesinin birleşmesinden oluşur. Perikaryon veya hücre gövdesi, çekirdek ve onu çevreleyen sitoplazmadan meydana gelir. Oval, yuvarlak şekilli çekirdek genellikle perikaryonun ortasında yer alır. Ökromatik özellikteki nükleus, hücrenin yüksek metabolik aktivitesini temsil eder. Nöronların nükleolusları da oldukça belirgindir. Transmisyon elektron mikroskopik düzeyde incelendiğinde perinükleer sitoplazmada yaygın granüler endoplazmik retikulum (GER) ve serbest ribozomların bulunduğu belirlenmiştir. Işık mikroskopik olarak bu içerik bazik boyalarla koyu renkte, tiyoin boyası ile metakromatik olarak boyanan Nissl cisimciklerini oluşturur. Perinükleer sitoplazma ayrıca çok sayıda mitokondrion, belirgin Golgi kompleksi, lizozom, mikrotübüller, nörofilamentler, veziküller ve inklüzyonlar içerir (Ross, 2014). Nöronların aksonu tek bir uzantı olup sinir uyarılarını perikaryondan alarak diğer hücrelere iletir. Perikaryondan ‘akson tepesi’ denen bir bölgeden çıkarlar. MSS ve PSS’de bazı nöroglia hücreleri yani destek hücreleri belirli aksonların çevresinde miyelin kılıf oluştururlar, bazı aksonlarda ise miyelin kılıf bulunmaz. Sinir uyarıları miyelinli aksonlarda miyelinsizlere göre daha hızlıdır. Miyelinli aksone sahip olan nöronlarda akson tepesinin apeksinden miyelinleşmenin başladığı bölgeye kadar olan alan ‘inisiyal segment’ ismini alır. Bu bölge nörona gelen aktive edici ve engelleyici içerikli uyarıların toplandığı, bir sinir uyarıtısı üretilip, üretilmemesi konusunda kararların alındığı yerdir (Yıldırım, 2016). İnisiyal segmentte ve bunu izleyen akson sitoplazmasında GER ve ribozom bulunmaz. Aksine bol mikrotübül ve nörofilamanlar izlenir. Bu yapıların akson çapını denetleme görevini üstlendikleri düşünülmektedir. Aksonda görev yapan bütün protein molekülleri perikaryonda sentez edilirler. Bu moleküller aksone ve dendritlere aksonal transport sistemi ile iletilirler. Aksonun dallanan terminal ucuna ‘telodendron’ adı verilir. Bu kısımdaki her bir dal ‘sinaptik sonlanma’ olarak isimlendirilen düğme benzeri genişlemiş uçlara sahiptir (Gartner, 2006). Sinaptik düğmeler diğer nöronlarla ve nöron dışı hücrelerle etkileşerek sinapsı meydana getirirler. Sinapslar iletilecek bilgiyi bu zincirdeki son hücreye aktarırlar (Yıldırım, 2016).

Uyarıyı çevreden alan dendritler, perikaryondan çıkan çok sayıdaki ağaç dallarına benzer uzantılardır. ‘Dendrit diken’ ismi verilen çok sayıdaki küçük çıkıntılar diğer

aksonlarla sinaptik bağlantıyı kurar (Yıldırım, 2016; Gartner, 2006). Dendritler aksonlara oranla daha geniş çapa sahiptirler. ‘Dendroplazma’ ismini alan sitoplazmalarında Nissl cisimcikleri, mitokondriyonlar, nörofibriller ve nörotübüller yer alır, ancak Golgi kompleksi genellikle bulunmaz (Gartner, 2006; Ross, 2014). Sinir dokusunda esas işlev gören nöronların arasını doldurup onlara mekanik ve metabolik destek sağlayan dokuya ‘nöroglia dokusu’, bu dokuyu oluşturan hücrelere ‘gliya hücreleri’ veya ‘nöroglia hücreleri’ denir. Nöroglia hücreleri rutin boyamalarda tam anlamıyla ayırt edilemezler, sadece nükleusları belirgindir. Sitoplazmik uzantılarını görüntülemek için özel gümüşleme veya altın impregnasyon teknikleri kullanılır (Yıldırım, 2016). MSS’de nöronların arasında yerleşen gliya hücre sayısının nöronlardan 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bunlar küçük hücreler olduğundan dolayı sinir dokunun hemen hemen yarısını oluşturdıkları düşünülmektedir. Nöronların aksine bu hücrelerde mitoz yeteneği gelişmiştir (Carneiro, 2006). PSS’de ki destek hücrelerine ‘periferik nöroglia’, MSS’de ki destek hücrelerine ‘merkezi nöroglia’ adı verilir. Astrositler, oligodendrositler, mikrogliya hücreleri ve ependim hücreleri olmak üzere 4 tip merkezi nöroglia hücresi vardır (Ross, 2014).

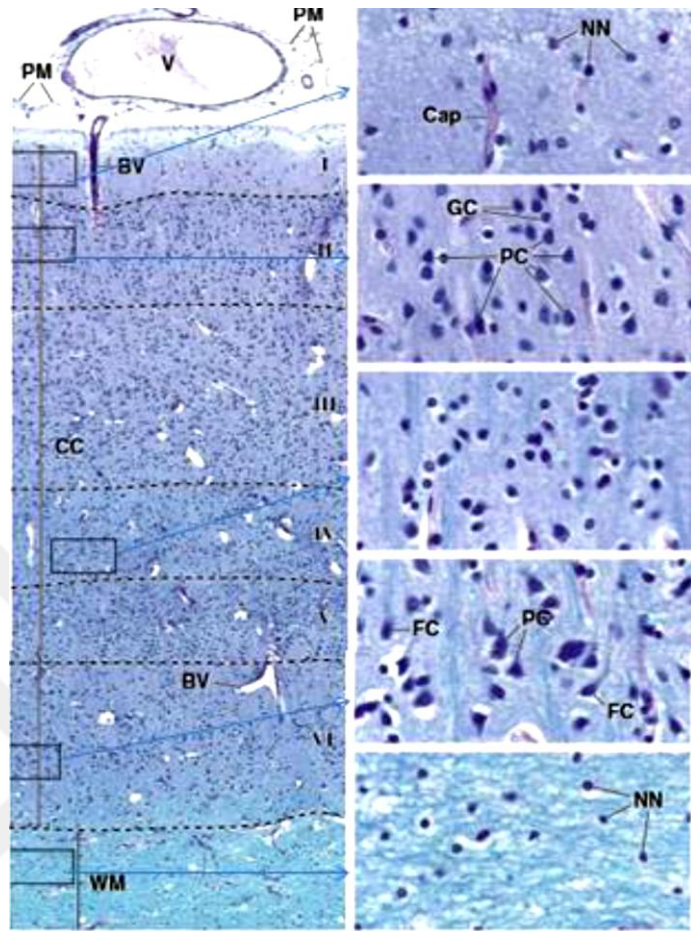
2.4.1.2.Beyin Korteksinin Sinir Lifleri

Kortekste sinir liflerinin düzenlenişi iki şekilde gerçekleşir.

- Işınsal (radial) lifler: Piramidal, stellat, fuziform nöronların korteksten ayrılan aksonlarını içeren ve kortikal yüzeye dik açı yaparak uzanan liflerdir.
- Tanjensiyal (horizontal) lifler: Horizontal, stellat hücrelerin aksonlarını, piramidal ve fuziform hücrelerin kolleteral dallarını içerirler. Bu lifler genel olarak beyin korteksinde yoğunlukla 4. ve 5. tabakalara yerleşirler. Tabakalar ‘Baillarger’in iç ve dış tabakaları’ ismini alır (Snell, 2011). Beyin korteksinde hücrelerin çoğu laminalar şeklinde düzenlenir. Bu şekilde tabakalara ayırmada hücresel yapı düzeni “sitoarkitektür” olarak isimlendirilirken, nöron uzantılarının düzenlenimi ise “mieloarkitektür” olarak tanımlanır. Korteksin mieloarkitektürü ve sitoarkitektürü karşılıklı incelendiğinde farklı morfolojik özelliklere sahip hücrelerden oluşan altı tabakaya ayrıldığı bilinir (Ross, 2014; Gartner, 2006).

Tabakalar dıştan içe doğru aşağıdaki gibidir:

- 1) Lamina molekularis (Lamina zonalis): Korteksin en yüzeyel katmanıdır. Bu tabaka yoğun bir sinir lifi ağı içerir. Lifler tanjensiyel olarak yerleşim gösterirler. Bu liflerin kaynağı piramidal ve fuziform hücrelerin apikal dendritleri, Martinotti ve stellat hücrelerinin aksonlarıdır. Bu tabakanın sinir liflerinin arasına nadiren Cajal'in yassı horizontal nöronları yerleşir. Moleküler tabaka farklı nöronların çok sayıda sinaps yaptığı tabakadır.
- 2) Lamina granularis eksterna: Bu tabaka çok sayıda küçük piramidal nöron ve stellat nöron içerir. Bu hücrelerin dendritleri moleküler tabakada sonlanır. Aksonları daha derin tabakalara ilerleyerek beyaz cevhere girerler. Bu tabaka daha çok granüler nöronlarla işgal edilmiş olup, miyeloarkitektür yönünden fibrilsiz bir yapıya sahiptir. Bu nedenle 'lamina disfibroza' olarak da isimlendirilir.
- 3) Lamina piramidalis eksterna: Bu tabaka'da hücre gövdesinin büyüklüğü yüzeyden derine doğru kademeli bir şekilde artan piramidal hücreler yer alır. Apikalde yer alan dendritleri en yüzeyel moleküler tabakaya ilerler. Aksonları ise beyaz cevhere doğru iner.
- 4) Lamina granularis interna: Bu tabaka sıkı bir şekilde bir araya gelmiş stellat nöronlar ve nadiren küçük piramidal nöronları bulundurur. Hücreler yoğun yerleşimlidir. Horizontal seyirli fibrillerin yoğunlaşmasıyla 'Bailinger'in dış bandı' olarak bilinen fibriller alan ortaya çıkmaktadır.
- 5) Lamina piramidalis interna: Bu tabaka ganglionik tabaka olarak da bilinir. Çok büyük (Betz'in dev hücreleri) ve orta büyüklükte piramidal hücreleri barındırır. Piramidal hücrelerin arasına Martinotti hücreleri ve stellat hücreler dağılmıştır. Çok sayıda horizontal yönde uzanan lifler Baillarger'in iç bandını meydana getirirler.
- 6) Lamina multiformis: Polimorfik hücre tabakası ismini de alan bu tabaka çeşitli nöron tipleri ve uzantılarından oluşur. Hücrelerin çoğunluğu fuziform şeklinde hücre gövdesine sahiptir. Üçgen ve oval şekle sahip perikaryonlara da rastlanabilir. Bu tabakada Martinotti hücreleri göze çarpar. Beyaz cevhere girip çıkan çok sayıda sinir lifi içerir (Snell, 2011; Gartner, 2006).



Şekil 2.2. Luxol fast blue ile boyanan beyin korteksinin 6 tabakadan oluştuğu görülüyor. Sırasıyla; PM: pia mater, V: ven, BV: kan damarları, CC: Cortex cerebri, WM: substantia alba, NN: nöroglial hücreler, GC:granül hücreler, PC:piramidal hücreler, FC: fusiform hücreler (Ross, 2014).

2.4.2.Beyin medullası

Gri maddenin altında yer alan beyaz madde her yöne dağılmış miyelinli sinir lifi demetleri ve nöroglia hücrelerinin oluşturduğu bir alandır. Bu bölgede yer alan miyelinli sinir lifleri fonksiyonel açıdan üç gruba ayrılırlar.

- Bağlayıcı lifler (assosiyasyon lifleri): Aynı hemisfere ait korteksin değişik bölgelerini birbirine bağlayan liflerdir. İki grupta incelenirler. Komşu girusları birbirine bağlayan lifler, kısa bağlayıcı lifler, aynı hemisfer üzerindeki farklı lobları birbirine bağlayan lifler, uzun bağlayıcı liflerdir.
- Komissural lifler: Bir hemisfere ait korteks bölgelerini karşı hemisferin korteks bölgelerine bağlayan liflerdir.

- Projeksiyon lifleri: Korteksi daha derindeki merkezi alanlara bağlayan liflerdir. Bu liflerin de iki tipi mevcuttur. Kortikofugal lifler, beyaz maddeden çıkarak bazal nükleusda, beyin kökünde ve omurilikte sonlanırlar. Kortikopedal lifler ise talamustan köken alan ve beyin korteksinde sonlanan liflerdir (Duvernoy, 2005).

2.4.3.Meninksler

MSS kranial boşluk içerisine yerleşmiş olan beyin, beyincik ve vertebral kanal içerisinde uzanan medulla spinalisten meydana gelir. MSS organları gerçek anlamda bir bağ dokusu içermeyen, yumuşak, pelte kıvamında organlardır. Bu nedenle kafatası ve vertebralar tarafından korumaya alınmıştır. Böyle bir korumaya ek olarak bu hayati organlar üç katmanlı bağ dokusu membranı olan meninksler ile sarılmıştır. Koruyucu membran sistemi dıştan içe doğru dura mater (sert zar), araknoid mater (örümceksi zar) ve pia mater (ince zar) olarak sıralanır. Bu membran sisteminin tümüne birden ‘meninks’ adı verilir. Dura matere ‘paşimeninks’, araknoid mater ile pia mater’e ise ‘leptomeninks’ ismi de verilir (Carneiro, 2006).

2.4.3.1.Dura mater

Kafatasının periosteumu ile devamlılık gösteren sıkı bağ dokusundan oluşan dış tabakadır. Kafatasında ve omurgada farklılıklar gösterir. Kafatasında duramater periosteum ile yakın ilişki içerisindeyken; omurga da dura mater ile periosteum arasında epidural aralık (spatium epidurale) bulunur. Bu alanda ince duvarlı venler, gevşek bağ dokusu ve yağ dokusu bulunur (Yıldırım, 2016). Duramater iki katmandan oluşur. Kafatasına yakın konumlanan periosteal dura mater yani endosteal tabaka; fibroblastlardan, osteoprogenitör hücrelerden, kollajen lif demetlerinden, zengin bir damar ağından ve sinirlerden meydana gelir. Bu alanda kollajen lif demetleri arasına elastik lifler de yerleşmiştir. Meningeal duramater, duramaterin iç fibröz katmanıdır. Fibroblastlardan, kollajen liflerden ve küçük kan damarlarından zengindir. Daha yoğun fakat daha az damarlı bir tabakadır. Beyin bölgesinde kafatası kemiğinin periosteumu ile dura materin sıkıca kenetlenmiş olması nedeni ile epidural aralık yoktur. Bu alanda dura yüzeyini kuşatan mezotel hücreleri bulunmaz. Damarlar duramateri delerek periosteuma girerler. Dura mater tübüler bir kılıf halinde kafatasından çıkan sinirlerin çevresinde dışarıya doğru uzanarak sinirin en dış kılıfı olan epineuriumla bütünleşir (Yıldırım, 2016; Carneiro, 2006). Belirli bölgelerde dura materin iç tabakası içe doğru

septumlar gönderir ve kranial boşluğu falks cerebri, tentorium cerebelli, diafragma sella bölümlerine ayırır (Gartner, 2006).

2.4.3.2. Araknoid mater

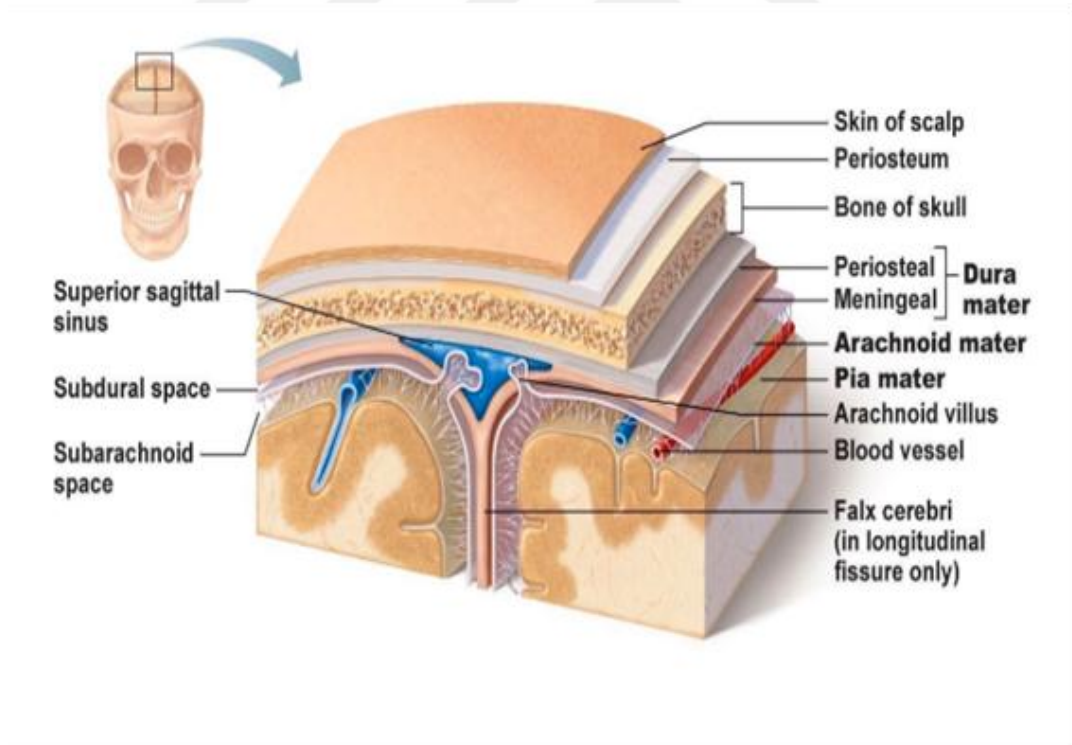
Duranın altında bulunan örümcek ağına benzeyen, iki bileşenli bir katmandır. İnce ve damardan yoksun olan araknoid, girusların üzerinde seyreder, sulkusların içine sokulmaz. Omuriliği de saran bu membran, kranial araknoidin devamlılığı niteliğindedir. İçerdiği iki bileşenden biri dura materle temas halindeki tabaka, bir diğeri de pia materle bu tabakayı birbirine tutturarak trabekül sistemidir. Dura mater ile araknoid arasında subdural aralık yer alır. Bu boşluk seröz bir sıvı içerir. Beynin en iç zarı olan pia mater ile araknoid arasında da beyin omurilik sıvısının (BOS) dolaştığı subaraknoid aralık bulunur (Ross, 2014). Subaraknoid boşluk sinir sistemini travmadan koruyan hidrolik bir yastık gibidir. Araknoid ile pia materin birbirine bakan yüzü ve araknoidin dış yüzü mezotel hücreleri ile döşelidir. Belirli bölgelerde subaraknoidal aralık genişleyerek sisternalar yapar. Araknoid membran bazı yerlerde duraya parmak şeklinde uzanarak buradaki venöz sinuslara açılır. Son kısımları genişleyerek sonlanan, üzerleri yassı hücrelerle döşeli bu uzantılara ‘araknoid villus’ denir. Bu villusların, subaraknoidal aralıktaki BOS’nın aralıklı olarak venöz sinuslara akmasını sağlayan tek yönlü kapaklar olduğu kabul edilmektedir. BOS bu villusların apeksinden venöz sinuslara ilerler. Villusların tepesinde dura oldukça incedir. BOS ile venöz kan arasında doku engeli olarak sadece venin endotel tabakası vardır. Buradaki damarların geçirgenliği vücudun diğer yerlerinde bulunanlara kıyasla daha azdır (Carneiro, 2006; Gartner, 2006; Duvernoy, 2005).

2.4.3.3. Pia mater

Doğrudan MSS organlarının üzerinde yer alan çok iyi damarlanmış ince bir bağ dokusudur. Beyin ve medulla spinalisin nöral dokusuna yakın yerleşim göstermesine rağmen nöronlarla veya sinir lifleri ile doğrudan ilişkili değildir. Bu alandaki kan damarlarının perivasküler bağ dokusu kılıfı ile temas halindedir (Gartner, 2006). Pia mater ile nöral elemanlar arasında pia materin sıkıca tutunmasına olanak veren, sinir sistemi ile BOS’nı birbirinden ayıran nörogliaların uzantılarının oluşturduğu fiziksel bir bariyer mevcuttur. Pia mater histolojik açıdan iki tabakadan oluşur (Yıldırım, 2016).

- İntimal pia tabakası: Beyin dokusunun yakınına yerleşen, içteki membranöz yapıdaki katmandır. Bu tabakada retiküler lifler bulunur. İntimal pia, fibröz septumlar şeklindeki uzantılarıyla sinir dokusu içerisine sokulur.
- Epipial tabaka: Dış pia katmanıdır. Bu tabaka kollajen lifler ve az sayıda fibroblastlar içerir. Dış yüzü tek katlı yassı mezotel hücreleriyle örtülüdür.

Beyin içine giren arterler beraberinde pia materi de sürüklediklerinden dolayı, pia mater prekapiller arteriole kadar olan damarların çevresini sarar. Damar ile pia arasındaki mesafeye ‘Wirchow Robins aralığı’ ya da ‘perivasküler aralık’ denir. Bu mesafe gittikçe daralarak sonunda kaybolur. Araknoid ve pia materin aynı germ tabakasından yani beyni saran tek tabakalı mezenkimden geliştiği için genellikle ‘pia-araknoid’ olarak adlandırılır. Bu iki tabakanın ortak kökeninin kanıtı yetişkin meninkslerinde pia materle araknoid arasında görülen çok sayıda bağ dokusu kordonlarıdır (Carneiro, 2006; Gartner, 2006).



Şekil 2.3. Beyin zarlarını gösteren şematik çizim
(<https://socratic.org/anatomyphysiology/nervous-and-/nervous-system>)

2.5. KAN BEYİN BARIYERİ (KBB)

MSS insan vücudundaki en hassas sistemdir. Nöronal fonksiyon için gerekli olan iyon konsantrasyonunun sağlanması ve sinir sisteminin metabolik taleplerinin karşılanması önemlidir. Diyetimizde tükettiğimiz maddelerin çoğu kolayca metabolize olmasına ve periferik organ sistemlerine zarar vermeden atılmasına rağmen oldukça nörotoksiktir. Bu nedenle MSS ve dolaşım sistemi arasındaki bir ara yüzün; iyon dengesinin dinamik bir düzenleyicisi, besin maddelerinin taşınmasının kolaylaştırıcısı ve zararlı moleküllerin taşınmasını engelleyici olarak işlev görmesi esastır. KBB olarak adlandırılan, serebral mikrosirkülasyonun homeostatik düzenleyicisi olan bu bariyer tüm bu işlevleri yerine getirir (Rolfe ve Brown, 1997).

2.5.1. KBB'nin Tarihçesi

KBB varlığının ilk deneysel kanıtı 1885 yılında Paul Ehrlich tarafından ileri sürülmüştür. Ehrlich dolaşım sistemine enjekte edilen suda çözünür boyaların beyin ve omurilik dışındaki tüm organları boyadığını belirtmiştir (Ehrlich, 1885). Bu gözlemini uyguladığı boyanın sinir dokusuna karşı olan affinite düşüklüğü ile bağdaştırmıştır (Ehrlich, 1904). Ehrlich'in öğrencisi Edwin Goldmann'ın sonraki çalışmaları bu durumun aslında daha farklı olduğunu göstermiştir. Tripa mavisinin doğrudan BOS'na enjeksiyonu ile beyindeki tüm hücre tiplerini boyadığını fakat çevreye nüfuz etmediğini ifade etmiştir (Goldmann, 1913). Bu bağlamda MSS ve dolaşım sistemi arasında bir bariyer olduğu ileri sürülmüştür. Lewandowsky, potasyum ferrosiyanatın beyne sınırlı bir şekilde nüfuz etmesini incelerken KBB terimini kullanan ilk kişiydi (Lewandowsky, 1909). 1940'larda Bromann KBB'ni beyindeki kapiller endotel hücrelerinin oluşturduğunu açıklamıştır. Nitekim birçok çalışma kandan beyin parankimasındaki hücreler arası sıvıya maddelerin serbest hareketini sınırlayan KBB'ni oluşturan ana yapının beyin endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar olduğunu doğrulamıştır. 1981'de Stewart ve Wiley tarafından yapılan çalışmalarda, periferik organların mikrodamar bağlantılarıyla karşılaştırıldığında KBB'ndeki endotel hücrelerinin morfolojik ve fizyolojik açıdan farklı olduğu gösterilmiştir (The university of Arizona Health Sciences center web site Available at: <http://users.ahsc.arizona.edu>). KBB ile ilgili yapılan bu öncü araştırmalar neticesinde koroid pleksus aracılığıyla beyin dokusuna madde taşınımı için gerekli olan aracın BOS olduğu hipotez olarak ileri sürülmüştür (Pardridge, 2006; Fricker ve ark., 2014).

2.5.2. KBB'nin Gelişimi

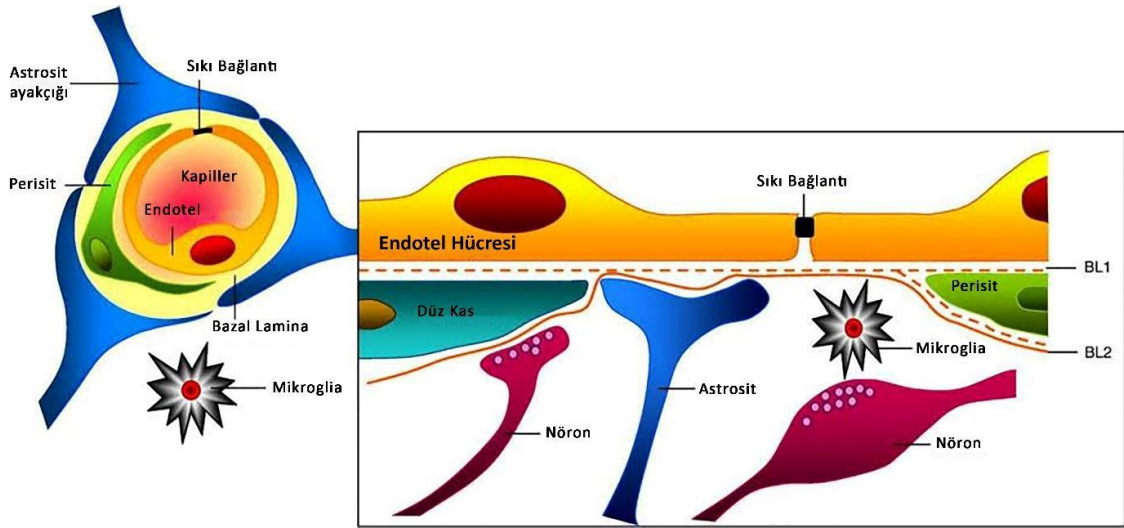
Beynin damarlanması esasen erken embriyonik dönemde oluşur. Gebeliğin yaklaşık 8. haftasında telensefalonda vaskülarizasyon başlar (Langman, 2005). Bu dönemde beyindeki endotel hücreleri vücudun diğer kısımlarında yer alan endotel hücreleri gibi fenestrasyonlara sahiptir. Endotel doku ile nöral doku arasında gerçekleşen temasdan kısa süre sonra fenestrasyonlar ciddi bir oranda azalır (Moore, 1998; Moore, 2018). Bu durum endoteldeki KBB özelliklerinin genetik olarak kodlanmadığını ancak nöral doku kaynaklı bir sinyal ile başlatıldığını düşündürmektedir. KBB'ni meydana getiren parankimal sinyallerin ise perivasküler astroglialardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Taner, 2007). İnsanlar üzerinde yapılan son çalışmalar gebeliğin erken dönemlerinde çok sayıda fonksiyonel bariyer mekanizmasının bulunduğunu göstermiştir (Snell, 2001; Dere, 2000). Bu mekanizmalar beyin damarlanması dahilinde sıkı bağlantıları ve belirli transport sistemlerini içermektedir. KBB'nin gelişimi çok aşamalı bir süreçtir (Gökmen, 2003). İlk vaskülarizasyonu sıkı bağlantı proteinleri ve besin transport sistemleri yönlendirir. 12. haftada KBB'nde oluşan primer damarlarda sıkı bağlantı proteinlerinden okludin ve kladin-5 ifadesi belirir (Langman, 2005). Ardından hem astrositlerin hemde perisitlerin nörovasküler birim ile olan teması KBB'nin olgunlaşmasını sağlar. Astrositler KBB'nin formasyonunda temel rol oynamakla beraber bariyer fenotipinin gelişimine katkıları tam anlamıyla açıklanmamıştır (Gökmen, 2003). Doğum sonrasında sıkı bağlantı proteinlerinin devamlılığında destekleyici bir rol üstlenmektedir. Bariyerin gelişimi için kritik bir başka hücre tipi perisitlerdir (Yıldırım, 2016). Perisitler bariyerin gelişimi esnasında beyindeki damarları kuşatması bariyerin geçirgenliğini azaltması ile ilişkilendirilir. Bu durum yeni gelişmekte olan beyni korumaya yönelik bir harekettir (Carneiro, 2006). Gelişimin 18. haftasında yetişkin bir beyinde yer alan bütün sıkı bağlantı proteinlerini andıran tüm oluşumlar ortaya çıkar (Langman, 2005). Gebelik esnasında ve sonrasında bu sıkı bağlantı proteinlerinin bütünlüğü ve düzenlenmesi yavaş yavaş daha kompleks bir hal alır (Ross, 2014; Gartner, 2006).

2.5.3. KBB'nin Anatomi ve Fizyolojisi

KBB, beyni kanda dolaşan zararlı maddelerden ve toksinlerden korurken, beyindeki hücrelerin fonksiyonları için gerekli besinlerin geçişine izin veren özelleşmiş karmaşık bir sistemdir. Periferik kapillerlerin aksine, KBB beyne çoğu maddenin girişini fiziksel

ve metabolik açıdan sıkı bir şekilde kontrol eder. Ne yazık ki bu kontrol terapötik ajanların da beyin dokusuna geçişini büyük ölçüde engeller. Aynı zamanda KBB'nin hasar görmesinin MSS patolojilerinde anahtar rol oynadığı da bir gerçektir. Bu nedenle KBB'nin morfolojik ve fonksiyonel olarak sağlam kalması çok önemlidir (Bernacki ve ark., 2008). Bariyer sadece, su ve küçük lipofilik maddelerin konsantrasyon gradientleri ölçüsünce serbest geçişine izin verirken, 400-700 kDa'dan daha büyük moleküllerin ve hidrofilik maddelerin beyine geçişini engeller. Bu alanda gerçekleşen madde transportunda maddenin lipitte çözünürlüğü, difüzyon yeteneği, molekül ağırlığı ve elektrik yükü önemlidir. Bu kontrollü geçiş MSS homeostazisinin korunmasında en etkili unsurdur. KBB anatomisi ancak histolojik düzeyde izah edilebilir. Histolojik olarak KBB'ni oluşturan elemanlar şunlardır:

1. Kapiller damarların endotel hücreleri
2. Bazal membran
3. Perisitler
4. Astrositler (astrosit ayakçıkları) (Germano ve Tomasello, 2001).



Şekil 2.4. KBB Elemanlarının İlişkileri (Hawkins ve Davis, 2005) .

2.5.3.1. Endotel Hücreleri

Beyin mikrodamarlarındaki endotel hücreleri, diğer dokulardaki endotel hücreleriyle karşılaştırıldığında, moleküllerin ve iyonların hareketlerini sıkı bir şekilde

düzenlenmesine izin veren önemli özelliklere sahiptir. Bu özellikler Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Beyin Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Genel Özellikleri (Yorulmaz ve ark., 2010).

• Yüksek elektriksel dirence sahip sıkı bağlantılar içermesi (1000-2000 ohm cm ²)
• Devamlılık gösteren bazal membran
• Az sayıda pinositik vezikül bulundurması
• Çok sayıda mitokondriyona sahip olması
• Sıvı faz endositozunun yavaş olması
• Astrositlerle yakın ilişki
• Vasküler hücre adezyon molekülü-1 ve intrasellüler adezyon molekülü-1 gibi adezyon moleküllerinin düşük seviyede bulunması
• Düşük düzeylerde major histokompatibilite kompleks antijenlerini göstermesi
• Aktive olmuş T hücreleri gibi sadece birkaç mononükleer hücrenin geçişine izin vermesi

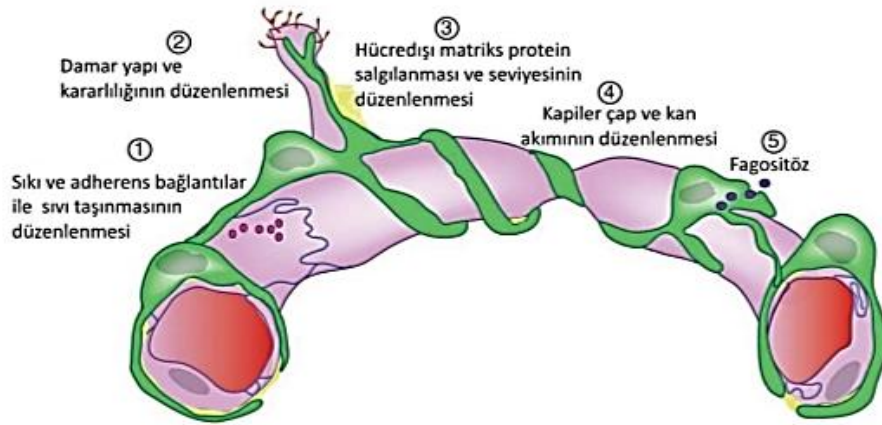
2.5.3.2.Bazal membran

Endotel hücrelerinin altında kesintisiz bir bazal membran bulunur. Aslında damarın bu tabakası iki ayrı bazal membran ile kuşatılmıştır. İçte bulunanı vasküler bazal membran, dışta bulunanı ise parankimal bazal membrandır. Bu bazal membranların içerikleri birbirinden farklıdır. Vasküler bazal membran endotel hücreleri ve perisitler tarafından yapılan bir ekstrasellüler matrikstir. Buna karşılık parankimal bazal membran öncelikli olarak erişkin damar sistemine doğru uzanan astrositik uzantılar tarafından oluşturulur. Bazal membranları perisit ve astrositler tarafından üretilen tip IV kollajen, laminin, nidojen, heparin sülfat, proteoglikanlar ve glikoproteinler gibi farklı moleküller meydana getirmektedir (Wu ve ark., 2009; Reinhold ve Rittner, 2017).

2.5.3.3.Astrositler ve Perisitler

Endotel hücrelerinin abluminal kısmında yerleşen perisitler endotel bazal laminası ile sarılmışlardır. Genellikle 5-6 adet endotel hücrelerine bir perisit eşlik eder. Endotel hücrelerin tamamını örtecek şekilde kapiller yapıyı kuşatarak KBB’nin bütünlüğünün korunmasında görev alırlar (Peppiatt ve ark., 2006; Nakagawa ve ark., 2007; Armulik ve ark., 2010). Endotel ile yakın ilişkiye girerek beynin savunulmasında KBB’nin ikinci

bir hattı gibi görev yaparlar. Buna ilaveten sıklıkla astrositlerle temas halinde bulunurlar. Aktin içerikleri ile kasılabilmeleri sayesinde özellikle pia materin arteriollerinde kan akımının düzenlenmesinde de görev alırlar. Şekil 2.5’de perisitlerin görevlerinden bazıları belirtilmiştir. Tüm vücutta perisitlerin endotel hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını, göçünü, farklılaşmasını ve ayrıca damarsal dallanmayı düzenlediği öne sürülmüştür (Hellström ve ark., 2001).



Şekil 2.5. Perisitlerin KBB’nin endotel hücreleri ile ilişkisi görülmektedir (Winkler ve ark., 2011)

Astrositler, MSS’de bulunan, nöronlara yapısal ve metabolik destek sağlayan en büyük nöroglia hücreleridir (Ross, 2014; Gartner, 2006). Nöronlar arası mesafenin büyük bölümünü doldururlar. Çok miktarda dallanan, uzantıları olan yıldız şeklinde hücrelerdir (Eşrefoğlu, 2016). Beyaz madde de daha bol bulunan fibröz astrositler ve gri madde de daha bol bulunan protoplazmik astrositler olarak iki farklı tipi vardır. Bazı araştırmacılar bu iki tipte astrositin de farklı yerlerde aynı görevi üstlendiklerini öne sürmektedir. Yaklaşık çapları 8 µm kadardır. Perinükleer sitoplazmaları soluk boyanan, organelden zengin olan hücrelerdir. Sitoplazmik uzantıları ile kan damarlarına, nöronlara ve MSS’nin yüzeylerine uzanırlar. Protoplazmik astrositler, yıldızsı şekle sahip, bol sitoplazmalı, iri nükleuslu ve dallanmış kısa uzantıları olan hücrelerdir. Uzantılarının hafif bir genişleme gösteren uç kısımları ‘perivasküler ayakçık’ (son ayaklar) ya da ‘pedisel’ olarak adlandırılır. Beyin kapilleri ve pia materin iç yüzü tamamen astrositin pediselleri ile sarılarak gliya limitansı şekillendirir (Ross, 2014). Bu uzantılardan

bazıları nöron gövdesi üzerinde sonlanırken bazıları da kan damarları üzerinde sonlanarak KBB'nin yapısına katılır (Ross, 2014). KBB'ne olan katkıları, bu bağlantıyı yapan kapillerlerin sıkı bağlantılarını desteklemeleri ile gerçekleşir. Fibröz astrositlerin sitoplazmik uzantıları ince ve uzundur. Sitoplazmalarında organel azdır, birkaç serbest ribozom, glikojen ve bol mikrofilament bulunur. Fibröz astrositler de protoplazmik astrositler gibi pia mater ve kan damarlarına yakın yerleşir. Astrositlerin en dikkat çeken özelliği çok miktarda Gliyal fibriler asidik protein (GFAP) içermesidir. GFAP, astrositin tanımlanmasında kullanılan önemli bir belirteçtir (Ross, 2014). Astrositler MSS'nin birçok işlevinde görev alır. Sinir sisteminin hasar görmesi durumunda bir araya gelip, çoğalarak yara iyileşmesine katkıda bulunurlar. Nöronların ve ranvier boğumlarının mikroçevresindeki K^+ glutamat γ - aminobütirik asit (GABA) gibi metabolit artıkları, iyonları ve nörotansimater maddeleri toplayarak nöronlara yapısal ve metabolik destek sağlarlar. Beyin dokusunda hücreler arası alanın pH (Power of Hydrogen) kontrolünü gerçekleştirirler (Carneiro, 2006).

2.5.4. KBB'nin Sıkı Bağlantı Yapıları

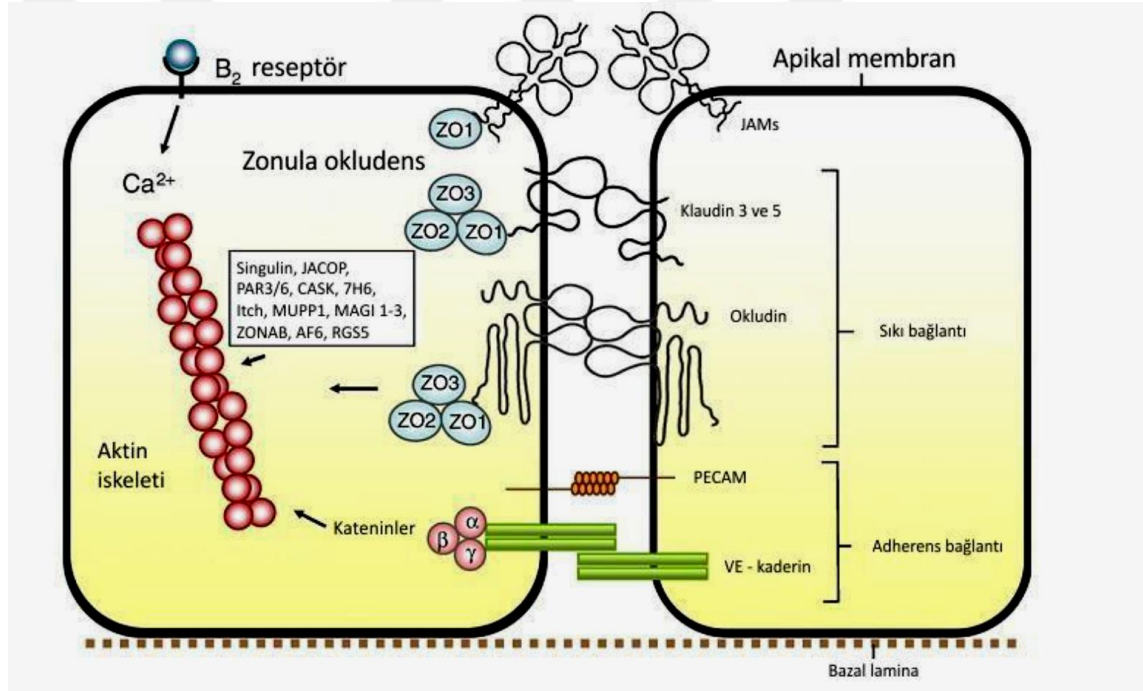
KBB'nin endotel hücreleri adherens ve sıkı bağlantı yapıları olarak bilinen özelleşmiş yapılar içerir. Adherens tipi bağlantılar hücreler arası tutunmayı sağlarlar, hücrelerin korunmasında ve olgunlaşmasında önemlidirler. Tight junction (TJ) tipi sıkı bağlantı yapıları ise iyon ve çözünmüş madde geçişini düzenleyerek parasellüler geçişi kontrol ederler. TJ komplekslerinde madde geçişini düzenleyen çeşitli proteinler mevcuttur. Her iki bağlantı tipi de endotel hücrelerinin fonksiyonlarına katkı sağlar (Cornford ve Hyman, 2005; Bendayan ve ark., 2002).

2.5.4.1. Okludin

Bir TJ membran proteini olan okludin yaklaşık 60-65 kda molekül ağırlığındadır. Sıkı bağlantıyı ve permeabilityyi sağlayan bariyerin ana proteinidir. TJ yapısı içindeki moleküller arasında keşfedilmiş ilk integral proteindir. Hücre zarını kapsayan dört tane transmembran domaini ve 2 tane ekstrasellüler lupları bulunur. Okludin'in sitoplazmik bir alanı direkt olarak zonula okludens (ZO) proteini ile ilişkilidir. Beyin endotelinde sürekli ve yüksek oranda ifade edilirken nöronal olmayan alanlarda daha seyrek dağılım gösterir (Lippoldt ve ark., 2000; Hirase ve ark., 1997; Hawkins ve ark., 2004).

2.5.4.2. Scaffold Proteinleri

Scaffold proteinleri, okludin ile etkileşim halindeki membran bağlantılı guanilat kinaz benzeri protein (MAGUK) ailesine ait olan zonula okludensler (ZO-1, ZO-2, ZO-3) olup bağlantı bölgelerine özel proteinlerdir (Haskins ve ark., 1998). Bu ailenin ilk tanımlanan proteini olan zonula okludens-1 (ZO-1); 220 kda molekül ağırlığındadır. F-aktin ile ilişkili olup endotel bariyerinin oluşumu ve aktin-miyozin organizasyonu için önemlidir (Tornavaca ve ark., 2015). Endotelial ve epitelyal hücrelerde ayrıca TJ içermeyen birçok hücre çeşidinde de yüksek oranlarda ifade edilir (Howarth ve ark., 1992). ZO-1, TJ 'nin transmembran proteinlerini aktin hücre iskeletine bağlar (Fanning ve ark., 1998).



Şekil 2.6. KBB bölgesinde endotel hücrelerinin temas bölgelerindeki TJ yapılarının görünümü (Abbott ve ark., 2010).

2.5.5. KBB Fonksiyonları

2.5.5.1. İyon Düzenlenmesi

KBB nöronal fonksiyonlarını yürütebilmek için çevresel stabiliteyi sağlar. Bunun yanı sıra mevcut iyon kanalları ve transport proteinleri yardımıyla sinaptik sinyal fonksiyonlarının optimal düzeyde sağlanacağı şekilde iyonik geçişleri düzenler. Böylece memeli plazmasında 4,5 mM olan K^+ 'un konsantrasyonu, BOS ve beyin intersitisyel

sıvısında 2,5-2,9 mM civarlarında sabitlenir. Plazmadaki K^+ iyon konsantrasyonu, egzersiz ya da beslenmenin ardından veya patoloji kaynaklı durumlarda değişebilir. Beyin kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan iyon taşıyıcıları sıvı salınımında ve MSS iyon homeostazisinde görev almaktadır. Beyin ekstrasellüler sıvısının iyonik bileşeni MSS işlevi için hayati önem taşımaktadır. K^+ konsantrasyonu düzenlenmesinin yanı sıra, Ca^{+2} , Mg^{+2} konsantrasyonları ve pH, KBB tarafından bu amaçla düzenlenmektedir (Somjen, 2004; Nischwitz ve ark., 2008; Jeong ve ark., 2006; Hladky ve Barrand, 2016).

2.5.5.2. Nörotransmitter Düzenlenmesi

Besin alımının ardından belirgin bir şekilde değişiklik gösteren bir nöroeksitör nörotransmitter olan glutamat kan plazmasında yüksek miktarda bulunur. Hipoksik nöronlardan kontrolsüz bir şekilde beyin interstisyel sıvısına bırakılan glutamat, nöral dokuda kalıcı nörotoksik ve nöroeksitör zarara sebep olabilir. MSS ve PSS aynı nörotransmitterleri kullanır. KBB'nin bir başka görevi de iki sistemin nörotransmitterlerini ayrı tutmak ve çapraz geçisi engellemektir (Bernacki ve ark., 2008; Abbott ve ark., 2010).

2.5.5.3. Makromoleküller

KBB birçok molekülün beyine ulaşmasını engeller. BOS'ndaki protein içeriği plazma ile kıyaslandığında oldukça düşük olup, proteinlerin yapısı da birbirinden farklıdır. Albumin, protrombin ve plazminojen gibi plazma proteinleri, apoptoze yol açabilen hücrel aktivasyonu başlattıkları için sinir dokusuna zarar verirler. KBB birçok molekülün beyine ulaşmasını engeller. MSS genelinde trombin reseptörü PAR1 ve protrombini trombine dönüştüren Faktör Xa yaygındır. Ayrıca plazminojeni plazmine çeviren doku plazminojen aktivatörü de bulunur. Trombin ve plazminin beyin interstisyel sıvısında bulunması epilepsi nöbetleriyle sonuçlanabilecek bir kaskadı tetikleyebilir. Bu kaskad gliyal hücre aktivasyonuna, gliyal hücre bölünmesine, skar dokusu oluşumuna ve hücre ölümüne kadar ilerleyebilir. Yüksek molekül ağırlıklı plazma proteinlerinin beyine sızması böyle ağır patolojik sorunlara neden olur. Bölgesel olarak MSS'de sentez edilen cystatin-c BOS'n da plazmaya oranla yaklaşık 4 kat daha fazla konsantrasyonda bulunur. Cystatin bir serin proteaz inhibitörüdür. BOS'n da plazmaya göre fazla olması ile KBB'de olası mikro sızıntıları engelleyen ayrıca bir koruma mekanizması oluşturduğu düşünülür. (Abbott ve ark., 2010).

2.5.5.4. Nörotoksinler

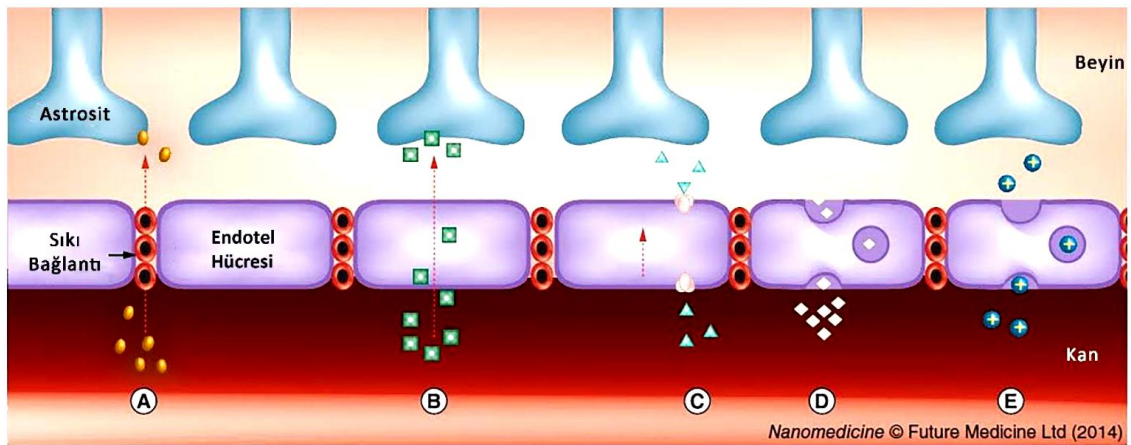
KBB nörotoksik maddelere karşı beyni koruyan bir bariyerdir. Bu nörotoksik maddeler endojen metabolitler, proteinler, diyetle alınan ksenobiyotikler ya da çevresel kaynaklı faktörlerdir. ATP-bağlayan kaset taşıyıcıları isimli enerji bağımlı eflüks taşıyıcıları, bu nörotoksik maddelerin çoğunu beynin dışına pompalar (Ek ve ark., 2010). Sağlıklı bir insanın beyinde doğum itibarıyla başlayan ve yaşam boyunca devam eden, sürekli olarak sabit oranda nöronal hücre ölümleri gözlenir (Lim ve ark., 2007). Beyinde nörotoksinlerin artması neticesinde hücre ölümlerindeki artış, beyin fonksiyonlarının erkenden bozulmasına sebep olur. Nörotoksik bir madde ile karşılaşıldığında, inflamatuvar sitokinlerin salınması ile oksidatif stresi artar ve sonuçta KBB geçirgen bir hale gelir (Silverstein ve ark., 2012; Abbott ve ark., 2010).

2.5.5.5. Beynin Beslenmesi

Beynin enerji sağladığı ana kaynak glukozdur. Sağlıklı bir beynin glukoz tüketimi, dakikada 100 gr beyin dokusunda 23 mM'dır. Arteriyel kan glukozunun %15'i serebral dokuya hareket eder (Paulson, 2002). Beyin temelde ihtiyaç duyduğu besin maddelerini depolama yeteneğine sahip değildir. Besin maddelerini gereken oranda temin etmek amacıyla, özellikle de gelişim sürecinde birçok spesifik taşıyıcı sistemi kapiller sistem üzerinde oluşturmuştur. Gereksinim duyduğu besin maddelerine hızlıca ulaşması için kapiller damarlar yardımcıdır. Kapiller damarların endotel membranlarının üzerinde bol miktarda spesifik taşıyıcı bulunur. Bu taşıyıcılar özellikle embriyonel gelişim sürecinde endotel membranında kendilerine ait özgün bölgelerde konumlanır. Nöronların beyin ihtiyacının karşılanmasında endotel hücrelerinin ardından astrositler ayakta sonlanmaları ile önemli ölçüde iş görür (Abbott, 2005). Bu ileti sistemi, TJ proteinlerinin yapımının artışı ile ayrıca membranın luminal ve abluminal kısımlarında özel transport proteinlerinin oluşumuyla daha da geliştirilmiştir. Bütün bunların yanısıra beyin parankimindeki hücrelerin beslenmesi için perisit, mikrogliya ve sinir terminalleri de beyin kapiller damar endotel hücreleriyle sıkıca bağlantıya geçerek madde taşınmasında önemli rol oynarlar. Özetle, KBB hem beyin parankimi için sabit bir mikroçevre sağlarken hem de beyni kimyasal zararlı etkilere ve dolayısı ile hasarlardan korumaktadır (Abbott ve ark., 2010).

2.5.6. KBB'nde Madde Taşınımı

Bazı maddelerin KBB'nden beyne girişleri primer ve sekonder olmak üzere birçok faktörle ilişkilidir. KBB ile ilgili primer faktörler; maddenin molekül ağırlığı, molekülün konformasyonal değişim kabiliyeti, hücrenin enzimatik sabitliği, hücresel sekresyon, akıma karşı olan bağlanma gücü, hidrojen bağlayıcı potansiyeller, taşıyıcılara karşı bağlanma gücü ve mevcut patolojik durumların etkisi olarak sayılabilmektedir. Sekonder ya da periferik faktörler; sistemik enzimatik sabitlik, plazma protein bağlayıcılarının afinitesi, serebral kan akımı ve yine mevcut patolojik durumların etkisi olarak sıralanır. Madde taşıma sistemleri genellikle KBB'nin luminal yüzünde bulunur. Beyinden kana doğru geçişe izin veren sistemler ise KBB'nin abluminal yüzünde yarar alır. KBB'nden madde geçişi, basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport veya veziküler transport şeklinde gerçekleşebilir. Bu geçişte maddenin lipitte çözünürlüğü, difüzyon yeteneği, molekül ağırlığı ve elektrik yükü oldukça önemlidir (Huber ve ark., 2001). Bariyerde bulunan endotel hücreleri arasındaki TJ'lerin varlığından dolayı beyin ihtiyacı olan birçok madde transendotelial (transselüler) yolu kullanmak zorunda kalır. Sadece 400 Da'dan daha düşük çapa sahip lipofilik moleküller basit difüzyon ile bariyeri aşabilirler (Pardridge, 2002; Boado ve Pardridge, 2011).

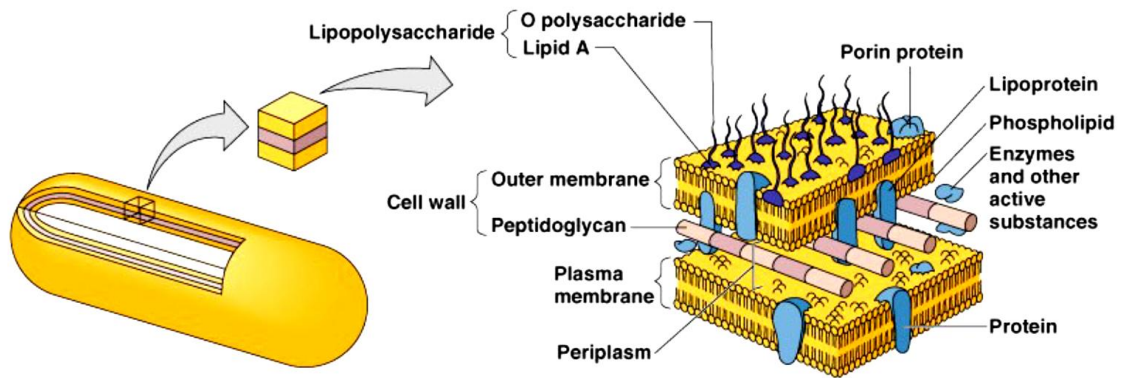


Şekil 2.7. KBB'nden geçerek beyne maddelerin taşınım yolları gösterilmiştir. A) Suda çözünür ajanların kullanıldığı paraselüler aköz yolak B) Lipofilik moleküllerin taşınımının gerçekleştiği transselüler yolak ile C) Glikoz ve amino asitler tarafından tercih edilen zar proteinleri aracılığıyla taşınım D) Makromoleküllerin (Örneğin: insulin, transferrin) reseptör aracılı taşınımı E) Pozitif yüklenmiş plazmatik proteinlerin adsorptive taşınımı.

2.6. ENDOTOKSEMİ

Endotoksemi, kanda endotoksinlerin bulunmasıdır (Smith, 1996). Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit (LPS) tabakasında bulunan endotoksin, dokulara girince akut bir inflamasyonu başlatır (Lohuis ve ark., 1988). İnflamasyon, inflamatuvar bir uyarana cevap niteliğinde ortaya çıkan dinamik olaylar zinciridir. Gram negatif bakteri hücre duvarı içte peptidoglikanlardan, dışta LPS, proteinlerden ve fosfolipitlerden oluşur. LPS tabakada bulunan endotoksin molekülü, hücre membranında kaldığı sürece inaktiftir. Mikroorganizma konakta büyürken ve yıkılırken açığa çıkan bu molekül sepsisi başlatır (Fısgın, 2004). Bu durumda LPS içeren dış tabakada toksisitenin ana sorumlusudur (Parrillo, 1993; Dunn, 1994). Endotoksinin, septisemide bakteriler aracılığıyla oluşturulan enfeksiyonun morbidite ve mortalitesi üzerinde birçok önemli rolü olduğu bildirilmektedir (Hardaway, 2000). Polisakkarit O antijeni, Core antijeni ve Lipid A olmak üzere üç bölüme ayrılır. Bir polisakkarid yan zincir olan O antijeni, core polisakkaridi ile bir fosfolipid olan lipid A'ya bağlanır. O antijeni gram negatif bakteri suşlarına göre değişkenlik gösterir ve belirgin serotipik farklılaşmayı sağlar. Lipid A bölgesi toksisitenin asıl sorumlusu olarak kabul edilir. LPS kolaylıkla sistemik dolaşıma geçer ve bazı hücreleri uyarak sepsis kaskadını tetikleyen sitokinleri salar. Monositler, makrofajlar, nötrofiller ve endotel hücreleri enfeksiyona karşı verilen yanıtta önemli rol oynayan hücrelerdir. Bu hücrelerin yüzeyinde LPS için reseptörler yer alır. Yüzey farklılaşma antijenlerinden (Cluster of differentiation) CD14 başta olmak üzere CD11, CD18 ve Toll benzeri reseptörler (TLR) bütün bakteriyi ya da LPS gibi bakteriyel ürünleri tanıyan özel reseptörlerdir (Annane ve ark., 2005). Büyük oranda karaciğerde sentezlenen LPS bağlayıcı protein (LBP) 60 kDa molekül ağırlığındadır. CD14 ise 55 kDa molekül ağırlığında glikozilfosfoinozitol bağlı bir reseptördür. LBP ilk olarak LPS'in lipid A bölümü ile eşleşir. Oluşan LPS-LBP kompleksi sonrasında CD14 reseptörüne tutunur. Başlangıçta bir akut faz cevabı proteini olarak tanımlanan LBP'in sonrasında serumda da bulunduğu belirlenmiştir. Bu proteinin LPS-CD14 birleşmesini aktive ettiği gösterilmiştir (HE, 1998). Bu birleşme ile hücre içinde bir sinyal ortaya çıkar, nükleustaki NF- κ B aktive olur. Bu aktivasyon proinflamatuvar sitokinlerin ifadesini artırır. LPS, CD14 molekülleri sayesinde inflamasyonda görevli hücrelere tutunur. Bu şekilde çeşitli sitokinleri ve kemokinleri üretime geçirir. Septik şok ile oluşan lezyonların sebebi LPS'nin uyarımı sonucu makrofajlardan salgılanan üç tip inflamatuvar mediatördür. Bunlar, inflamatuvar sitokinler

(IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri ve araşidonik asit metabolitleridir (prostaglandinler, leukotrienler) (Diker, 2005). Bu ara ürünler dolaşımında hemodinamik dengesizliğe, apoptozise, nekroza ve sonuçta organ fonksiyonlarında bozulmaya yol açar (Yeğenağa, 2006). Bakteri kaynaklı LPS gastrointestinal kanalda vücutta herhangi bir zarara sebep olmadan bulunabilirler, fakat dolaşım sistemine küçük bir miktarının dahil olması ciddi klinik cevapları başlatır. Bu cevaplar gastrointestinal motilitede azalma, nötropeni, lenfopeni gibi lökosit anormallikleri ve trombositopeni, vasküler permeabilite artışı, kardiopulmoner fonksiyonda belirgin değişiklikler, kalp ve böbrek yetmezliğine yol açan organ kan akımında ve metabolizmada azalma ile bunlara bağlı olarak ölüm ile sonuçlanır (Constable, 2007).



Şekil 2.8. Gram negatif bakterinin hücre duvarında LPS'in konumu gösterilmiştir. (Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)

2.6.1.Sepsis

Sepsis kelimesi Yunanca çürüme ve ayrışma anlamına gelen "σήψη" (sepo) kökünden türemektedir. Hipokrat milattan önce 5. yüzyılda yaşamış, bu kelimeyi Corpus Hippocraticum adlı kitabında “hastalık yapan tehlikeli et çürümesi” şeklinde ifade etmiştir (Funk ve ark., 2009). Ayrıca Hipokrat sepsis ile ilgili “akut bir hastalıkta ekstremitelerin soğuması kötü bir belirtidir” şeklinde bir çıkarımda bulunmuştur (Davies ve Hagen, 1997). Milattan önce 4. yüzyılda Aristo, sepsisin kaynağının bataklıklarda yaşayan gözle görülmeyen canlılar olduğunu düşünmüştür (Baron ve ark., 2006). 1020’li yıllarda İbn-i Sina yazdığı ‘El Kanun fi’ t Tıb’ adlı kitabında, bulaşıcı hastalıkların gözle görülmeyen canlılar tarafından meydana getirildiğini söylemiştir (Syed, 2002). Hipokratın sepsis tanımlamasından yaklaşık 24 asır sonra günümüzde

hala sepsis terminolojisindeki karmaşa devam etmektedir. 1991 yılında Society of Critical Care Medicine ve American Collage of Chest Physicians'ın konsensus toplantısında sepsise yönelik evrensel bir tanımlama geliştirilmiştir. Konsensuse göre sepsis, 'enfeksiyona verilen sistemik inflamatuvar cevap'tır. Ayrıca anlam karmaşasını gidermek için enfeksiyon, bakteriyemi, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), septik şok ve multiple organ yetmezliği sendromu (MODS) ile ilişkili tanımlamalar da bu konsensusda aydınlatılmıştır (Bone ve ark., 1992).

Enfeksiyon: Pirojenik mikroorganizmaların steril vücut boşlukları, dokular veya vücut sıvılarında bulunmasıyla gerçekleşen patolojik bir gelişmedir (Bone ve ark., 1992).

Bakteriyemi: Kanda canlı bakterilerin varlığıdır (Bone ve ark., 1992).

Sistemik inflamatuvar cevap sendromu (SIRS): Canlıda farklı klinik etkilerle ortaya çıkabilen genel inflamatuvar cevabı ifade eden bu sendrom çoğunlukla "endotel disfonksiyonu" ile beraberlik gösterir. SIRS teşhisinin konulması için, dört kriterden iki veya daha fazlasının olması gereklidir. Bu kriterler; vücut ısı $>38\text{ C}$ ya da $<36\text{ C}$, kalp hızı >90 atım/dk, solunum sayısı >20 /dk ya da $\text{PaCO}_2 <32\text{ mm Hg}$, lökosit sayısı $>12.000/\text{mm}^3$, $<4000/\text{mm}^3$ ya da kanda $>\%10$ immatur lökosit varlığıdır (Bone ve ark., 1992; M, 1996). Gram negatif bakterilerin oluşturduğu SIRS, daha sık görülmesi, yüksek ölüm oranı ($\%30$ - $\%90$) ve kolay deneysel metodlar kurulabilmesi açısından gram pozitiflere göre çok daha fazla araştırılmaktadır (Iskit ve Guc, 2001; Baykal ve ark., 2000).

Septik şok: Tüm müdahalelere rağmen devam eden, düzelmeyen hipotansiyon ve organ yetmezliklerinin yanında kardiyovasküler sistem bozukluklarının da mevcut olduğu durumu ifade eder (Iskit ve Guc, 2001; Baykal ve ark., 2000).

Multiple organ yetmezliği sendromu (MODS): Tedaviye rağmen homeostazın sağlanamadığı, birden fazla organ veya sistemin işlevindeki yetersizlikle karakterize olan sendromdur (M, 1996; Bone ve ark., 1992).

Sepsis ile organizmanın verdiği anormal cevap, yaygın inflamasyon, organ işlev bozukluğu ve organ yetersizlikleri ile sonuçlanır. Bu süreçten hücre hipoksisi ve apoptozu sorumludur (Altınöz ve ark., 2001). En büyük organ hasarı akciğerler, karaciğer, böbrekler, kalp ve gastrointestinal sistemde meydana gelir (Wheeler ve Bernard, 1999). Sepsisin sinir sistemi üzerindeki en büyük etkisi enfeksiyona karşı

geliştirilen nöroimmünolojik yanıtın sinir sistemi bariyerlerinden biri olan KBB'nin fonksiyonlarını bozmasıdır. KBB hasarı çeşitli nörolojik hastalıkların patogeneğinde etkindir (Allison ve Ditor, 2014; Nguyen ve ark., 2002). Sinir sistemindeki inflamasyon kaskadı neticesinde endotelin fonksiyonel kaybının yanısıra aksonal hasar oluşumu da dikkat çeker (Hendriks ve ark., 2005). Ayrıca nöron dejenerasyonu, vasküler ödem ve hemoraji sepsis yoluyla beyinde oluşan doku hasarının göstergeleridir (Şener ve ark., 2005).

2.6.2. Sepsis Modeli Olarak LPS

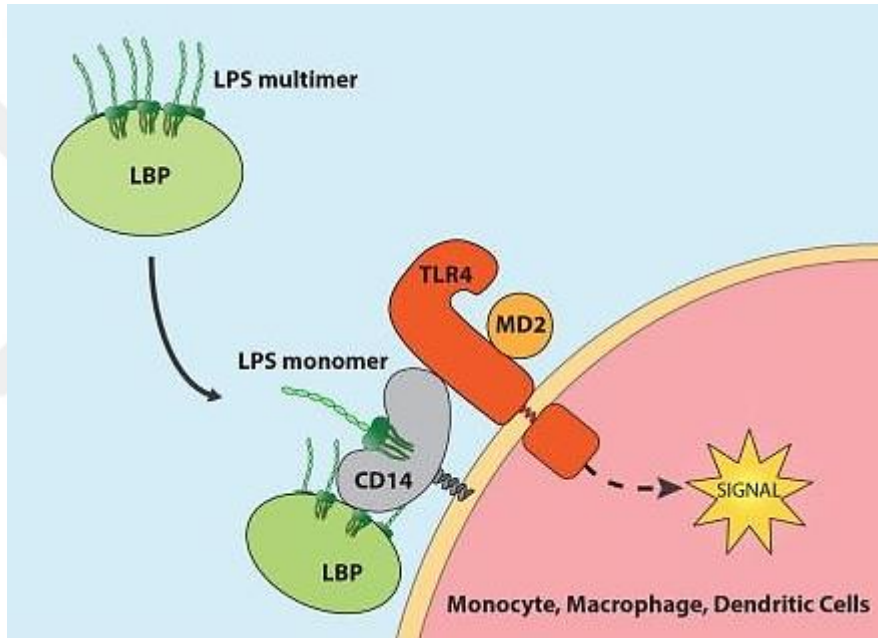
Vücuttaki doğal bağışıklıkta algılanıp tanınan bakteri ürünlerine, patojen-bağımlı moleküler yapılar (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) ismi verilir. Gram negatif bakterilerin dış membran yapısında yer alan LPS, gram pozitif bakterilerin dış membranında bulunan lipoteikoik asit, mayaların hücre duvarlarında yer alan mannan ve hem gram pozitif hem de negatif bakterilerde bulunan, ancak gram pozitif bakterilerde daha kalın seyreden peptidoglikan yapısı PAMPs'lar kapsamındaki moleküllerdir (Arslantas ve ark., 2013). Bunlardan en önemlisi LPS'dir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarından elde edilen LPS, deneysel hayvan septik şok modellerinde kullanılan, glikolipid yapıda olan maddeler grubudur. Genel itibarıyla liyofilize toz halinde ticari olarak temin edilir. Liyofilizasyon işlemi fenol ekstraksiyonu, triklorasetikasit ekstraksiyonu, fenol-kloroform-eter ekstraksiyonu ve jel filtrasyonu gibi çeşitli kimyevi işlemler uygulanarak üretici firma tarafından yapılır. LPS'ler *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok gram negatif bakteriden elde edilebilir. Fakat deneysel septik şok çalışmalarında daha çok *E. coli*'den elde edilen LPS molekülleri kullanılır. O26:B6, O55:B5, O111:B4 gibi çeşitli serotiplere sahip farklı *E. coli* suşlarından elde edilen LPS türleri mevcuttur (İskit, 2005). Deneysel araştırmalarda pek çok araştırmacı tarafından tavşan, sıçan, fare, köpek, keçi, at, sığır gibi hayvanlar deneysel endotoksemi oluşturmak için kullanılmaktadır (Gerros ve ark., 1995). LPS'lere bağlı olarak geliştirilen septik şok tablosunu, metabolik, immünolojik, fizyolojik, toksikolojik ve farmakolojik açıdan değerlendiren birçok çalışma mevcuttur. Literatürlere göre uygulanacak doz 1 mg/kg ile 80-100 mg/kg arasında değişen geniş bir aralığa sahiptir. Sağkalım çalışmalarında dozlar genelde yüksektir. Dozları belirleyen bir diğer önemli faktör de LPS'nin hangi suşlardan elde edildiğidir (İskit ve Guc, 2003; İskit ve Guc,

2001). Deneysel septik şok modellerinde, toz halinde olan ve suda çözdürülen LPS intravenöz ya da intraperitoneal olarak genellikle tek doz halinde verilir. Bu kullanım kolaylığının yanısıra saf ve stabil olması, ayrıca kontaminasyon tehlikesinin de yok denecek kadar az olması büyük bir avantajdır (İskit, 2005).

2.6.3. Toll Like Reseptörleri (TLR)

TLR'ni protein yapısında olan toll genleri kodlar. Bu gen ilk defa 1985'te Nobel ödüllü Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Weischaus ve arkadaşları tarafından bir meyve sineği olan *Drosophila melanogaster*'de tanımlanmıştır. İlerleyen yıllarda bu genin memelilerde var olduğu hatta omurgasızlarda da doğal immünitede gerekli olduğu anlaşılmıştır. İnsanlarda TLR'nin tanımını ilk kez Nomura ve arkadaşları 1994'te yapmıştır (Taguchi ve ark., 1996). 1997'de Janeway ve Medzhitov; TLR'nin insanlarda edinilmiş immün sistemi aktive ettiğini bildirmiştir (Medzhitov ve Janeway, 1997). Bu reseptörler makrofaj ve dendritik hücreler tarafından ifade edilen tip 1 transmembran proteinleridir. Ligandların tanınmasını kolaylaştıracak üç kısımdan oluşur. Ekstraselüler bölüm, transmembran heliks bölümü ve son olarak sinyal yolaklarının başlangıcı olan intrasellüler toll-like/interlökin-1 reseptör bölümüdür (Medzhitov ve ark., 1997). Günümüzde mevcut 13 adet fonksiyonel TLR vardır. Ayrıca bu reseptörlere uygun birçok ligand tanımlaması yapılmıştır. TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 genellikle hücre yüzeyine yerleşip patojenlere spesifik molekülleri tanırlar. TLR 3, 7, 8 ve 9 ise intrasellüler organellerin içinde yerleşirler (Medzhitov ve Janeway, 1997). TLR2, gram pozitif hücre duvar yapısında yer alan lipoteikoik asid, peptidoglikanın algılanmasından sorumludur. TLR5, flagellin reseptörüdür. TLR9, bakteriyel DNA'da sitozin-fosfat-guanin (CpG) elementlerinin tanınmasını sağlar (Tuğrul ve Ersoy, 2004). Enfeksiyon anında makrofajlar patojenlerde bulunan PAMPs'ı TLR'lerin yardımıyla tanır. TLR sinyal mekanizması ile proinflamatuvar sitokin ve nitrik oksit gibi antimikrobiyal küçük moleküllerin üretimi indüklenir. Sonuç olarak enfeksiyonun erken aşamasında makrofajlar mikroorganizmaların eliminasyonu için aktive olurlar (Rescigno ve ark., 2000). 2011'de Dr. Beutler ve Dr. Hoffmann TLR-4'ün LPS'leri tanıyan bir reseptör olarak işlev gördüğünü gösterdi. Araştırmacıların bu keşifleri Nobel ödülüne layık görüldü (Medzhitov ve Janeway, 1997). TLR ailesi içerisinde insanda ilk olarak karakterize olan reseptör TLR-4'dür (Medzhitov ve ark., 1997). TLR-4'ün fonksiyonları ilk kez, bu reseptörün LPS'ye kayıtsız kalmasını sağlayan LPS geninin genetik açıdan

çalışılması ile tespit edildi (Qureshi ve ark., 1999; Poltorak ve ark., 1999). TLR-4; hücre yüzeyinde LBP, CD14 ve MD-2 (myeloid differentiation factor-2) içeren bir molekül kompleksi meydana getirir. Bu moleküllerden herhangi birinin farelerde eksik olması halinde LPS cevabının da eksik olduğu gösterilmiştir (Agnese ve ark., 2002). TLR-4'ün aktivasyonu için öncelikle liganda tutunması gerekir. Böylece mitojenle aktive edilen protein kinaz aileleri ve NF κ B uyarılır. Bu uyarılma ile IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genleri aktive edilir. Meydana gelen bu süreç konağa ait doğal immün yanıttır (Vasson ve Reimund, 2007; IR, 2004 ; Chen ve ark., 2005).



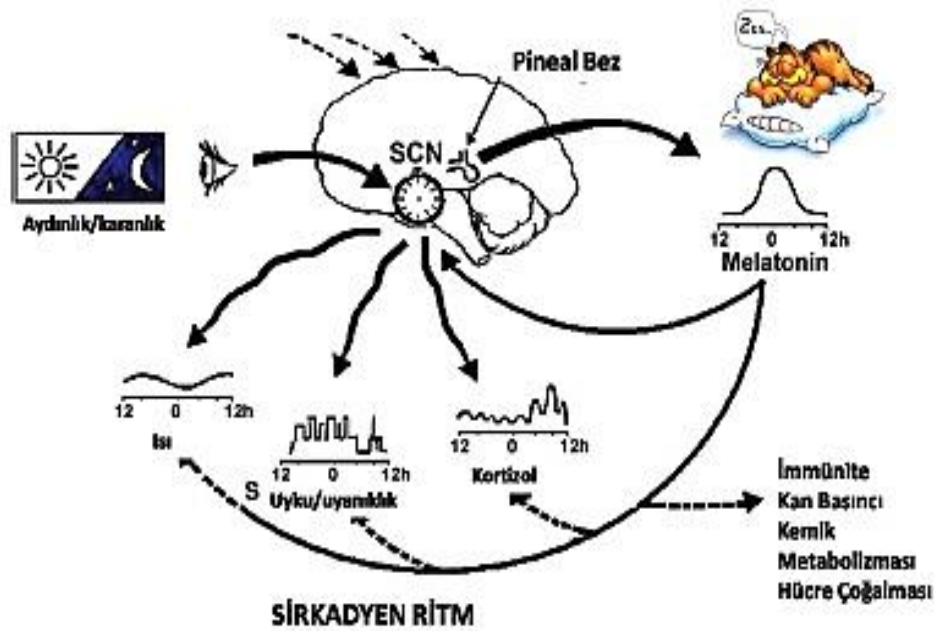
Şekil 2.9. Gram negatif bakterisinin hücre duvarında LPS ve TLR-4 ilişkisi görülmektedir. LBP:Lipid Bağlayıcı Protein, MD2: Myeloid Differentiation Factor-2 (Park ve Lee, 2013).

2.7.MELATONİN

2.7.1.Melatonin'in Tanımı ve Tarihçesi

Melatonin 1958 yılında dermatolog Lerner ve ekibi tarafından sığır pineal bezinden izole edildi (Reiter ve ark., 2007; Köse, 2004). Bu dönemde melatonin 'melanophore contracting hormon' olarak tanımlandı. Hem kurbağa derisindeki melanoforların beyaz görünümüne sebep olması hem de serotonininden türevlenmesi nedeniyle bu isim verilmiştir (Hardeland ve ark., 2006). Pineal bez M.Ö.3. yüzyılda Herophilus tarafından

tanımlandı. Yapısal olarak çam kozalağına benzeyen pineal bez beyin hemisferleri arasında, 3. ventrikülün arkasında yer alır. Melatonin, memelilerde başlıca pineal bezden ve ayrıca over, lens, deri, kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salınır (Hardeland ve Poeggeler, 2008). Retinadan salınan melatonin burada bulunan fotoreseptörlerde gece gündüz siklusuna karşı bir cevap oluşturur. Derideki fonksiyonu güneş ışınlarının zararlı radyasyon etkilerine karşı derindeki dokuların korunmasını, pigment granüllerinin değişimini sağlamaktır. Bu hormon ayrıca safrada okside olan kolesterol türevleri ve safra asiti ile safra mukozasında oluşacak oksidatif hasarı engeller (Rodriguez ve ark., 2004; Omurtag ve ark., 2008). Karanlıkta salgılanan bir indolamin olan melatonin, 232 kda molekül ağırlığına sahiptir. melatonin memelilerde hücre membranında yer alan melatonin reseptörleri vasıtasıyla ve ikincil bir taşıyıcı olarak ise G proteinleriyle birleşerek etkilerini gösterir (Reiter ve ark., 2007). Molekül boyutunun küçük olması ve yüksek lipofilik özelliği ile biyolojik membranlardan geçebilme kapasitesindedir. Bu şekilde tüm dokulara ve sıvılara dağılır (Şener, 2010). Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur. Son çalışmalar melatonin'nin nukleusta yüksek konsantrasyonda bulunduğunu göstermektedir. Melatonin'in esas ana görevi fotoperiyod ile ilgili bilgiyi vücudun fizyolojisine aktararak sirkadyen ritmi düzenlemektir. Bu görev tanımının içerisine uyku uyanıklık zamanlaması, kan basıncı düzenlemesi, mevsimsel zamanlama, üremenin mevsimsel zamanlaması da dahildir (Macchi ve Bruce, 2004). Melatonin sekresyonunun aydınlık/karanlık siklusu ile ilişkisi bu hormonun endojen bir senkronizör olarak işlev gördüğünü düşündürür (Schulz ve Steimer, 2009; Arendt ve Skene, 2005).



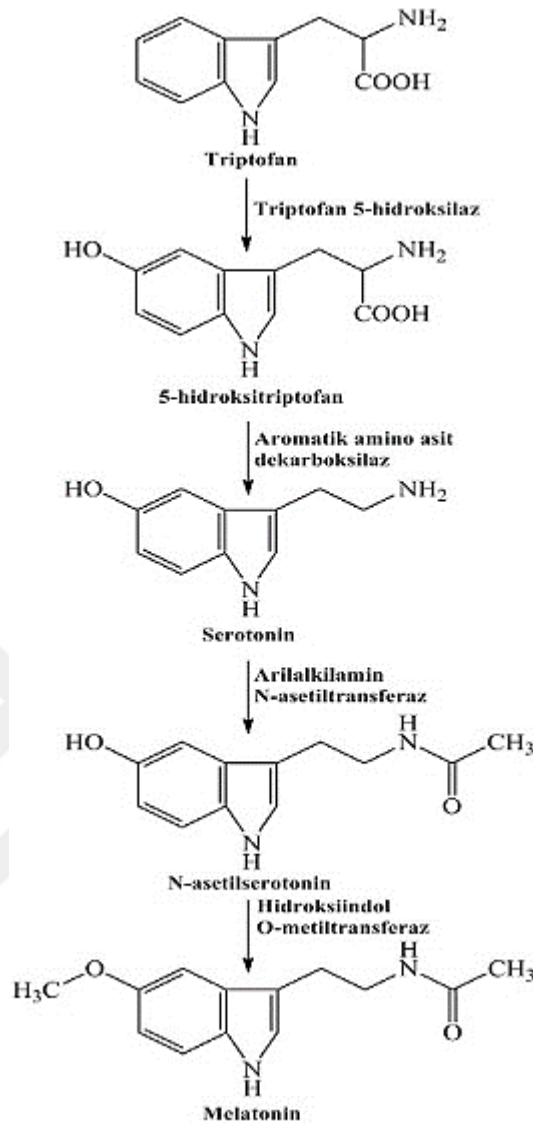
Şekil 2.10. Melatonin'in sirkadyen ritmi düzenlemedeki rolü gösterilmiştir (Şener, 2010).

Melatonin'in kronobiyolojik fonksiyonları ön planda olmasına rağmen antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, antiaging ve immun modülatör etkileri de dikkat çekmektedir (Şener, 2010). Son yıllarda bu hormonun serbest radikal süpürücülüğü yaparak oksidatif stresi engelleyebildiği kesinlik kazanmıştır. Oksidatif stresle olan mücadelede, öncelikle serbest radikalleri direkt olarak süpürücü özelliği, antioksidan enzimlerin sentezini indüklemesi, aktivitelerini artırabilmesi, mitokondriyal elektron transfer zincirinden elektron sızıntısını azaltması ve diğer antioksidan maddelerle sinerjik etkileşimi ön plana çıkar (López-Burillo ve ark., 2003). Üstelik melatonin serbest radikalleri süpürdüğünde antioksidan enzimlerin etkileri daha da açık bir şekilde gözlenebilir (Reiter ve ark., 2003). Melatonin'in mitokondriyal düzeyde etkisi hücrelerin apoptoza uğramalarını engeller (Leon ve ark., 2005; Reiter ve ark., 2007). Melatonin sağlıklı hücrelerde elektron transferini ve ATP üretimini artırdığı için elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyon üzerinde etkindir. Esasen apoptozise karşı hücreleri korumasında bu maddenin antioksidan içeriğindeki indolaminlerin serbest radikal süpürücü aktivitesi önem taşır. Dahası melatonin, tümör hücrelerinin ölümünü apoptoz yolu ile indükleyebilir (Jou ve ark., 2004; Reiter ve ark., 2007). Melatonin'in ayrıca ilaçlara bağlı oksidan hasara ve dolayısı ile yan etkilere karşı

korumada, kan hücreleri üzerinde kemoterapötik ilaçların olumsuz etkilerini engellemede, sepsis ve yanık hasarı ile iskemi gibi inflamasyon modellerinde nötrofil aktivasyonunun dokularda oluşturduğu oksidan hasarı azaltmada, serum kalsiyum yoğunluğunu arttırmada ve kemik kaybını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir. Bunların yanısıra yüksek kan basıncının neden olduğu kalp damar sisteminde oluşan oksidan hasarda ortaya çıkan serbest radikallerin etkilerini anlamlı oranda azalttığı da bildirilmiştir (Campese, 2010; Şener, 2010; Erdem ve ark., 2010).

2.7.2.Melatonin'in Biyosentezi, Salınımı ve Metabolizması

Melatonin'in (N-asetil-5-metoksitriptamin) biyosentezi triptofan amino asidinin kandan pineal beze alınması ile başlar. Triptofan aydınlıkta pinealositler tarafından 5-hidroksilaz enzimi vasıtasıyla 5-hidroksitriptofan'a çevirilir. 5-hidroksitriptofan'da, L-amino aromatik dekarboksilaz enzimi aracılığı ile serotonin'e dönüştürülür. Serotonin, N-asetiltransferaz enzimi ile N-asetilserotonini (NAT) oluşturur. Sonuç olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi ile N-asetil-5-metoksitriptamini yani melatonini meydana getirir (Roberts ve Fitzpatrick, 2013; Kuş ve Sarsilmaz, 2002).



Şekil 2.11. Melatonin hormonunun biyosentezi gösterilmiştir (Reiter, 1993; Bernard ve ark., 1999).

Yapılan deneysel çalışmalar, hayvanlarda NAT enzim aktivitesinin, yani melatonin'in kandaki seviyesinin karanlıkta pik yaptığını gösterir. Bu periyod pineal bezi inerve eden sempatik sinir liflerinin spontan aktivitesinin en yüksek olduğu saatleri kapsar. Kısa süreli ışığa maruziyette, sempatik aktivite baskılandığı için NAT enzim aktivitesi ve melatonin miktarı hızla düşer (Özgüner ve ark., 1995). Melatonin sentezinin düzenlenmesi karanlığa bağlıdır. Bu hormon pinealositlerden 29 mg/gün hızla salgılanmaktadır (Reiter ve ark., 1997). İnsanda plazma melatonin düzeyi 24 saatlik periyotta düzenli olarak iniş çıkış gösterir. Hormon düzeyi gece 20.00-23.00 arasında yükselir, 01.00-05.00 arası en yüksek değerine ulaşır ve sabah saatlerine doğru yavaşça

azalır. Sağlıklı kişilerde bu seviye gündüz 0-20 pg/ml iken, gece 20-200 pg/ml'dir. %80'i gece olmak üzere günde ortalama 30 mg melatonin üretilir (Şener, 2010). Vücutta depolanmayan melatonin kanda yaklaşık %70 oranında albümine bağlı halde bulunur. Karaciğerde 6-hidroksimelatonin sülfata dönüştürülerek idrarla atılır. Melatonin konsantrasyonu yaşa bağlı olarak değişir. İnsanda fetüste melatonin sentezine ilişkin herhangi bir bulgu yoktur. Melatonin anneden fetüse ya da süt ile yenidoğana geçebilir, fetüs ve yenidoğanda da bu şekilde sirkadyen ritm şekillenir. Yaşamın 3-5. yılları arası, melatonin salınımı pik seviyede devam eder ve sonra tekrar düşer. Daha sonra puberte ve adolesan dönemde sirkadyen hale gelir. Yirmili yaşlardan sonra melatonin'in sentez ve salgılanma hızı yavaşlayarak 60'lı yaşlarda en düşük seviyesine geriler (Reiter, 2003).

2.7.3. Melatonin'in MSS Üzerine Etkisi

Melatonin'in serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onu aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar ajan kılar. İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde melatonin'in yol açtığı blokaj bu ajana antiinflamatuvar etki sağlar. Yanık hasarı, sepsis, iskemi/ reperfüzyon gibi çeşitli inflamasyon modellerinde nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidatif hasarı melatoninini anlamlı olarak geri çevirir. Melatonin fizyolojik konsantrasyonlarda beyin ve beyincikte nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini baskılayarak nöral ve kardiyovasküler fonksiyonların fizyolojik düzenlenmesinde rol oynar. (Sener ve ark., 2003; Şener ve ark., 2005; Sener ve ark., 2002; Kaçmaz ve ark., 2005). Yaşlanma ile birlikte sinir sistemindeki gerileme nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Serbest radikallerin yaşlanma ile ilişkisi günümüzün en güncel konularındandır. Beyin dokusunun oksidatif hasara karşı oldukça duyarlı olması, yaşlanma ile birlikte gelişen oksidatif hasar ve inflamasyon, melatonin tedavisinin yaşa bağlı MSS fonksiyonlarındaki değişime karşı koruyucu olabileceğini düşündürür. Ayrıca yaşlı hayvanlarda yapılan çalışmalar melatonin'in nörogenezi artırdığını göstermiştir (Tresguerres ve ark., 2008). Nörodejeneratif hastalıklar beyinde yaygın bir hasar oluşmadan önce teşhis edilemez. Örneğin Parkinson hastalarına teşhis konulduğunda substantia nigradaki dopaminerjik nöronların %75'i yitirilmiştir. Melatonin salgısı yaşla ilişkili olarak azalma gösterdiği için nöronal apoptozisde artış kaçınılmazdır. Dolayısıyla orta yaşlardan itibaren melatonin ya da diğer antioksidan takviyesinin nöronal kayıp hızını azaltmasından yararlanılabilir. Diğer taraftan bu

hormonun lipofilik yapısı KBB'ni kolayca geçebildiği için MSS'de etkisini rahatça göstermektedir (Wang, 2009). Melatonin'in MSS üzerinde özellikle antiinflamatuvar etkileri olduğunu kanıtlayan birçok çalışma vardır. Sıçanlarda intravenöz melatonin uygulaması iskemi bölgesinde inflamatuvar yanıtları baskılar. Yine aynı çalışmada bu hormonun anti-inflamatuvar etkisine klinik iyileşme ve infarkt hacminde azalmanın eşlik ettiği bildirilmiştir. Travmatik beyin hasarında da melatonin hasarı azaltıp, bu etkisini de inflamatuvar yanıtları mTOR yolağı üzerinden baskılamasıyla gerçekleştirir. Melatonin'in metamfetamin uygulanan bir hücre kültürü çalışmasında artan proinflamatuvar sitokin salınımını baskıladığı ve bu hücrelerde oluşan metamfetamine bağlı hücre ölümünü de önlediği bildirilmiştir (Tocharus ve ark., 2010). Yapılan bir başka çalışmada melatonin'in subaraknoid kanamaya bağlı olarak beyinde oluşan oksidatif hasarı önlediği ve nörolojik skorları düzelttiği, KBB'ni koruduğu gösterilmiştir (Erşahin ve ark., 2009). Cagnoli ve arkadaşlarının yaptığı invitro bir çalışmada singlet oksijenin ($O_2^{\cdot -}$) oluşturduğu nörotoksik etkilerin melatonin ile ortadan kalktığı anlaşılmıştır. Yeni doğmuş kobaylarda beyin granüler hücreleri üzerinde ışığa duyarlı bir boya ile bu reaktif molekülün oluşması sağlanıp, üzerine melatonin ilave edildiğinde hem nöronal apoptozisin hemde keratin kinaz inhibisyonunun engellendiği görülmüştür (Cagnoli ve ark., 1995). Gerçekleştirilen farklı bir çalışmada insan nöroblastoma kanser hücrelerinde melatonin'in apoptozisi uyardığı bildirilmiştir (García-Santos ve ark., 2006). Ayrıca MSS'de apoptotik hücre ölümünü engellemesine ilaveten, periferik aksotomi sonrası gerçekleşen nöron ölümünü de azalttığı rapor edilmiştir (Odaci ve Kaplan, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneyisel Prosedür

“Endotokseminin neden olduğu KBB hasarı üzerine melatonin’in koruyucu etkisi” konulu ve 2018/131 no’lu bu çalışma 28.06.2018 tarihinde gerçekleştirilen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Toplantısı’nda değerlendirilip onanmıştır. 11.2018/25 no’lu bu proje Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

3.1.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneyisel ve Klinik Araştırma Merkezinde yetiştirilen 42 adet, 150-250 gr ağırlığında, 4-6 aylık Spraque-Dawley türü, dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar deney süresi boyunca uygun koşullar (22 ± 2 °C, 12 saat aydınlık/karanlık) altında bakım odalarında korundu. Sıçanlar normal pellet cinsi yem ve su ile serbest beslendi ve deney aşamasına kadar mümkün olduğu kadar stressiz bir ortamda barınmaları sağlandı. Çalışmada kullanılan denekler rastgele 4 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol grubu, LPS grubu, LPS+melatonin grubu ve melatonin grubu olarak belirlendi. Deneydeki endotoksemi oluşturulacak gruba LPS, serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek 7,5 mg/kg kadar tek doz halinde intraperitoneal olarak (i.p.) verildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Deney gruplarının dağılımı

Deney Grupları	Grup Başına Düşen Denek sayısı	Uygulama Yöntemi
Kontrol	(n=8)	Kontrol grubu,
LPS	(n=13)	tek doz 7,5 mg/kg LPS (i.p.) uygulanan sıçanlar,
LPS+melatonin	(n=13)	tek doz 7,5 mg/kg LPS (i.p.) + 10 mg/kg/gün melatonin (i.p.)
melatonin	(n=8)	10mg/kg/gün melatonin (i.p.)

Tablo 3.2. Deneysel çalışma takvimi

Deney Grupları	1G	2G	3G	4G	5G	6G	7G	8G	9G
Kontrol	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SKRF
LPS	-	-	-	-	-	-	-	LPS	SKRF
LPS+melatonin	Mel	Mel	Mel	Mel	Mel	Mel	Mel	LPS	SKRF
melatonin	Mel	Mel	Mel	Mel	Mel	Mel	Mel	Mel	SKRF

(G:Gün, SF:Serum Fizyolojik, LPS:lipopolisakkarit, Mel:Melatonin, SKRF:Sakrifikasyon)

3.1.2.Deneyde Kullanılan Maddeler ve Uygulama

Çalışmada uygulanan bütün maddelerin dozu literatürler doğrultusunda belirlendi. (Zhou ve ark., 2014; Chern ve ark., 2012; Iraz ve ark., 2015). Deneydeki endotoksemi oluşturulacak gruba uygulanan LPS (*Escherichia coli* -serotype O111:B4; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) belirli bir *E.coli* suşundan seçildi. LPS'in uygulama dozu ve şekli, kullanılan *E.coli* suşu ile uyumlu olacak şekilde belirlendi. Deneysel çalışmalarda farklı dozlarda ve sürelerde uygulanabilen melatonin (M 5250; Sigma, St Louis, MO, USA); bu çalışmada LPS+melatonin ve melatonin grubuna ait sıçanlara sabit bir dozda verildi (Esrefoğlu ve ark., 2005). LPS ve melatonin kimyasalları Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edildi.

Kontrol grubuna diğer gruplarla aynı hacimde olacak şekilde yani 1 ml kadar sadece i.p. SF verildi. LPS grubuna tek doz (7,5 mg/kg) LPS i.p. olarak uygulandı (Iraz ve ark., 2015). LPS+melatonin grubuna melatonin enjeksiyonu, LPS uygulamasından 1 hafta önce başlandı. Melatonin saf etanol içinde çözülüp, SF ile seyreltilerek %1'lik konsantrasyona getirilmesini takiben 1 hafta boyunca 10 mg/kg dozda i.p. uygulandı

(Esrefoglu ve ark., 2005; Zhou ve ark., 2014; Chern ve ark., 2012). Yalnızca melatonin uygulanan gruba da hazırlanan melatonin aynı süre ve dozda verildi. Deney süresi ile ilgili çalışma takvimi Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Deney sonunda sıçanlar ketamine hydrochloride (50 mg/kg i.p) ve %2 ksilazine hydrochloride (10 mg/kg i.p) anestezisi altında dekapite edilerek beyin dokuları eksize edildi. Dekapite edilen sıçanlardan alınan beyinlerin sağ lobu histolojik incelemeler için %10’luk tamponlanmış nötral formaldehit içine alınırken, sol loblar biyokimyasal incelemeler için kullanıldı. Biyokimyasal analiz için alınan beyin dokuları -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.Histopatolojik Analizler

3.2.1.Doku takibi ve Gömme

Formaldehit içinde fikse edilen dokular, doku takip cihazı (Leica ASP300S, Illinois, USA) içerisinde yoğunlukları giderek artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilip, ksilol ile şeffaflaştırıldı. Bu işlemlerin ardından doku gömme cihazı (Leica EG1160 Illinois, USA) ile parafin içerisine gömülerek parafin bloklar elde edildi (Tablo 3.3). Parafin bloklardan bir mikrotom (Leica RM2245, Illinois, USA) yardımı ile alınan 5-6 µm’lik kesitler polilizin kaplı lamlara alındı. Bu lamlara standart histolojik yöntemler uygulanarak ksilol ile parafin uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitlere hematoksilen-eozin (H&E) (Tablo 3.4), Masson-trikrom (MT) (Tablo 3.5) ve kresyl violet (KV) (Tablo 3.5) metodları uygulandı. Tüm deney gruplarından elde edilen beyin kesitlerine ZO-1, okludin ve TLR-4 immunohistokimyasal boyama metodları uygulandı. Hazırlanan örnekler ışık mikroskobu (Nikon Eclipse i5 ışık mikroskobu; Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan) ile incelenip ardından fotoğraflandı (Nikon NIS Elements version 4.0 görüntüleme analiz sistemi; Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan).

Tablo 3.3. Doku takip metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%10 Formaldehit	72 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	1 gece	9	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	13	Eriyik parafın (60°C)	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

3.2.2.Hematoksilen-Eosin (H&E) Boyama Metodu

Her bir deneğe ait beyin dokusundan hazırlanan 5-6 µm'lik kesitler boyama öncesinde 1 gece kadar 60°C'lik etüvde bekletildi ve ardından H&E boyama metodu uygulandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Hematoksilen-Eosin (H&E) Boyama Metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 gece	13	Akarsu	5 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	14	Eozin	3-5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	15	Akarsu	5 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	16	%50 Alkol	2 dakika
5	Absolü Alkol I	20 dakika	17	%70 Alkol	2 dakika
6	Absolü Alkol II	20 dakika	18	%80 Alkol	2 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika	19	%96 Alkol	2 dakika
8	%80 Alkol	20 dakika	20	Absolü Alkol I	20 dakika
9	%70 Alkol	20 dakika	21	Absolü Alkol II	20 dakika
10	%50 Alkol	20 dakika	22	Ksilen I	20 dakika
11	Akarsu	5 dakika	23	Ksilen II	20 dakika
12	Hemotoksilen	5-8 dakika	24	Kapatma	

3.2.3. Masson Trikrom (MT) Boyama Metodu

Çalışmanın beyin dokusundan hazırlanan 5-6 μm 'lik kesitler boyama öncesinde 1 gece kadar 60 $^{\circ}\text{C}$ 'lik etüvde bekletildi ve ardından MT boyama metodu uygulandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Masson Trikrom Boyama Metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 $^{\circ}\text{C}$)	1 gece	17	Distile Su	5 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	18	Fosfomolibdik asit	5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	19	Anilin Blue Solüsyonu	2-5 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	20	Distile Su	5 dakika
5	Absolü Alkol I	20 dakika	21	%1'lik asetik asit	2 dakika
6	Absolü Alkol II	20 dakika	22	Distile Su	5 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika	23	%50 Alkol	2 dakika
8	%80 Alkol	20 dakika	24	%70 Alkol	2 dakika
9	%70 Alkol	20 dakika	25	%80 Alkol	2 dakika
10	%50 Alkol	20 dakika	26	%96 Alkol	2 dakika
11	Akarsu	5 dakika	27	Absolü Alkol I	20 dakika
12	Hemotoksilen	5-8 dakika	28	Absolü Alkol II	20 dakika
13	Akarsu	5 dakika	29	Ksilen I	20 dakika
14	Asit Alkol	30 saniye	30	Ksilen II	20 dakika
15	Akarsu	5 dakika	31	Ksilen II	20 dakika
16	Asit Fuksin	1-2 dakika	32	Kapatma	

3.2.4. Kresyl violet (KV) Boyama Metodu

Bu boyama yöntemi beyin dokusunda sağlam nöronları analiz etmeye yönelik bir teknik olup, Nissl boyaması olarak da bilinmektedir. Bu yöntem ile nöron morfolojisinde görülen değişiklikler deney grupları arasında karşılaştırıldı. Beyin dokusuna ait parafin bloklardan hazırlanan 5-6 μm 'lik kesitler boyama öncesinde 1 gece kadar 60 $^{\circ}\text{C}$ 'lik etüvde bekletildi, ardından KV boyama metodu uygulandı (Tablo 3.6).

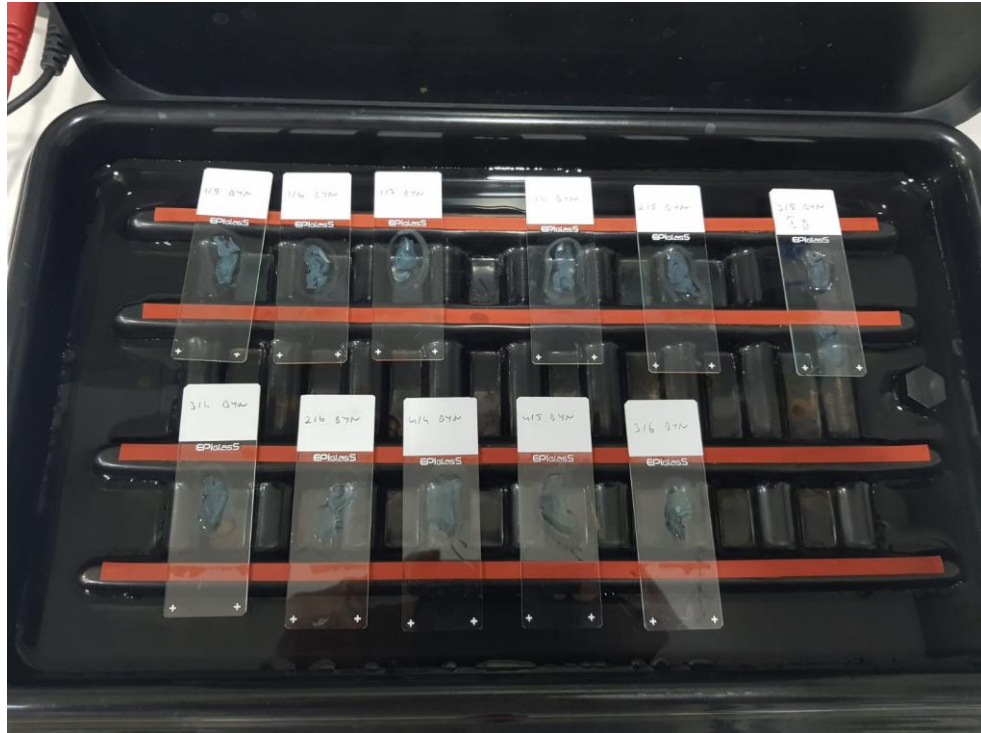
Tablo 3.6. Kresyl Violet Boyama Metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 gece	10	% 0,1'lik Kresyl Violet	12 dakika
2	Ksilen I	10 dakika	11	Distile Su	30 saniye
3	Ksilen II	10 dakika	12	%96 Alkol	30 saniye
4	Absolü Alkol I	5 dakika	13	Absolü Alkol I	30 saniye
5	Absolü Alkol II	5 dakika	14	Absolü Alkol II	30 saniye
6	%96 Alkol	3 dakika	15	Ksilen I	5 dakika
7	%70 Alkol	3 dakika	16	Ksilen II	5 dakika
8	Akarsu	1 dk	17	Kapama	
9	Distile Su	30 saniye	18		

3.3.İmmünohistokimyasal Boyama Metodu

Deney gruplarına ait sıçanların beyin dokularında ZO-1, okludin ve TLR-4 proteinlerinin ifadesini belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler 1 gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi. Deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 10'ar dakika ksilende bırakıldıktan sonra sırasıyla %100'lük, %96'lık, %80'lik ve %70'lik alkol serilerinden 4'er dakika geçirildi. Ardından 2 kez 2'ser dakika distile sudan (dH₂O) geçirilerek alkol uzaklaştırıldı. Ardından 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulandı ve endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Lamlar 2 kez 5'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH: 7.4) ile yıkandı. Kesitler doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında sitrat tamponuna etkin bırakıldı ve oda sıcaklığında soğutuldu. Daha sonraki aşamalarda immünohistokimya boyama kiti (İnvitrogen, Histostain ®-Plus 3rd Gen IHC Detection Kit, California, USA) kullanılarak prosedür takip edildi. Lamlar 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak amacıyla oda sıcaklığında 10 dakika blok serum uygulandı (Şekil 3.1). Hemen ardından kesitler yıkama işlemi yapılmadan ZO-1 primer antikoru (1:500) (Millipore cat. MABT339, Massachusetts, USA), okludin primer antikoru (1:50) (Thermo Fischer cat.71-1500, Massachusetts, USA) veya TLR-4 primer antikoru (1:50) (Santa Cruz

Biotechnology cat. sc-293072, Oregon, USA) +4 °C 'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Negatif kontrol için, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Ertesi gün kesitler 2 kere 5'er dakika PBS'de yıkandıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikorda (Histostain-Plus 3rd Gen IHC Detection Kit, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 20 dakika bekletildikten sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra streptoavidin peroksidazda (Histostain-Plus 3rd Gen IHC Detection Kit, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) 10 dk inkübe edilip tekrar PBS ile yıkandı. Ardından DAB kromojende (Invitrogen, Histostain ®-Plus 3rd Gen IHC Detection Kit, California, USA) 5 dk bekletilip 2 kez 3'er dakika dH₂O ile yıkandı. 45 saniye kadar Gill Hematoksilen ile zıt boyanan kesitler musluk suyunda çalkalanıp dH₂O içine alındı. Artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma solüsyonu (Histomount Mounting Solution, Thermo Fischer Scientific Massachusetts, USA) ile kapatılarak ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) altında incelendi. Her bir sıçana ait beyin dokusunun korteks alanından rastgele 10 ayrı bölgeden X20'de mikroskobik fotoğraflar çekildi. ZO-1, okludin ve TLR-4 immünreaktivite yoğunlukları Image J software programı (Image J; National Institute of Health) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar kaydedildi.



Şekil 3.1. Beyin kesitlerine ait preparatların immünohistokimyasal boyama esnasında nem kamerası içerisindeki görünümü.

3.4. Western Blot Metodu

3.4.1. Protein İzolasyonu

Deney esnasında alınan ve -80°C 'de tutulan beyin dokuları analiz öncesinde kuru buz üzerine çıkarıldı. Donmuş doku örnekleri küçük parçalara ayrılıp hassas terazide ağırlıkları ölçüldü. Proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı ilave edilmiş olan ripa tampon çözeltisi (RIPA Lysis Buffer System, sc-24948, Santa Cruz, Oregon, USA) -20°C ' den oda sıcaklığına çıkarıldı. 100 mg dokuya 300 μl ripa eklenecek şekilde hesaplamalar yapıldı ve dokuların üzerine eklendi. 8-10 adet paslanmaz çelik boncuklar yani homojenizasyon beadleri ilave edilerek Bezmialem Vakıf Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvarında bulunan homojenizatörde (FastPrep-24, MP Biomedicals, USA) 15-20 sn lizis işlemi yapıldı. Dokular lizis işleminin ardından 20 dk kadar buz üstünde bekletildi. Sonrasında santrifüj cihazında (Beckman Coulter, Allegra X-30R, California, USA) $+4^{\circ}\text{C}$ 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Proteinlerin çözündüğü supernatantlar alındı. Daha sonra -80°C 'ye kaldırılmak üzere ependorflara stok ve alikotlama işlemi yapıldı.

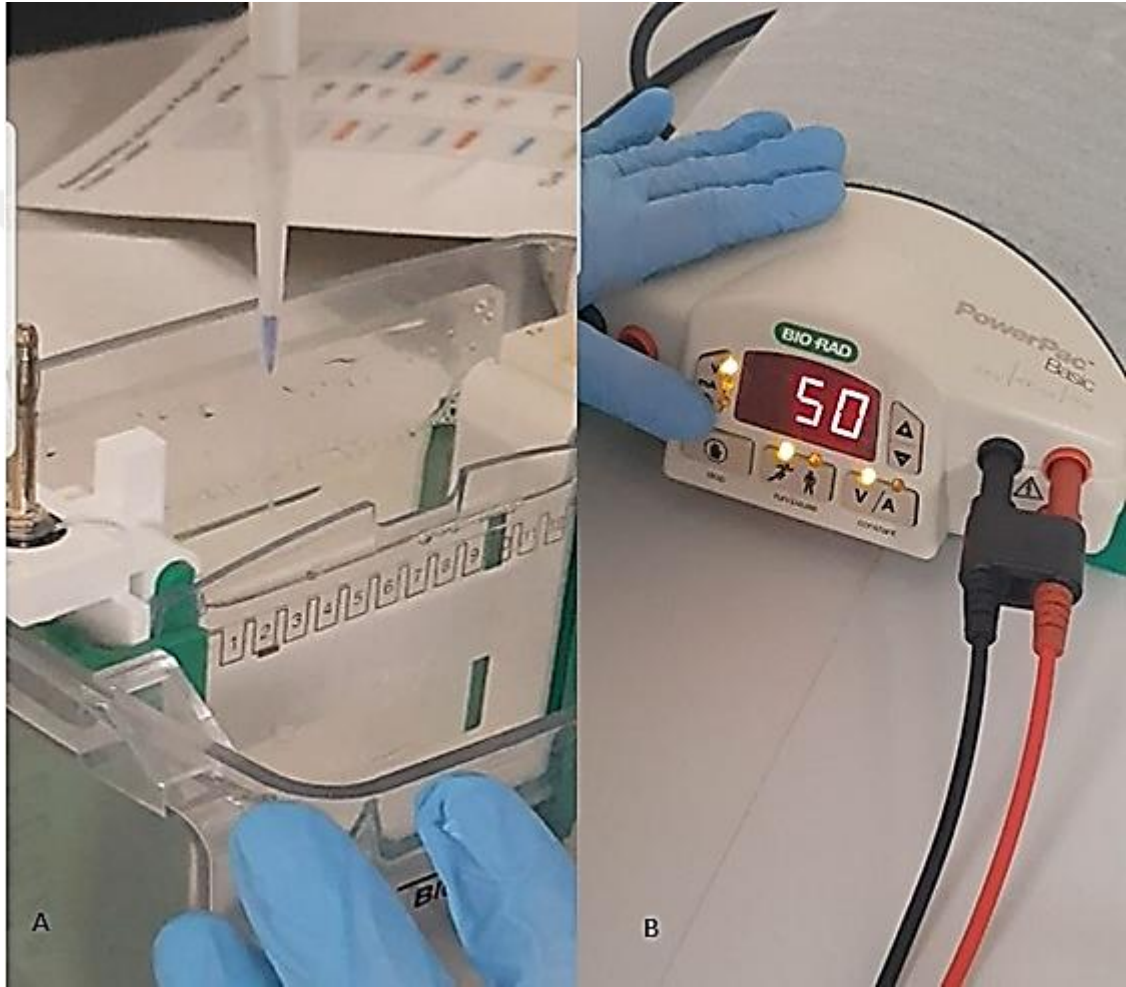
3.4.2. Protein Konsantrasyonlarının Ölçümü

Konsantrasyon ölçümü için (Thermo Scientific, Pierce™ BCA Protein Assay Kit Cat. no;23227, Massachusetts, USA) kiti üretici firmanın talimatlarına göre kullanıldı. Öncelikle yeni ependorflara protein örnekleri eklenerek 1:10 oranında Lizis buffer ile seyreltildi. Ayrıca çalışma solüsyonu Reagent A: Reagent B 50:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara hazırlanan protein standartlarından ve seyreltilen protein karışımı ilave edildi. Üzerlerine 200 μl çalışma solüsyonu (Working solution: Reaction Buffer A: Reaction Buffer B 50:1) eklenerek 30 sn kadar çalkalandı. Plaka kapağı kapatılarak 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından oda ısısında soğutularak mikropate okuma cihazıyla (Thermo Scientific™ Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer 60, Massachusetts, USA) 562 nm'de ölçüm yapıldı ve konsantrasyonlar hesaplandı.

3.4.3. Protein Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez

Biorad marka (Mini-Protean ® TGX Precast Gels Cat no; 456-1035, USA) hazır jel aparata oturtularak western tankına yerleştirildi. Yürütme solüsyonu (Biorad Running Buffer Cat no; 1610732, USA) 1:10 oranında dH_2O ile 600 ml hazırlandı ve tank

içerisinde belirli bir seviyeye kadar dolduruldu. Kuyucuklar marker ve proteinler yüklenmeden önce hazırlanan bu solüsyon ile yıkandı. İnce uçlu özel mikropipetlerle kuyucuklara 18 μ l protein ve 3,5 μ l marker yüklemesi yapıldı. Bütün bu işlemlerin ardından güç kaynağına bağlanarak Biorad marka Power Pac Basic cihazında gerekli olan voltaj ayarlandı. Öncelikle 50 volt'a ayarlanarak 10 dakika, sonrasında da 150 volt'da yürütme tamamlandı.



Şekil 3.2. A. Özel uçlu mikropipetlerle kuyucuklara protein yüklemesi **B.** Yüklemenin tamamlanmasıyla belirlenen voltajda yürütme işleminin gerçekleşmesi.

3.4.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Jelde yer alan proteinlerin PVDF (Poli-viniliden florür) membrana transferi için her aşamada Biorad marka Transfer Kiti (Biorad Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, PVDF Midi Cat No; 170-4273, USA) kullanıldı. Yürütülen jel tankın içerisinden çıkarılarak dH_2O 'da bekletildi. Aynı anda PVDF membranlar 2 dk kadar metanole

bırakıldı, metanolden alınıp filtre kâğıdı desteleriyle birlikte transfer solüsyonunda 3 dk ısıtıldı. Transfer tepsisine sırayla filtre kâğıdı destesi, membran, jel, filtre kâğıdı destesi olmak üzere üst üste sandviç yapıldı. Üstünden rulo ile geçilerek tepsinin kapağı kilitlendi. Yarı kuru Trans-Blot Turbo cihazına sandviçin olduğu kaset yerleştirildi. 10 dakika 1,3 Amper, 25 Volt’da transfer edildi.

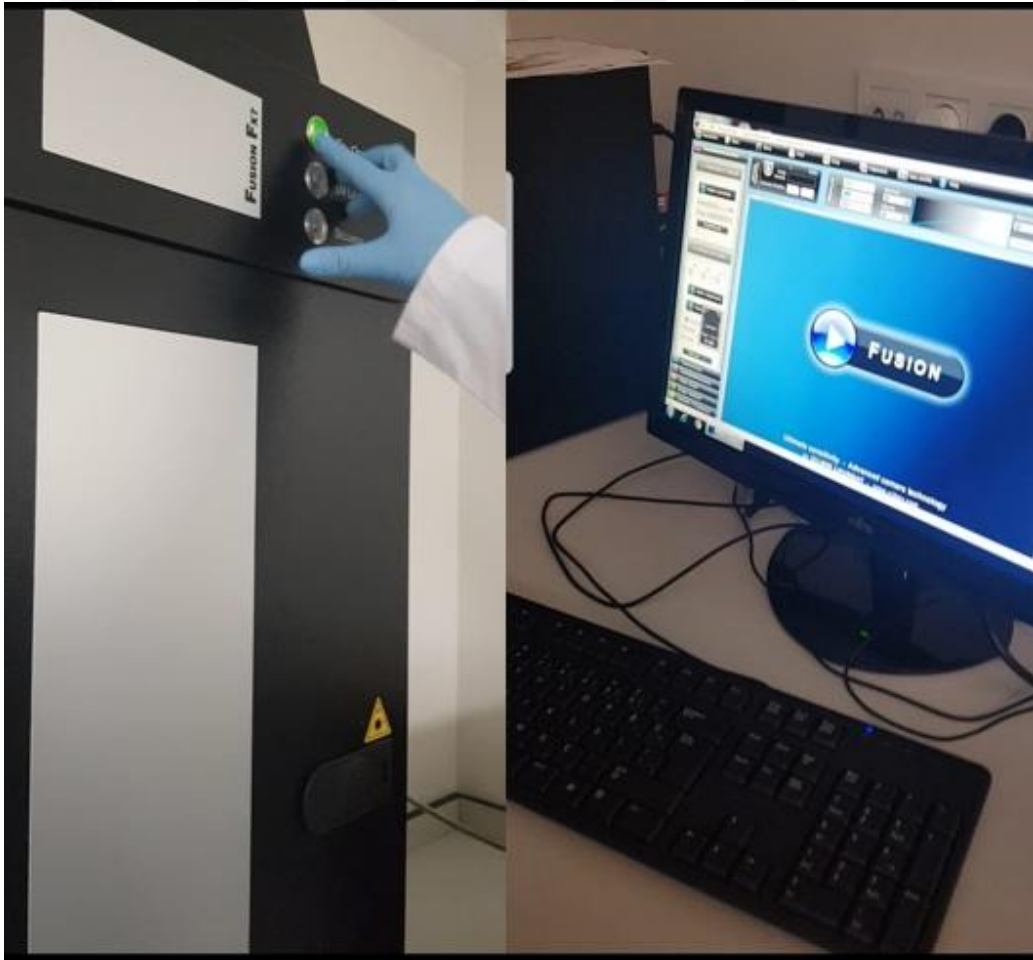


Şekil 3.3. Proteinlerin jelden membrana transfer aşaması.

3.4.5. Antikor İnkübasyonu ve Membran Proteinlerinin Görüntülenmesi

Transfer işleminin ardından membran 5 dk TBST (137 mM NaCl, 20 mM Tris, %0,1 Tween-20) ile orbit çalkalayıcı da yıkandı. TBST içinde çözülmüş %5’lik süt tozu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bloklama işlemi yapıldı. Bu aşamadan sonra membranlar aranan antikora uygun bir şekilde kesildi. %5 süt tozu içeren TBST içinde çözünen primer antikorlar 1: 1000 oranında 5 ml süt tozunda dilüe edilerek ZO-1

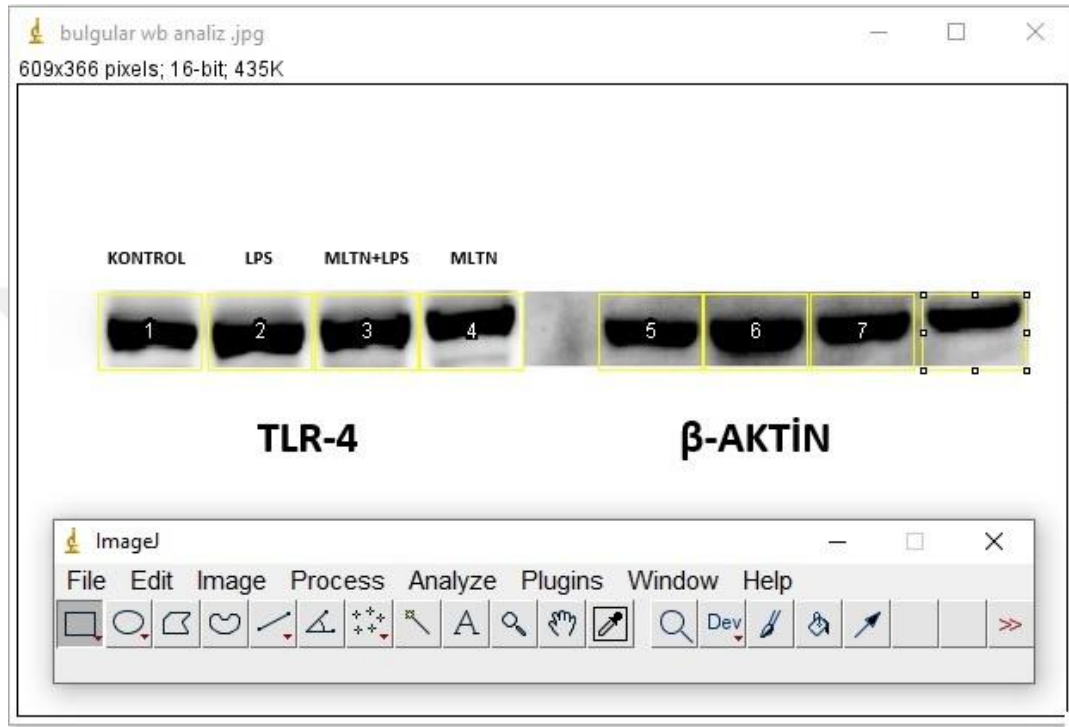
primer antikor, okludin primer antikor ve TLR-4 primer antikor için ayrı ayrı 1 gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Ertesi sabah 3 kez 5'er dk TBST ile yıkandı. Primer antikorlar daha sonra tekrar kullanılmak üzere 15 ml'lik falkon tüpüne alındı ve -20°C 'ye kaldırıldı. Yıkama işleminin ardından membranlar, 5 ml kadar 5% süt tozu içeren TBST'de çözünen HRP bağlı sekonder antikorlar (anti-rabbit 1:5000, Advansta; anti-mouse 1:5000, Advansta, California, USA) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Sekonder antikor uygulamasının sonunda membranlar 3 kez 5'er dk TBST ile yıkandı. Görüntüleme aşamasında ECL Western görüntüleme solüsyonu (Western Bright Sirius K-12043-D10, Advansta, California, USA) kullanıldı. 1 ml distile su içerisinde 500 μl ECL solüsyonu A ve 500 μl ECL solüsyonu B karışımı karıştırılarak muamele edildi ve membran görüntüleri alındı.



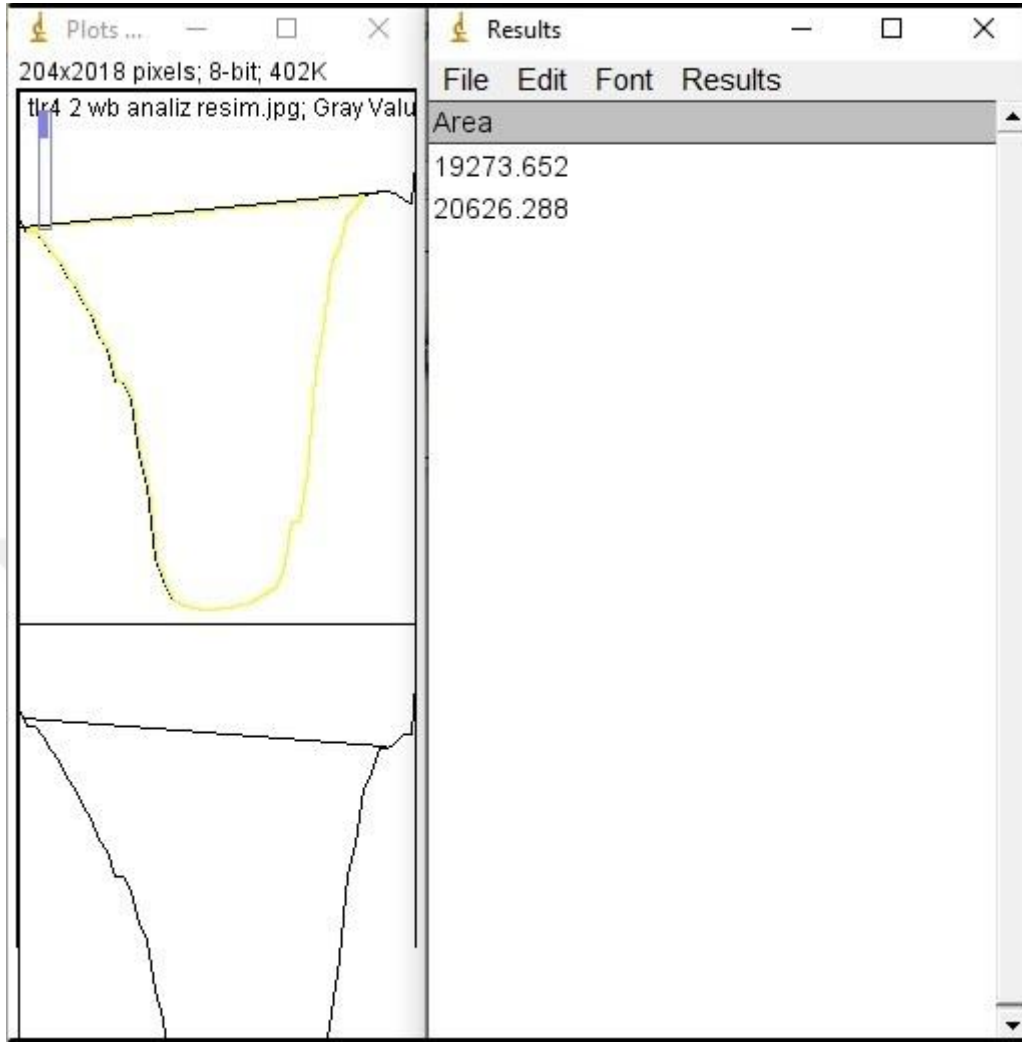
Şekil 3.4. Membran proteinlerinin görüntülenmesinde kullanılan görüntüleme kabini ve görüntüleme sistemi.

3.4.6. Protein Görüntülerinin Analizlenmesi

Elde edilen jel görüntüleri Image J software programı ile analiz edildi. Deney gruplarındaki protein miktarını tayin etmeye yönelik bir yöntem olan Western Blot ile ölçüm birbirinden bağımsız olarak 3 tekrarla gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. Western Blot Image J Analizleme yöntemine göre bant yoğunluğunun ölçülmesindeki ilk basamak. Deney gruplarındaki TLR-4 protein miktarının β-Aktine göre değerlendirilmesi.



Şekil 3.6. Western Blot Image J Analizleme yöntemine göre bant yoğunluğunun alansal hesabının değerlendirilmesi.

3.5. ELISA Metodu

Biyokimyasal analizler için -80°C 'ye kaldırılan beyin dokuları doku homojenatı hazırlığı için PBS (0,01M, pH: 7.4) içerisine alındı ve homojenize edildi. Homojenize edilen her örnek -20°C 'de muhafaza edildi. Ardından oda sıcaklığına alınarak çözülmesi sağlandı. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve 10000x rpm'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerden süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatantlarda Malondialdehit (MDA) seviyesi yanı sıra, antioksidan seviyesini belirlemek için Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri tayin edildi. Ayrıca, inflamasyon göstergelerinden Dönüştürücü Büyüme Faktör-Beta (TGF- β), Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- α), İnterlökin 1-beta (IL-1 β), Nüklear Faktör-Kappa Beta (NF- κ B) değerleri de yine ELISA metodu ile belirlendi.

3.5.1. MDA, SOD, CAT, GSH-Px Tayini

MDA tayininin temel prensibi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek belirli bir absorbansta pembe renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır. MDA seviyesi tayininde üretici firmadan temin edilen ELISA kiti (Rat MDA ELISA Kit, Sunred Biological Technology, Catalog no:201-11-0157, Shanghai, China) kullanıldı. Kite yer alan 96'lık plaka içerisindeki her bir kuyucuğa 50 µl standart ve 40 µl örnekler yüklendi. Standartların yer aldığı kuyucuklar hariç her bir kuyucuğun üzerine 10 µl Biotin-(MDA) Ab ilave edildi. Ardından 50 µl HRP konjugete eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda plaka alınarak otomatik yıkama cihazında aspire edildi. Daha sonra yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Tüm örneklerin üzerine 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B ilave edildi. 10 dakika 37 °C'de tekrar inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 50 µl stop solüsyonu eklendi ve Mikroplate okuyucu (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) ile 450 nm'de okuma işlemi yapıldı. SOD (Rat SOD ELISA Kit, Sunred Biological Technology, Catalog no:201-11-0169, Shanghai, China), CAT (Rat CAT ELISA Kit, Sunred Biological Technology, Catalog no:201-11-5106, Shanghai, China), GSH-Px (Rat GSH-Px ELISA Kit, Sunred Biological Technology, Catalog no:201-11-5104, Shanghai, China) seviyeleri için ayrı kitler kullanılarak sabit basamaklar izlendi. Kite yer alan 96'lık plaka içerisindeki her bir kuyucuğa 50 µl standart ve 40 µl kadar da örnekler yüklendi. Standartların yer aldığı kuyucuklar hariç her bir kuyucuğun üzerine 10 µl Biotinli belirleyici Ab ilave edildi. Ardından 50 µl HRP eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda plaka alınarak otomatik yıkama cihazında aspire edildi. Daha sonra yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Tüm örneklerin üzerine 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B ilave edildi. 10 dakika 37 °C'de tekrar inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 50 µl stop solüsyonu eklendi ve Mikroplate okuyucu (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) ile 450 nm'de okuma işlemi yapıldı.

3.5.2. TGF-β, TNF-α, IL-1β, NF-κB Tayini

TGF-β (Rat TGF-β ELISA Kit, Sunred Biological Technology Catalog no:201-11-0779, Shanghai, China), TNF-α (Rat TNF-α ELISA Kit, Sunred Biological Technology Catalog no:201-11-0765, Shanghai, China), IL-1β (Rat IL-1β ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, Catalog no: E0119Ra, Shanghai, China) ve NF-κB (Rat NF-κB

ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, Catalog no: E0287Ra, Shanghai, China) belirteçleri için uygun ELISA kitleri kullanıldı. Kitde yer alan 96'lık plaka içerisindeki her bir kuyucuğa 50 µl standart ve 40 µl kadar da örnekler yüklendi. Standartların yer aldığı kuyucuklar hariç her bir kuyucuğun üzerine 10 µl Biotinli belirleyici Ab ilave edildi. Ardından 50 µl HRP eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda plate alınarak otomatik yıkama cihazında aspire edildi. Daha sonra yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Tüm örneklerin üzerine 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B ilave edildi. 10 dakika 37 °C'de tekrar inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 50 µl stop solüsyonu eklendi ve Mikroplate okuyucu ile 450 nm'de okuma işlemi yapıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Mikroplate okuyucu ile ölçüm aşamasında bulunan 96'lık plaka.

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin dağılımını belirlemek için Shapiro-wilk testi kullanıldı. İki'den fazla gruplararası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Grup karşılaştırmaları sonucunda anlamlı çıkan değişkenlerin post-hoc karşılaştırmaları One Way Anova testi için Bonferroni, Kruskal Wallis testi için Dunn

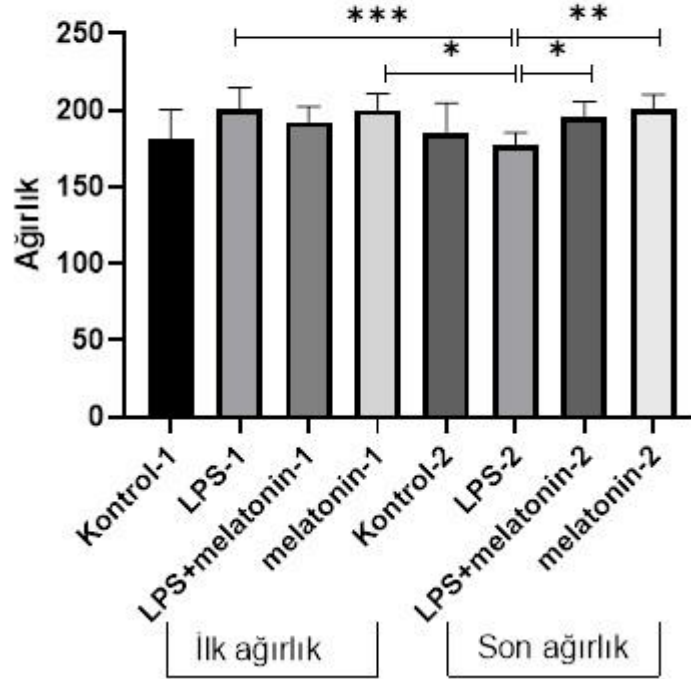
testi ile yapıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri; ortalama $\pm$ standart sapma, med (min-max) olarak açıklandı. Tüm istatistiksel analizler “Graph Pad Prism Version 8.1” istatistik yazılım programı aracılığıyla gerçekleştirildi. $P<0,05$ olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4.BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığına Ait Bulgular

Çalışmada uygulanan LPS ile ilişkili olarak sıçanlarda, LPS ve LPS+melatonin grubunda 1'er hayvan ölümü gerçekleşmiştir ve 40 adet sıçan ile deney sonlandırılmıştır. Çalışmamızda tüm gruplardaki sıçanların vücut ağırlıkları deneye başlamadan önce ve deney tamamlandıktan sonra ölçüldü. Deney gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıklarının karşılaştırması Şekil 4.1'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda LPS grubu vücut ağırlığının deney sonunda, ilk ağırlığa göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($P<0.001$). Gruplar deney sonrasında son ağırlıklar açısından karşılaştırıldığında, koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubunda sadece LPS uygulanan gruba göre vücut ağırlığının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($P<0.05$). Deney sonunda sadece melatonin verilen gruba ait sıçanların ağırlıkları LPS grubuna göre istatistiksel olarak daha fazlaydı ($P<0.01$).

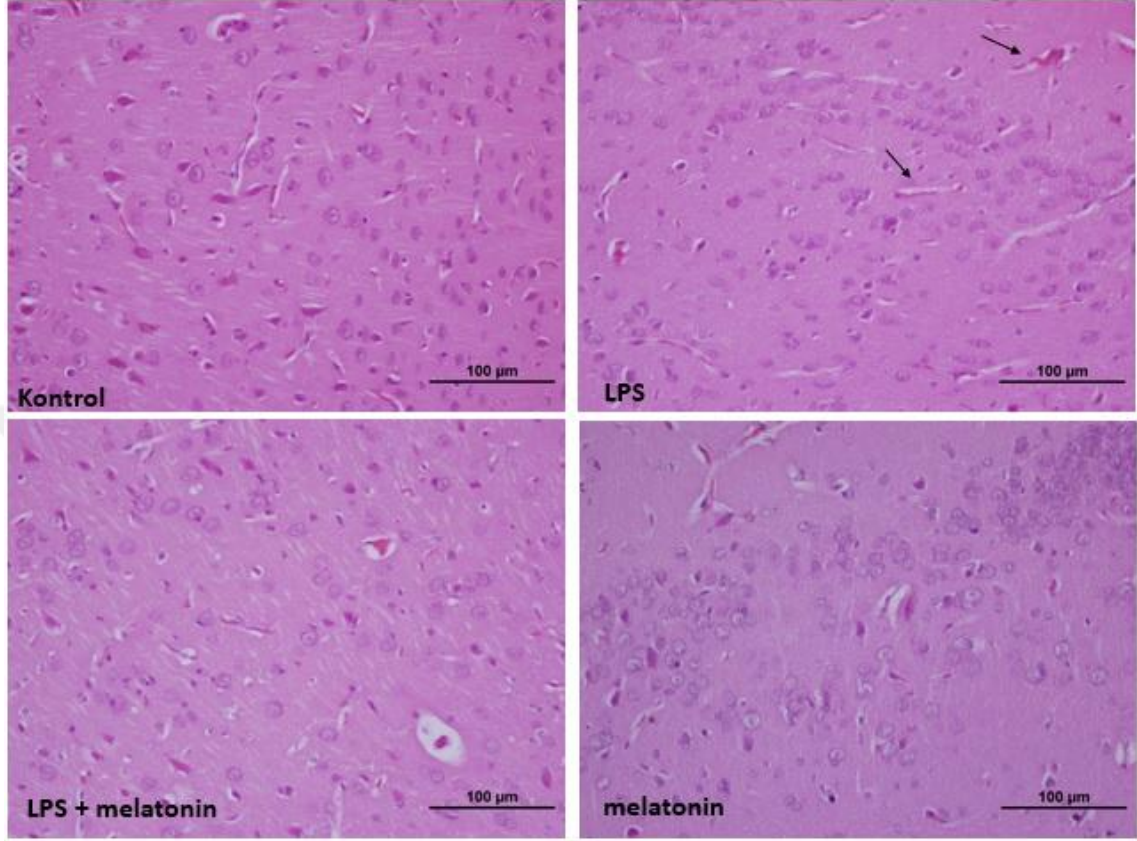


Şekil 4.1. Çalışma öncesi ve sonrasında tüm gruplara ait sıçanların vücut ağırlıklarının karşılaştırması. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

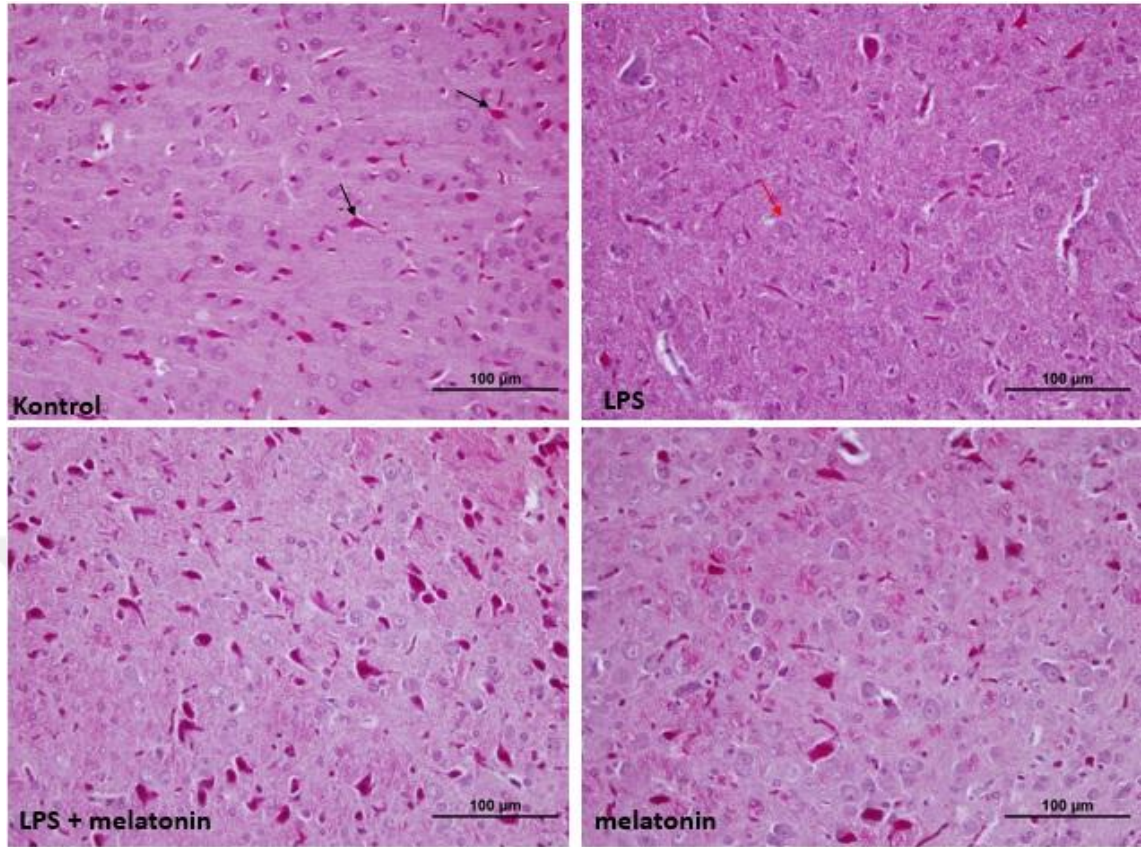
Çalışmamızda, deney gruplarının beyin dokusunun korteks alanına ait histolojik özellikleri değerlendirebilmek için H&E (Şekil 4.2) ve MT (Şekil 4.3) metodları uygulandı. Ayrıca sağlam nöronları değerlendirebilmek amacıyla da KV boyaması yapıldı (Şekil 4.4). Çalışmada deney gruplarından elde edilen beyin doku örneklerinde LPS'in neden olduğu morfolojik ve hücrel değişim etkileri H&E boyama yöntemi ile incelendi (Şekil 4.2). Bu incelemede tüm gruplardaki örnekler sinir hücre morfolojisi ve vasküler konjesyon bakımından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, kontrol sıçanları beyinlerinde korteks alanında normal görünümlü nöronlar ve nöroglia hücreleri izlenmekteydi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, LPS uygulanan sıçan beyin dokusunda bozulmuş aksonlar ve vasküler konjesyon dikkati çekti. Sadece melatonin uygulanan gruba ait beyin dokuları kontrol grubuna benzerdi ve normal bir mimari gösterdi. LPS grubuyla karşılaştırıldığında melatonin uygulanan tedavi

grubunda nadir vasküler konjesyon yapıları görülmekle birlikte kontrol grubuna yakın nöron yapıları ve glial hücreler belirlendi (Şekil 4.2).



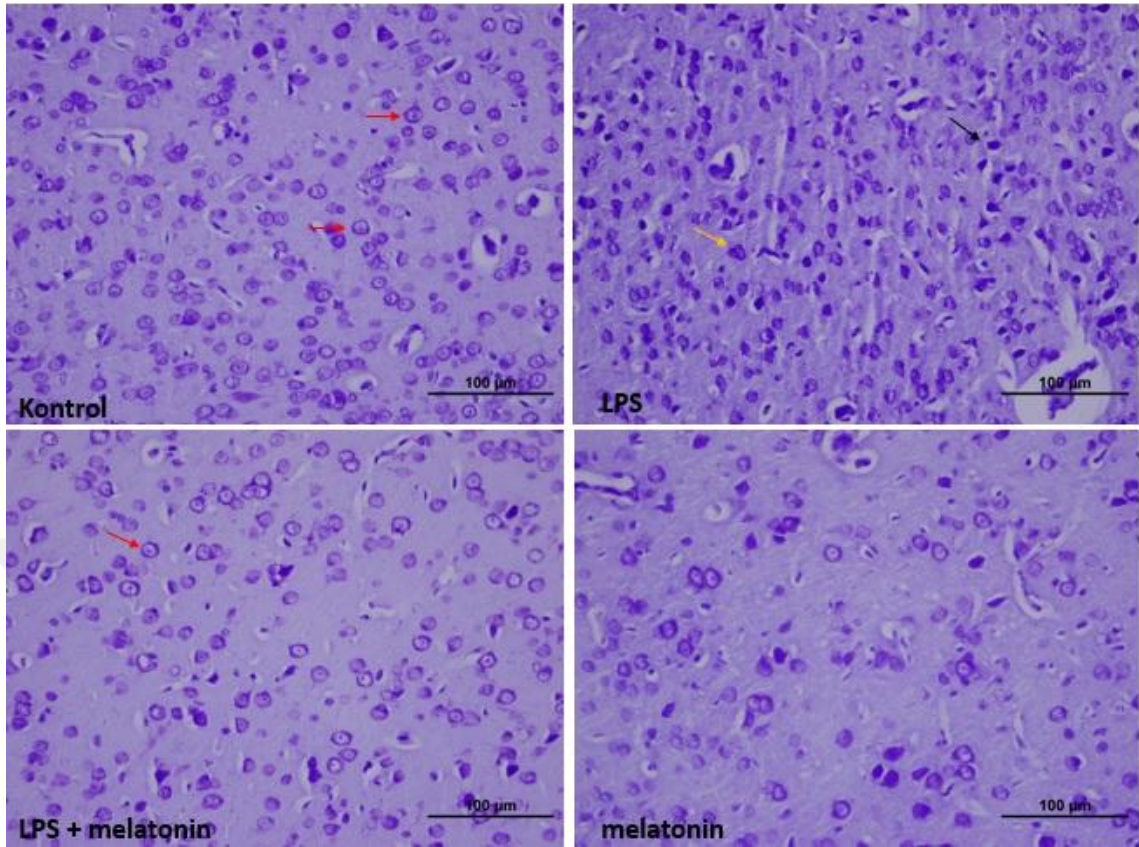
Şekil 4.2. Tüm deney gruplarına ait sıçan beyin korteksinden alınmış ışık mikroskopik görüntüler. Vasküler konjesyon (siyah ok) (H&E, X40).

Tüm deney gruplarına ait MT boyama metodu ile boyanmış preparatlardan alınan ışık mikroskopik incelemede, kontrol grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alan eozinofilik boyanmış nöron hücre gövdeleri ile normal görünüm sergilerken, LPS uygulanan gruba ait kortikal alanlarda soluk boyanmış nekrotik görünümlü nöronlar ve vasküler konjesyon gözlemlendi. Sadece melatonin uygulanan gruba ait beyin korteksi normal görünüm sergilerken, melatonin uygulanan LPS+melatonin grubunda kontrol grubuna benzer nöron yapıları ve glial hücreler gözlenmekteydi (Şekil 4.3).

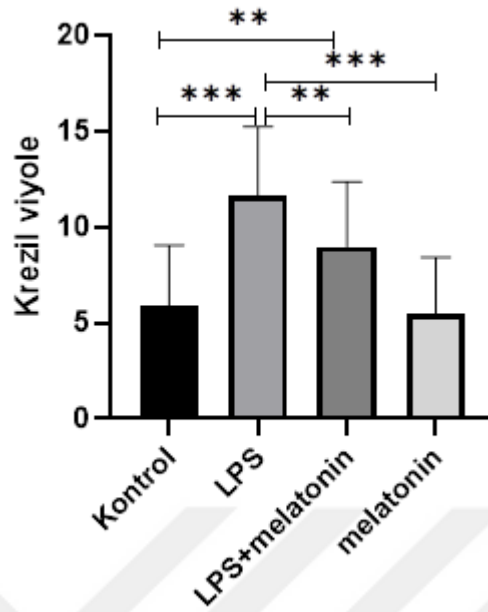


Şekil 4.3. MT boyama metodu uygulanmış deney gruplarında beyin korteksine ait ışık mikroskopik görüntüler. Eozinofilik boyanmış nöron hücre gövdeleri (siyah ok), soluk boyanmış nekrotik görünümlü nöronlar (kırmızı ok) (MT, X40).

KV boyama diğer bir ifade ile “Nissl Boyama” nöron sitoplazmasındaki nissl cisimcikleri işaretleyen bir belirteçtir. Tüm deney gruplarına ait KV boyama metodu ile boyanmış preparatlardan alınan ışık mikroskopik incelemede, kontrol grubundaki sıçan beyinlerinde kortikal alanda belirgin nükleer membrana sahip normal morfolojide nöronlara rastlanırken, LPS uygulanan gruba ait kortikal alanlarda; düzensiz piknotik çekirdeğe sahip ve sitoplazmik vakuol gösteren dejeneratif nöronlara rastlandı. Sadece melatonin uygulanan gruba ait beyin dokuları ise kontrol grubuna benzerdi. Melatonin uygulanan LPS+melatonin grubu, LPS grubuyla karşılaştırıldığında dejeneratif nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı belirlendi ($P<0.01$) (Şekil 4.4, 4.5).



Şekil 4.4. KV boyama metodu uygulanmış deney gruplarında beyin korteksine ait ışık mikroskopik görüntüler. Normal morfolojide nöronlar (kırmızı ok), piknotik çekirdeğe sahip (siyah ok) ve sitoplazmik vakuol gösteren dejeneratif nöronlar (sarı ok) (KV, X40).

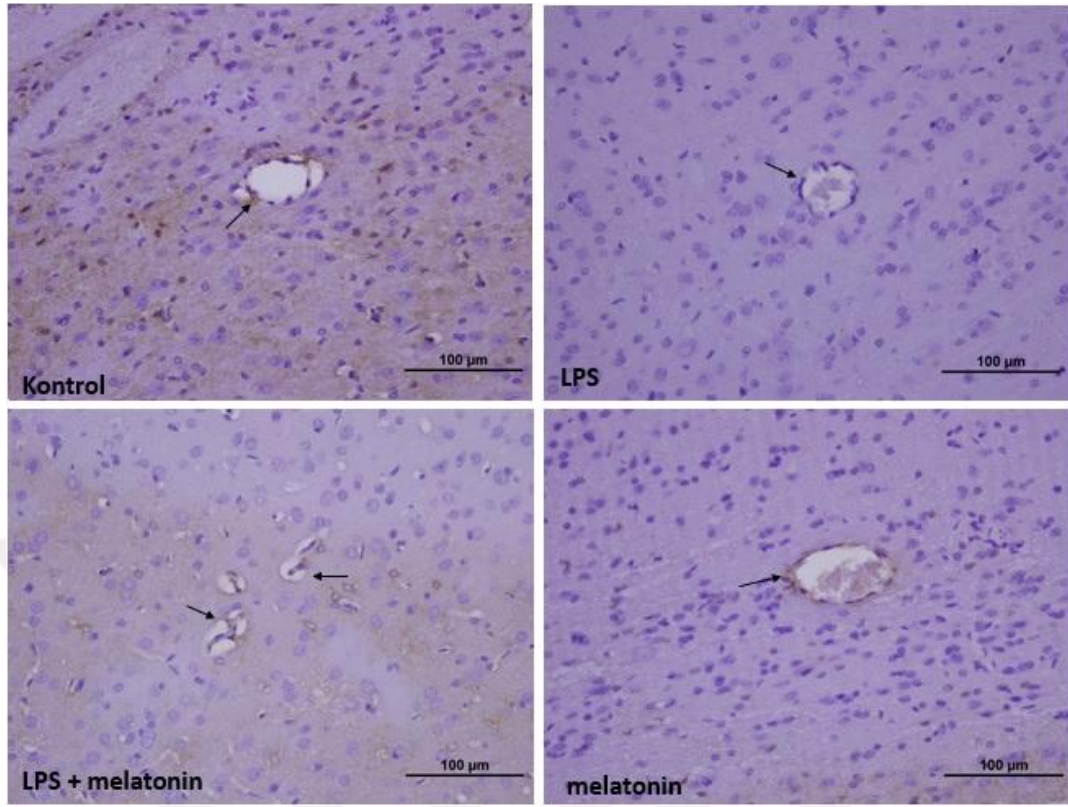


Şekil 4.5. KV boyama sonucu beyin korteks alanında belirlenmiş dejeneratif nöronların istatistiksel analizi.*; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$

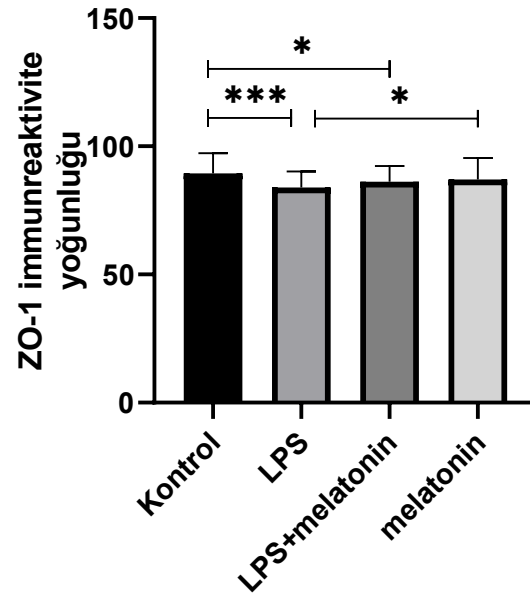
4.3.İmmünohistokimyasal Bulgular

4.3.1. ZO-1 Ekspresyonu

KBB' de sıkı bağlantı proteinlerinden ZO-1 ifadesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal analiz sonucunda ZO-1 immunreaktivite yoğunluğunun LPS grubunda 84 (79,05 - 89,15) kontrol grubuna 89,65 (85,01 - 93,64) kıyasla azaldığı belirlendi. Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($P<0.001$). Sadece melatonin uygulanan grupta 86,39 (82,92 - 89,68) ZO-1 ifadesi, LPS grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($P<0.05$). Ayrıca koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubunda 85,93 (80,42 - 92,24) ZO-1 ifadesi düzeyinin, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($P<0.05$) (Şekil 4.6, 4.7).



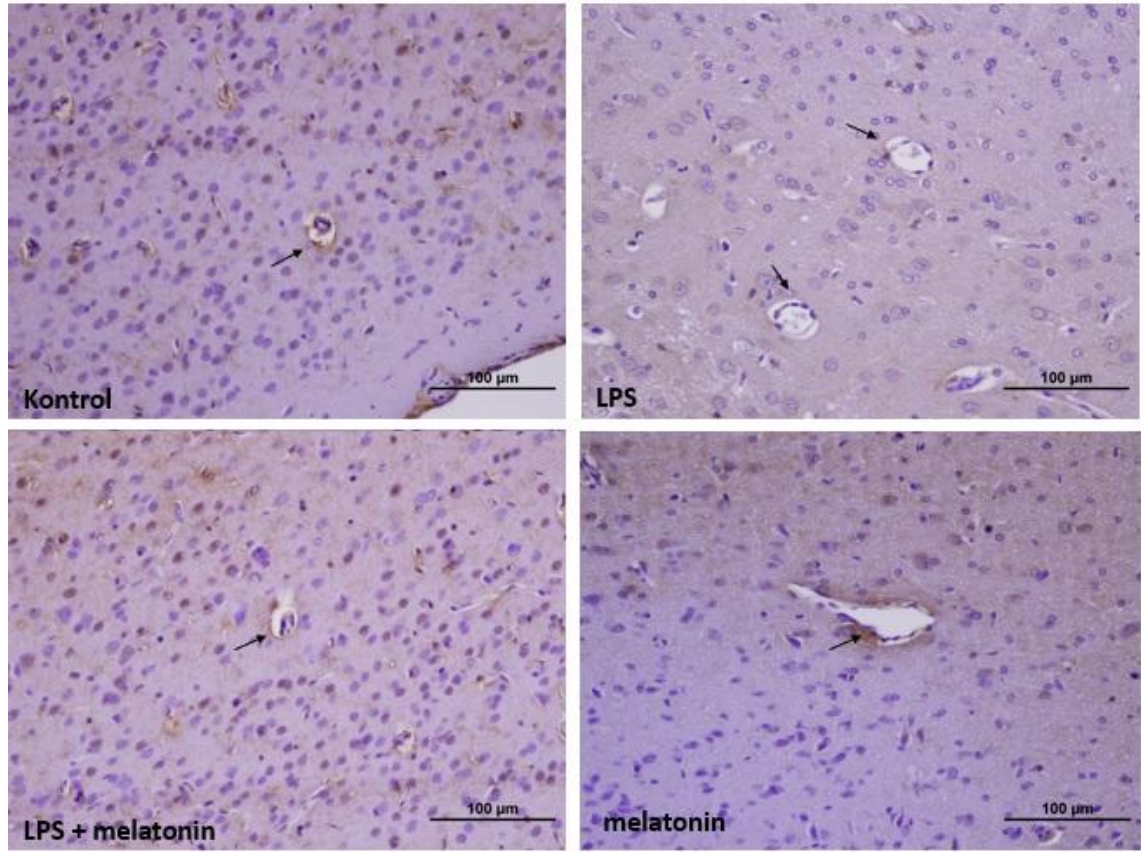
Şekil 4.6. Deney gruplarına ait beyin korteksi kan damarları endotel hücrelerinde (siyah ok) ZO-1 ifadesi immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (X40).



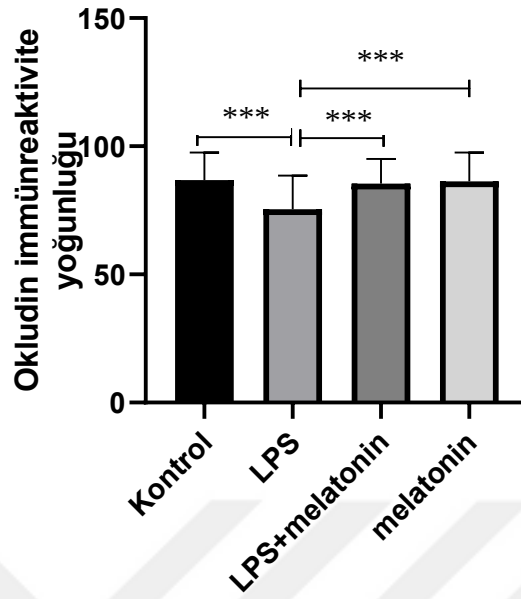
Şekil 4.7. Deney gruplarına ait ZO-1 immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi.*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$

4.3.2. Okludin Ekspresyonu

Okludin ifadesini belirlemek üzere yapılan immünohistokimyasal boyamada LPS grubunda 74,15 (65,64 - 80,14) okludin immunreaktivite yoğunluğunun diğer tüm gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($P < 0.001$). Koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubunun 85,23 (77,11 - 92,33) ve sadece melatonin uygulanan grubun 85,23 (79,35 - 92,44) immunreaktivite yoğunluğunun LPS grubuna 74,15 (65,64 - 80,14) oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ($P < 0.001$) (Şekil 4.8, 4.9).



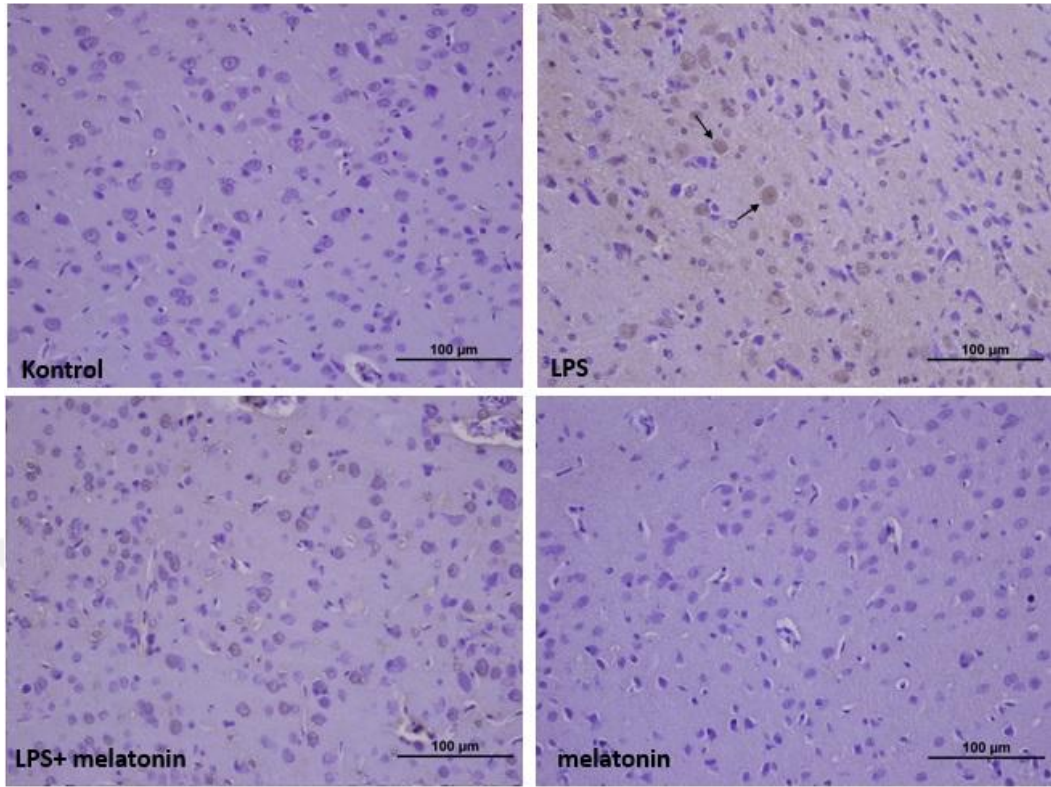
Şekil 4.8. Deney gruplarına ait beyin korteksi kan damarları endotel hücrelerinde (siyah ok) okludin ifadesi immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (X40).



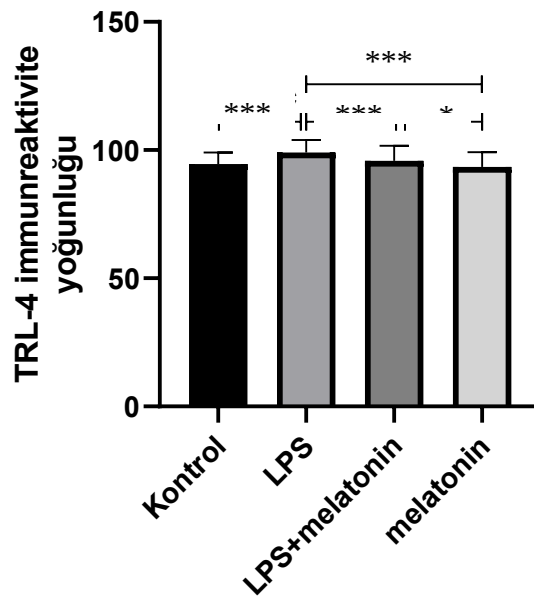
Şekil 4.9. Deney gruplarına ait okludin immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi. *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$

4.3.3. TLR-4 Ekspresyonu

Tüm deney grupları TLR-4 immunreaktivite yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında; LPS grubunun 98,55 (96,59 - 103,1) TLR-4 immunreaktivitesinin kontrol grubuna 95,46 (91,28 - 97,44) oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($P<0.001$). TLR-4 ifadesi sadece melatonin uygulanan grupta 97,08 (91,77 - 99,96), LPS grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı ($P<0.001$). Ayrıca koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubundaki 94,46 (89,53 - 97,36) TLR-4 immunreaktivite yoğunluğu LPS grubuna oranla 98,55 (96,59 - 103,1) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($P<0.001$). Yine koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubu ve yalnızca melatonin uygulanan gruplar birbirleriyle kıyaslandığında sadece melatonin uygulanan grup, TLR-4 ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($P<0.05$) (Şekil 4.10, 4.11).



Şekil 4.10. Deney gruplarına ait beyin korteksinde inflamasyon belirtici TLR-4 ifadesi (siyah ok) immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (X40).



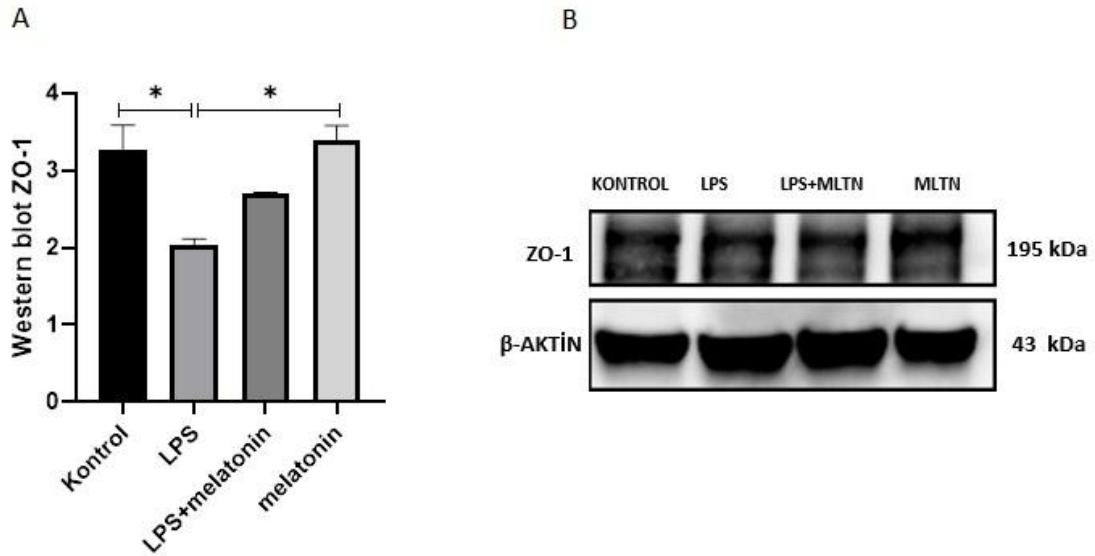
Şekil 4.11. Deney gruplarına ait TLR-4 immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi.

*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

4.4. Western Blot Bulguları

4.4.1. ZO-1 western blot sonuçları

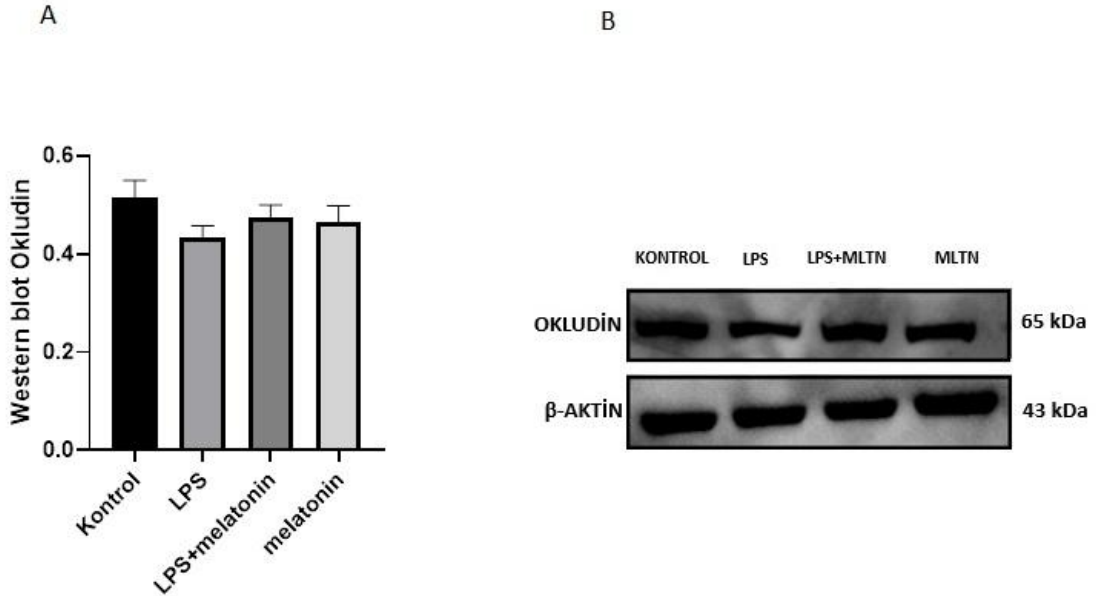
ZO-1 ifadesi Western Blot yöntemi ile değerlendirildiğinde LPS grubu ZO-1 miktarının ($2,038 \pm 0,078$), kontrol grubuna ($3,276 \pm 0,312$) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($P < 0.05$). Sadece melatonin uygulanan grupta ZO-1 miktarının ($3,381 \pm 0,203$) LPS grubuna ($2,038 \pm 0,078$) oranla ciddi bir şekilde arttığı ve bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Öncesinde koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubunda ZO-1 proteininin miktarını melatonin'in arttırdığı görüldü. Yani koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubunda ZO-1 miktarı ($2,710 \pm 0,008$), LPS grubuna oranla artmıştı fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P > 0.05$) (Şekil 4.12). ZO-1 proteinine ait Western Blot sonuçlarının, immünohistokimya sonuçları ile uyumluluk sağladığı belirlendi.



Şekil 4.12. A. Deney gruplarına ait ZO-1 protein miktarının istatistiksel analizi.*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$. B. Deney gruplarına ait ZO-1 ve β -Aktin protein bantlarının görünümü.

4.4.2. Okludin western blot sonuçları

Dokudaki okludin ifadesi Western blot açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasında farklılıkların olduğu ancak bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. LPS grubunda okludin miktarı ($0,432 \pm 0,025$), kontrol grubuna ($0,514 \pm 0,035$) oranla azalmıştı fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). Ayrıca sadece melatonin uygulanan grubun okludin miktarı ($0,466 \pm 0,032$) ise LPS grubuna oranla artmıştı fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$) (Şekil 4.13). Okludin proteinine ait Western Blot sonuçlarının, immünohistokimya sonuçları ile uyumluluk sağladığı belirlendi.

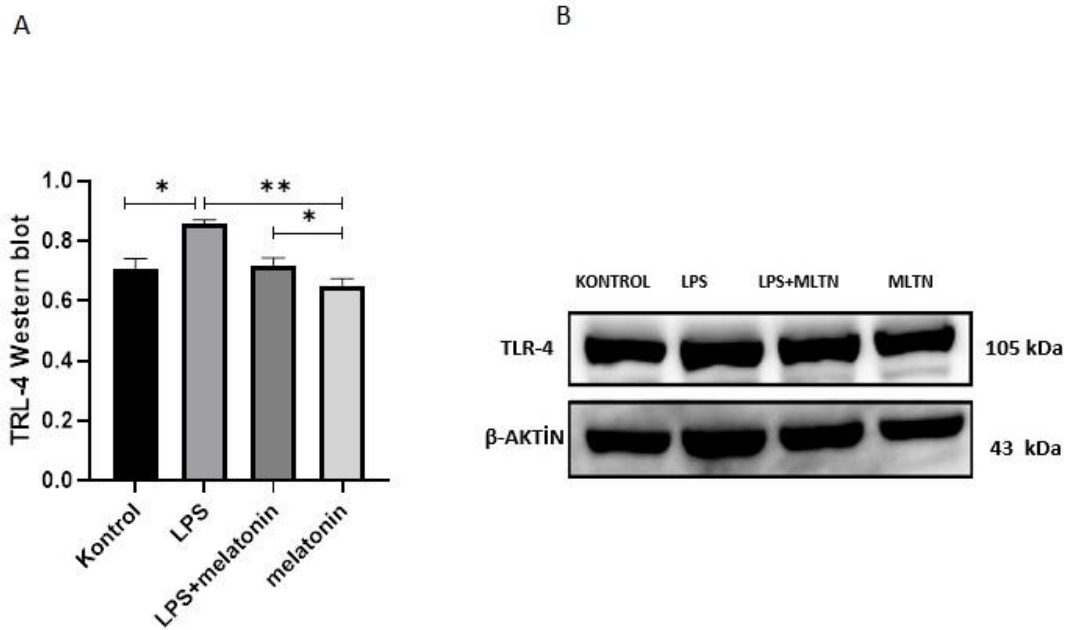


Şekil 4.13. A. Deney gruplarına ait okludin protein miktarının istatistiksel analizi. *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$. B. Deney gruplarına ait okludin ve β -Aktin protein bantlarının görünümü.

4.4.3. TLR-4 western blot sonuçları

Dokudaki inflamasyon belirteci olan TLR-4'ün, kontrol grubuna ($0,704 \pm 0,036$) kıyasla LPS grubunda ($0,858 \pm 0,012$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($P<0.05$). Sadece melatonin uygulamasının yapıldığı grupta ($0,647 \pm 0,028$) inflamasyon belirteci olan TLR-4 miktarının, LPS grubuna ($0,8588 \pm 0,01227$) oranla

istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($P<0.01$). Yine koruyucu amaçlı LPS öncesinde melatonin uygulanan gruptaki TLR-4 miktarı ($0,715 \pm 0,028$), LPS grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı ($P<0.05$) (Şekil 4.14). TLR-4 proteinine ait Western Blot sonuçlarının, immünohistokimya sonuçları ile uyumluluk sağladığı belirlendi.



Şekil 4.14. A. Deney gruplarına ait TLR-4 protein miktarının istatistiksel analizi. *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$. B. Deney gruplarına ait TLR-4 ve β -Aktin protein bantlarının görünümü.

4.5. Biyokimyasal Bulgular

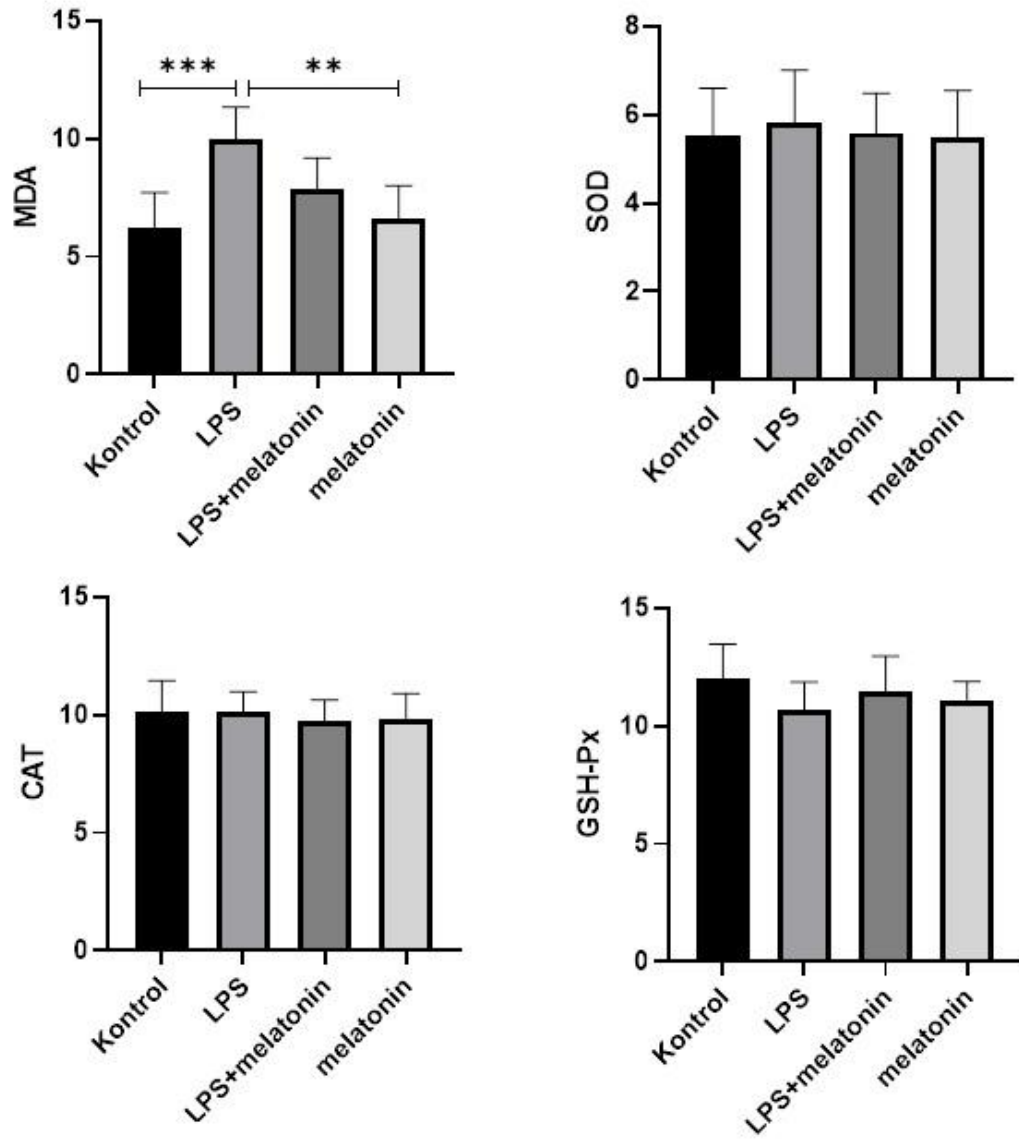
4.5.1. MDA, SOD, CAT, GSH-Px Bulguları

Endotokseminin KBB üzerinde oluşturduğu hasarda doku MDA, SOD, CAT ve GSH-Px düzeyleri ELISA metodu ile incelendi. LPS grubunda MDA seviyesinin ($9,943 \pm 1,403$) kontrol grubuna ($6,176 \pm 1,543$) oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ($P<0.001$). Koruyucu amaçlı melatonin uygulanan grubun doku MDA düzeyi ($7,873 \pm 1,316$), LPS grubuna oranla azaldı fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). LPS uygulanan grupta MDA düzeyi, sadece melatonin uyguladığımız grup ($6,601 \pm 1,413$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi ($P<0.01$).

Tek doz LPS uygulanan deney grubunda, doku SOD düzeyinin ($5,811 \pm 1,200$) kontrol grubuna ($5,526 \pm 1,077$) kıyasla arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($P>0.05$). Koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS ($5,593 \pm 0,895$) ve sadece melatonin uygulanan grubun doku SOD düzeyinin ($5,474 \pm 1,074$), LPS grubuna ($9,943 \pm 1,403$) kıyasla düştüğü belirlendi. Ancak, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$).

Deney grupları doku CAT düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü. LPS ($10,130 \pm 0,857$), LPS+melatonin ($9,746 \pm 0,903$) ve melatonin ($9,834 \pm 1,070$) gruplardaki doku CAT seviyesi kontrol grubunun ($10,150 \pm 1,303$) doku CAT seviyesine göre azalmıştı. Ancak bu azalma istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı değildi ($P>0.05$).

Tüm deney grupları dokudaki GSH-Px düzeyi açısından değerlendirmeye alındığında LPS grubunun doku GSH-Px seviyesine ($10,710 \pm 1,156$) oranla, kontrol grubu ($11,99 \pm 1,487$), koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubu ($11,47 \pm 1,485$) ve sadece melatonin uygulanan grubun ($11,060 \pm 0,829$) doku GSH-Px seviyesinde artış olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($P>0.05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Deney gruplarına ait MDA, SOD, CAT, GSH-Px ELISA bulgularının istatistiksel analizi. *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$.

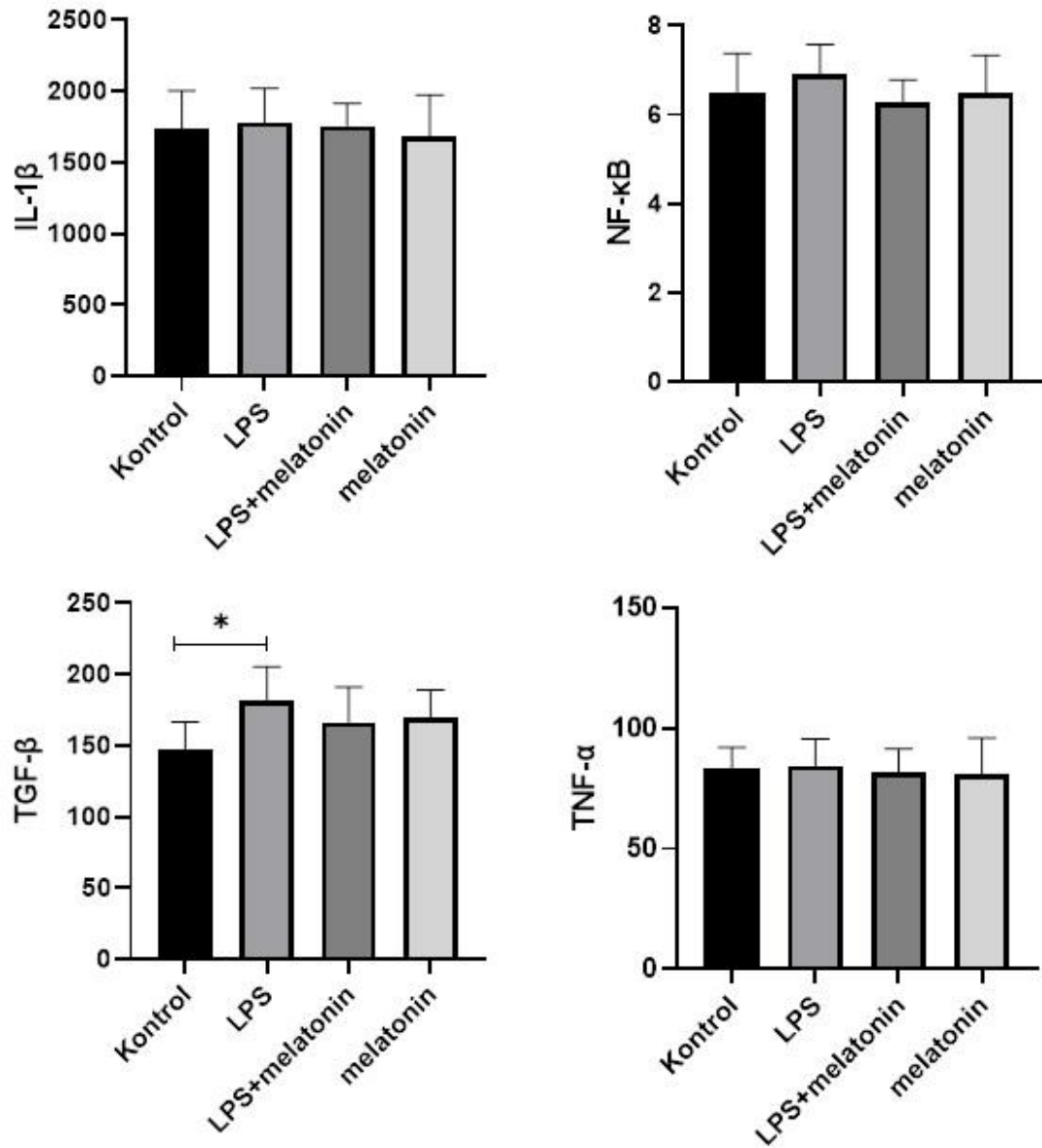
4.5.2. IL-1 β , NF- κ B, TGF- β , TNF- α , Bulguları

LPS ile indüklenen endotokseminin KBB üzerinde oluşturduğu hasarda doku TGF- β , TNF- α , IL-1 β ve NF- κ B düzeyleri ELISA metodu ile incelendi. LPS grubu doku IL-1 β düzeyi ($1783 \pm 238,8$), kontrol grubuna ($1735 \pm 270,3$) oranla küçük bir farkla arttı fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). LPS öncesi melatonin uygulanan LPS+melatonin grubunda doku IL-1 β düzeyi ($1757 \pm 160,1$), LPS grubuna ($1783 \pm 238,8$) göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gösterdi ($P>0.05$).

Doku NF- κ B düzeyinin kontrol ($6,507 \pm 0,873$), LPS+melatonin ($6,271 \pm 0,514$) ve melatonin ($6,474 \pm 0,861$) gruplarına kıyasla LPS uygulanan grupta ($6,929 \pm 0,647$) istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde çok az bir artış gösterdiği gözlemlendi ($P>0.05$).

Beyin dokusundaki TGF- β seviyesi ele alındığında LPS grubunun doku TGF- β seviyesinin ($181,1 \pm 24,29$), kontrol grubuna ($147,5 \pm 19,21$) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($P<0.05$). Doku TGF- β düzeyi koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubu ($166,3 \pm 24,81$) ve sadece melatonin uygulanan deney gruplarında ($169,2 \pm 20,08$) doku TGF- β seviyesi LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde azaldığı gözlemlendi ($P>0.05$).

TNF- α düzeyinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. LPS grubu doku TNF- α düzeyinde $90,09$ ($70,71 - 91,84$) kontrol grubuna $85,57$ ($75,69 - 91,23$) nisbeten küçük bir artış görüldü. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Deney gruplarına ait IL-1 β , NF- κ B, TGF- β , TNF- α , ELISA bulgularının istatistiksel analizi. *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001.

5.TARTIşMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, sıçan beyin dokusunda LPS'in yol açtığı endotoksemiye karşı melatonin'in histolojik ve biyokimyasal etkileri araştırılmıştır. Mevcut çalışmanın sonuçları, LPS ncesi melatonin uygulanmasının LPS'in oluşturduğu şiddetli KBB hasarında önemli bir azalma sağladığını göstermiştir.

Endotoksemi diğer bir ifadeyle sepsis, dünya genelinde yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahip sistemik bir inflamatuvar yanıt sendromudur. Sergilediği risklere rağmen etkin bir tedavi yöntemi mevcut değildir (Khodir ve ark., 2016). Gram negatif bakterilerin hücre zarında lipit özellikte ayrıca bir dış tabakaları vardır. Bu dış tabaka toksisitenin ana kaynağı olan LPS'i barındırır. LPS endotoksemide çoklu organ hasarının asıl nedenidir (Akira ve Takeda, 2004). Sepsisi oluşturan endotoksinler, hücresel n ara ürünler ve onların doğal karşıtlarının salgılanması ve dengelenmesi ile açığa çıkar. Bu etkinin sonuçlarının büyüklüğü aslında endotoksinin yapısı ve konağın genetik yapısı ile yakından alakalıdır (Gorbet ve Sefton, 2005; Davies ve Cohen, 2011). LPS konağa ait immun sistem elemanlarının etkisi ile bakterinin parçalanması sonucunda dolaşıma rahatlıkla geçerek hedef hücreleri uyarıp inflamatuvar mediyatörlerin açığa çıkmasına sebep olmaktadır. Dolaşıma katılarak monositlerden ve ayrıca doku makrofajlarından proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını sağlar (Akira ve Takeda, 2004). LPS'in yol açtığı organ hasarları genellikle reaktif oksijen ve azot türevlerinin oluşumu ile ilişkilendirilir. Bu reaktif türler, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girip, lipit peroksidasyonuna, DNA mutasyonlarına yol açarlar, ayrıca proteinleri inaktive ederler (Khodir ve ark., 2016). Bu süreçte başta kardiopulmoner fonksiyon bozukluğu olmakla beraber vasküler permeabilite artışı, kalp ve böbrek yetmezliği, gastrointestinal motilitede azalma ve şokla sonuçlanan periferel perfüzyonun azalması gibi birçok anormalik ortaya çıkar (Constable, 2007). LPS ile oluşturulan sepsisin yol açtığı oksidatif stresten en çok etkilenen sistem MSS'dir. Bu sistem içerisinde beyin dokusu fazla oksijen kullanımı, yüksek düzeyde metal içeriği ve

antioksidan savunma mekanizmalarının zayıf olması nedeniyle oksidan strese oldukça duyarlıdır. Bunun yanısıra, nöron membranları kolayca okside olabilen doymamış yağ asitleri açısından da zengindir (Facheris ve ark., 2004; Cemeli ve ark., 2003). Sepsis modellerinde LPS'in sistemik kullanımı MSS'nin oksidatif dengesini değiştirmekte ve çeşitli serbest radikal üretimini tetikleyerek, bu sistemde fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Qin ve ark., 2007; Nolan ve ark., 2003). Başta sepsis olmak üzere menenjit, ensefalit ya da lokal veya sistemik enfeksiyonun MSS bariyerlerinden KBB'nin permeabilitesini değiştirdiği bilinmektedir (Pollay ve Roberts, 1980). Biz de buradan yola çıkarak LPS ile oluşturduğumuz endotokseminin KBB'de yer alan sıkı bağlantı proteinlerinin ifadelerinde meydana getirdiği değişiklikleri inceledik. 1958'de Eckman ve arkadaşları gram negatif endotoksinlerin KBB üzerinde büyük tahribata neden olduğunu (Eckman ve ark., 1958), böylece multiple skleroz, amyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, obezite ve felç gibi hastalıkların kapısını araladığını ifade etmişlerdir (Allison ve Ditor, 2014). Yapılan bir çalışmada; erkek BALB/c farelere periton içi 10 mg/kg kadar LPS verilmiş ve uygulamadan 8 saat sonra ışık mikroskopik incelemede beyin korteksinde dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir. Bu çalışmada nöronlarda yoğun ve hiperkromatik bir nükleus, dejeneratif nöronların çevresinde düzensiz şekilli ve geniş perinöronal vakuolarizasyon belirlenmiştir (Ning ve ark., 2017). Deng ve ark. Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlara periton içi 7,5 mg/kg LPS uygulayarak oluşturdukları 24 saatlik sepsis modeli ile beyin korteks ve hipokampus bölgesini ele alarak, KV boyama ile LPS grubunda nöron kaybı ve nöronal piknosiz saptamışlardır (Deng ve ark., 2018). Yapılan bir başka çalışmada KunMing farelere 12 gün boyunca günlük 1 mg/kg LPS verilmiş, KV boyama sonucunda frontal korteks ve hipokampusda LPS grubunda yüksek oranda nöron hasarı belirlemişlerdir (Song ve ark., 2019). Biz de çalışmamızda öncelikle LPS ve melatonin uygulamasının deneklerin vücut ağırlıklarında bir değişikliğe neden olup olmadığını araştırdık. Çalışma sonunda LPS grubuna ait sıçan vücut ağırlıklarının, ilk ağırlığa göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Gruplar deney sonrasında son ağırlıklar açısından karşılaştırıldığında, koruyucu amaçlı melatonin uygulanan LPS grubunda sadece LPS uygulanan gruba göre vücut ağırlığında anlamlı bir artış olduğu görüldü. Böylece çalışmamızda LPS uygulaması öncesinde uygulanan melatonin'in, LPS'in neden olduğu vücut ağırlığındaki azalmayı önleyici yönde rol oynadığı gösterildi. Ayrıca çalışmada, deney gruplarına ait sıçanlardan alınan beyin doku

örneklerinde H&E ve MT boyama metodları uygulanarak LPS'in neden olduğu morfolojik ve hücrel değişimler ele alındı. Buna göre, LPS uygulanan sıçan beyin dokusunda bozulmuş aksonlar ve vasküler konjesyon dikkati çekti. LPS+melatonin grubunda ise vasküler konjesyon yapılarının nadir olduğu ve kontrol grubuna yakın nöron yapıları ile glial hücreleri içerdiği görüldü. Çalışmada, bu histokimyasal boyama metodlarının yanı sıra dejeneratif nöron yapılarını değerlendirmek amacıyla KV boyama yöntemi de kullanıldı. Hazırlanan preparatlarda beyin korteks tabakası incelendiğinde, LPS grubunda tüm diğer deney gruplarına göre artmış düzensiz piknotik çekirdeğe sahip, sitoplazmik vakuol gösteren dejeneratif nöronlara rastladık. LPS+melatonin grubunda ise LPS grubuna göre dejeneratif nöron sayısında anlamlı bir azalma olduğunu gösterdik. Andrea ve ark. çalışmalarında ALS modeli ile farelerde akut nöroinflamasyon oluşturularak, KBB yapısını ve nörodejenerasyonu değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında hücre ölümü, astrosit ayakçıklarında ödem, astrosit ve endotel hücre kaybı, bazal membran yıkımı, ödem ve mikrohemoraji gözlemişlerdir. Yine aynı çalışmada okludin ve ZO-1 ifadesinin ciddi oranda azaldığını saptamışlardır (Nicaise ve ark., 2009). Oksidatif stresin yol açtığı KBB değişikliklerini incelemeyi amaçlayan bir çalışmada, orta beyin arteri oklüzyonu iskemik felç modeli oluşturulmuştur. Uygulamadan 2 gün sonra sıkı bağlantı proteinlerinden kladin-5, okludin ve ZO-1 ifadesinde azalma olduğu gözlenmiş, bu azalmanın KBB permeabilitesinin artması ile ilişkili olacağı düşünülmüştür (Jiao ve ark., 2011). Zhou ve arkadaşları, dişi fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada 1 mg/kg LPS'in KBB sıkı bağlantı proteinlerinden ZO-1, okludin ve kladin-5'in ifadesinde önemli bir azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir (Zhou ve ark., 2014). Liu ve ark. LPS ile indüklenen KBB permeabilitesini insan beyin mikrovasküler endotelial hücre hattında değerlendirip sıkı bağlantı proteinlerinden okludin ve kladin-5 ifadesinin LPS uygulaması sonrasında ciddi şekilde azaldığını bildirmişlerdir (Liu ve ark., 2015). Başka bir çalışmada ise, 7 gün boyunca günlük 250 µg/kg LPS uygulanmış C657LB erkek farelerin beyin korteksinde parçalanmış, küçülmüş, hasarlı ya da ölü nöronlara rastlanmıştır (Badshah ve ark., 2016). He ve ark. fare beyin kökenli mikrovasküler endotelial hücre hattında 12 saatlik LPS maruziyetinin ZO-1 ifadesini olumsuz yönde değiştirdiğini ortaya koymuştur (He ve ark., 2011). William ve ark. çalışmalarında, inflamasyona bağlı olarak KBB'ndeki bozulma mekanizmalarını araştırırken farelere sırayla 0.3, 0.03 ve 3 mg/kg LPS dozu uygulamışlardır. Bu çalışmada yalnızca 3 mg/kg LPS'in KBB'ni

bozduğunu bunun aksine diğer tüm dozların ise vücut ağırlığı kaybına neden olduğunu ifade etmişlerdir (Banks ve ark., 2015). Jangula ve ark. fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada 5 mg/kg tek doz LPS'in KBB'deki permeabiliteyi artırmak için yeterli olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar Evans Blue değerlendirmesi ile permeabilite değişikliğinin 1 saat içinde ortaya çıktığını da belirlemişlerdir (Jangula ve Murphy, 2013). Bizim çalışmamız da elde ettiğimiz veriler, yapılan tüm LPS çalışmaları ile uyum göstermekteydi. Sadece tek doz ve 7,5 mg/kg kadar uyguladığımız LPS ile oluşturduğumuz 24 saatlik bir sepsis modelinde, KBB sıkı bağlantı proteinlerinden ZO-1 ve okludin ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığını hem immünohistokimyasal boyama yöntemi hem de western blot yöntemi ile belirledik. LPS+melatonin grubunda ise, LPS öncesi uygulanan melatonin'in özellikle okludin immunreaktivite yoğunluğunu anlamlı düzeyde arttırdığını gözlemledik.

LPS uygulaması beyin dokusunda öncelikle mikroglialardan, astrositlerden, nöronlardan, endotel ve ependimal hücrelerinden sitokin serbestleşmesini sağlar (Hillhouse ve Mosley, 1993). Bununla birlikte LPS ile indüklenen nöroinflamasyonun altında yatan mekanizmalar hem *in vivo* hemde *in vitro* ortamda araştırma konusu olmuştur (Gerzanich ve ark., 2019). Birçok bilimsel çalışma, periton içi LPS uygulamasının beyin dokusunda başta IL-1 β ve TNF- α olmak üzere çok sayıda proinflamatuvar sitokin seviyesini artırdığını rapor etmiştir (Turrin ve ark., 2001; Quan ve ark., 1998; Gabellec ve ark., 1995). Sitokin artışı, LPS'in TLR-4 üzerinden başlattığı inflamasyon kaskadının öncelikle NF- κ B'yi aktive etmesi ile gerçekleşmektedir (Bannerman ve Goldblum, 2003). Bu üç inflamatuvar medyatörün aynı anda aktive olması ve ardından gelen immün yanıt, patojenlere karşı konağın savunma sistemini oluşturmaktadır. Böylece immün sistemin yoğun aktivasyonu, sitokinlerin kontrolsüz salınmasına, dolayısıyla inflamasyon ve SIRS'a yol açar (Liu ve ark., 2017; Kang ve ark., 2016). TLR-4, bütün bakteriyi ya da LPS gibi bakteriyel ürünleri tanıyan özel reseptörlerden biri olması sebebiyle endotoksemi, sepsis deneylerinin önemli bir araştırma konusu olmuştur (Zhou ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2018; Choi ve ark., 2012; Wang ve ark., 2014). Yenidoğan sıçanlarda düşük doz sistemik LPS enjeksiyonunu takip eden 6, 12 ve 24. saatlerde rt-PCR yöntemi ile TLR-4'ün ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2014). Choi ve ark. insan beyin endotelial hücre hattı üzerinde yaptığı bir çalışmada uygulanan LPS'in TLR-4'ü aktive ettiğini, TLR-4 yolağı üzerinden endotelial bariyerin fonksiyonlarını bozduğunu ve sıkı bağlantı

proteinlerinin ifadesini değiştirebildiğini bildirmişlerdir (Choi ve ark., 2012). Erkek Sprague-Dawley sıçanlarda beyin ventriküllerinin her birine 5 µg/µL kadar toplamda 10 µg/µL LPS'in uygulanmasıyla oluşturulan nöroinflamasyon modelinde, LPS grubunda western blot analizi ile hipokampüsde, NF-κB ve TLR-4 ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Zhou ve ark., 2019). Literatürle uyumlu bir şekilde mevcut çalışmamızda da gruplar arası karşılaştırma yapıldığında TLR-4 ifadesi, hem western blot hem de immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirilmiş ve LPS grubunda bu ifadenin diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. Cai ve ark., 5 günlük Sprague-Dawley sıçanlara LPS'in beyin içi enjeksiyonundan 6 saat sonra doku IL-1β ve TNF-α değerlerinin pik yaptığını bildirmişlerdir (Cai ve ark., 2003). Quan ve ark. sıçanlarda periton içi 2,5 mg/kg LPS enjeksiyonundan 2 ve 12 saat sonra beyin dokusunda IL-1β (Quan ve ark., 1998); Turrin ve ark. 100 µg/kg dozda LPS uyguladıktan 5 saat sonra IL-1β ve TNF-α seviyelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir (Turrin ve ark., 2001). Bir başka çalışmada ise, 2 mg/kg LPS uygulaması ile oluşturulan 24 saatlik bir sepsiste ölçülen beyin dokusu TNF-α ve IL-1β konsantrasyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (Cazareth ve ark., 2014). Zhang ve ark., 8 haftalık erkek fareler üzerinde *Porphyromonas gingivalis*'in 5 mg/kg LPS ile oluşturduğu endotoksemi modelinde TLR-4/NF-κB sinyal yolağı üzerinden hafıza zayıflığı meydana getirdiğini ifade etmiştir. Oluşan nöroinflamasyon ile TNF-α seviyesi kontrol grubuna kıyasla 4 kat, IL-1β ise 3 kat artmıştır (Zhang ve ark., 2018). Bu zamana kadar LPS uygulaması ile yapılan birçok çalışma, LPS'in TNF-α ve IL-1β seviyelerinde bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Mevcut çalışmamızda da LPS grubunda, TNF-α ve IL-1β konsantrasyonlarında diğer deney gruplarına göre bir artış olduğu görüldü ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. LPS uygulamaları neticesinde beyin sitokin salınımındaki artış ya da azalış aslında LPS dozuna ve uygulama zamanına bağlı olarak farklı sonuçlar verebilmektedir. Wang ve ark. gebe sıçanlara her 12 saatte bir 0.2 mg/kg LPS uygulayarak fetal beyin dokusunda ve serebrospinal sıvıdaki TGF-β seviyesinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir (Wang ve Liu, 2018).

Beyinde inflamasyonun yol açtığı oksidatif stres belirteçleri arasında MDA düzeylerinin ölçümü önemli ipuçları vermektedir. Ozan ve ark. 4 mg/kg dozunda intraperitoneal LPS uygulayarak oluşturduğu endotoksemi modelinde uygulamadan 6 saat sonra beyin dokusunda MDA düzeyinin yükseldiğini saptamıştır (Gonca ve ark., 2018). Yapılan

çalışmalarda 7 gün boyunca 250 µg/kg dozunda LPS uygulamasından sonra, 2 mg/kg dozunda LPS uygulamasından 2 saat sonra ve yine 8 mg/kg LPS uygulamasından 24 saat sonra beyin dokusunun MDA seviyelerinde ciddi oranda artış olduğu bildirilmiştir (Santhanasabapathy ve Sudhandiran, 2015; Kheir-Eldin ve ark., 2001; Sebai ve ark., 2009). Biz de çalışmamızda doku MDA düzeyinin LPS grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını belirledik. Serbest radikaller ve serbest radikal ürünleri inflamasyonun önemli medyatörlerindendir. SOD, CAT ve GSH-Px düzeyleri inflamasyon sonucu oluşan oksidatif stres seviyesi hakkında bilgi veren antioksidan enzimlerden bazılarıdır. Periferik LPS uygulaması ile oluşturulan nöroinflamasyon modellerinde, Sebai ve ark. ile Santhanasabapathy ve Sudhandiran LPS uygulamasının beyin dokusunda SOD aktivitesinin anlamlı şekilde azalttığını rapor etmişlerdir (Sebai ve ark., 2009; Santhanasabapathy ve Sudhandiran, 2015). Başka bir çalışmada ise LPS uygulamasının beyin dokusu SOD aktivitesinde bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (Kheir-Eldin ve ark., 2001). GSH-Px, dokuda oksidatif hasara karşı savaşan, nöroprotektif etkiye sahip antioksidan bir enzimdir (Karabulut ve Gülay, 2016). Rosales-Corral ve ark. sıçan hipokampusunda fibriler amiloid-beta uygulamasıyla oluşturdukları nöroinflamasyon modelinde, Raza ve ark. sıçanlarda akut orta serebral arter oklüzyonu modelinde, beyin dokusunda GSH-Px aktivitesinin önemli düzeyde düştüğünü bildirmişlerdir (Raza ve ark., 2011; Rosales-Corral ve ark., 2004). MSS'nde oluşturulan oksidatif stres modellerinde ve LPS ile oluşturulan nöroinflamasyon çalışmalarında oksidatif stres belirteci olan GSH-Px aktivitesinin azalmış olması, mevcut çalışmamızda LPS grubundaki GSH-Px seviyesinin azalmasıyla uyumludur. Ancak, bu azalma yapılan birçok çalışmanın aksine istatistiksel bir anlam taşımamaktaydı.

Melatonin önemli bir serbest radikal süpürücü, antioksidan ve immünmodülatördür. Günümüzde sadece pineal bezden değil, ovaryum, lens, kemik iliği ve sindirim sistemi organlarından salgılandığı bilinmektedir (Pandi-Perumal ve ark., 2008). 'Gece hormonu' olarak tanımlanan melatonin, onkostatik, antiinflamatuvar ve antikonvülzan etkilere ve ayrıca sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesi, reproduktif aksın düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Macchi ve Bruce, 2004). Melatonin bazen reseptörler aracılığı ile bazen de direkt olarak reseptörlere hiç ihtiyaç duymadan serbest radikalleri süpürebilir. Bu özelliğe ilaveten lipofilik yapısı sayesinde tüm bariyerleri kolayca geçebilir (Tan, 1993). Yapılan bir çalışmada yenidoğan sıçanlara uygulanan

hipoksi/iskemi modelinde LPS ile oluşturulan inflamasyon öncesinde verilen melatonin'in miyelinizasyonu artırdığı ve nöron morfolojisini düzelttiği görülmüştür (Hu ve ark., 2017). Young-Kuk Lee ve ark. kainik asitin sistemik olarak uygulanmasının yol açtığı poliamin seviyesindeki artışa bağlı olarak serebral korteks ve hipokampusda ortaya çıkan beyin ödemi ve nöronal hücre ölümüne karşı endojenik melatonin uygulamasının yararlı olduğunu saptamışlardır (Lee ve ark., 2000). Lee ve ark. gebe fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada 2 mg/kg LPS uygulamasından yarım saat önce 10 mg/kg dozunda verilen melatonin'in fetal beyin ve postnatal beyin üzerinde oluşturduğu etkiyi incelediler. Melatonin'in LPS ile indüklenen erken doğum riskini azalttığını gözlemlediler. Ayrıca H&E ve KV boyama metodları ile beyin korteksinin 6 farklı hücre tabakasını sağlıklı bir şekilde görerek iyileşmeyi ayırt ettiler (Lee ve ark., 2019). Melatonin'in inflamatuvar yanıtı, serebral ödem oluşumu ile KBB geçirgenliğini azalttığı bilinmektedir (Chen ve ark., 2006). Qin ve ark. NOTCH3/NF- κ B yolu üzerinden oluşturdukları nöroinflamasyon modelinde KBB'ni değerlendirmişler, vaskular endotelial kaderin, okludin, klaudin-5, ve ZO-1 ifadelerinin melatonin ile düzeldiğini belirlemişlerdir (Qin ve ark., 2019). Jumnonprakhon ve ark. yaşlı farelerin KBB'nin bütünlüğünü değerlendirmek için 1mg/kg LPS ile sepsis modeli oluşturmuşlar ve koruyucu olarak önceden verilen 10 mg/kg melatonin'in bariyer üzerinde etkisi incelenmişlerdir. Melatonin'in bağlantı proteinlerinden okludin ve klaudin-5'in ifadesini istatistiksel olarak artırdığını immünohistokimyasal boyama ve western blot yöntemleri ile saptamışlardır (Wang ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, hipoglisemik stresle indüklenen beyin endotelial hücre hasarında azalan okludin ve klaudin-5 ifadesinin melatonin aracılığı ile tekrar artırıldığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2017). Yenidoğan sıçanlara uygulanan hipoksi/iskemi modelinde LPS ile oluşturulan inflamasyon öncesinde koruyucu olarak verilen melatonin'in nöron morfolojisini düzeltmesinin yanı sıra KBB'nin permeabilitesini etkileyerek okludin ve klaudin-5 ifadesini anlamlı bir şekilde iyileştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada melatonin'in TLR-4/NF- κ B sinyal yolunu baskıladığı ifade edilmiştir (Hu ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda LPS ile artan inflamasyon belirteci olan TLR-4 ifadesinin melatonin uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı hem immünohistokimyasal boyama hem de western blot yöntemleri ile gösterilmiştir. Ayrıca yapılmış olan çalışmalarla uyumlu bir şekilde sepsis ile azalan okludin ifadesi koruyucu amaçlı uygulanan melatonin ile anlamlı bir şekilde artmıştı. ZO-1 ifadesi de yine

koruyucu amaçlı uygulanan melatonin ile istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış göstermişti.

Melatonin'in GSH-Px, SOD ve CAT gibi birçok antioksidan enzim aktivitesini uyardığı ve oksidatif stresle mücadele ettiği bilinmektedir (Reiter ve ark., 2007). Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada, beyin korteksinde gama-radyasyona bağlı olarak gelişen MDA düzeylerindeki artışın, melatonin uygulaması ile azaldığı ve lipid peroksidasyonun engellendiği belirlenmiştir (Erol ve ark., 2004). Yapılan bir başka çalışmada, formaldehit ile oluşturulan nörotoksisite sonucunda hipokampüste formaldehit ile birlikte uygulanan melatonin'in azalan SOD ve GSH-Px düzeyini arttırdığı ayrıca MDA düzeyini azalttığı ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir (İlter ve ark., 2007). Sıçanlarda kısa veya uzun süreli uygulanan melatonin'in beyin dokusunda Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve bu şekilde beyin dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğu ifade edilmiştir (Kotler ve ark., 1998). Ayrıca bir başka çalışmada gebe sıçanlara verilen melatonin'in plasentayı rahatlıkla aşabildiği ve fetüs beyininde SOD aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Burmistrov ve ark., 2001). *In vitro* ortamda yapılmış bir çalışmada LPS ile indüklenmiş inflamasyonda, melatonin'in BV-2 mikrogliyalarda IL-1 β ve TNF- α seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Park ve Chun, 2017). Hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda yapılan bir başka araştırmada LPS'in immatür sıçan beyininde oluşturduğu nöroinflamasyona bağlı olarak artan NF- κ B düzeyini melatonin'in istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düzelttiği belirtilmiştir (Shah ve ark., 2017). Yu ve ark. fare meme dokusu kültüründe LPS ile oluşturdukları nöroinflamasyon ile artan inflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve TNF- α seviyesinin melatonin ile azaldığını belirlemişlerdir (Yu ve Tan, 2019). Bir başka çalışmada beyin makrofaj RAW 264.7 ve BV2 mikrogliya hücre hattında ve fare menenjit modelinde LPS ile yüksek oranda artan NF- κ B bağlama aktivitesinin melatonin aracılığı ile azaldığı ifade edilmiştir (Chang ve ark., 2012). Doku MDA düzeyi açısından mevcut çalışmamız, yapılmış önceki çalışmalarla paralellik gösterdi. Çalışmamızda, doku MDA düzeyi 24 saatlik sepsis ile anlamlı bir şekilde artmıştı. Öncesinde uygulanan melatonin, bu düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı. Çalışmamızda elde ettiğimiz beyin dokularında ayrıca GSH-Px, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimleri ELISA yöntemi ile çalışıldı. GSH-Px enzim seviyesinin LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre azaldığı, LPS öncesinde verilen melatonin'in bu azalmayı baskıladığı saptandı. SOD ve CAT aktiviteleri ile ilgili sonuçlarımız literatürdeki diğer benzer çalışmalara

paralellik göstermedi. ELISA bulgularını inflamasyon belirteçleri açısından değerlendirdiğimizde IL-1 β , TNF- α ve NF- κ B seviyesinin koruyucu amaçlı verilen melatonin ile LPS grubuna nazaran çok küçük bir oranda azaldığını belirledik. Bir diğer belirteç olan TGF- β ile ilgili LPS nöroinflamasyonu karşısında melatonin'in koruyucu etkisine dair literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artan TGF- β seviyesini melatonin uygulaması istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmıştı.

Sepsis, ilerleyen tedavi protokollerine karşın, yüksek mortalite ve morbidite oranları sebebiyle insan sağlığı açısından çok önemli bir sorun olarak gözükmektedir. Her geçen gün yeni gelişmelerle sepsis patofizyolojisi ve histolojisi hakkında literatüre yeni bilgiler eklense de, halen aydınlatılması gereken bir çok nokta mevcuttur. KBB'ni oluşturan beyin kapiller endotel hücreleri normal koşullarda nöronal homeostazisi koruyarak başta nöronlar olmak üzere beyin parankiminde bulunan diğer hücrelerin fizyolojik koşullarda çalışmasını sağlar. Çalışmamızda sıçanlarda endotoksemiye bağlı olarak gelişen KBB değişikliklerini inceleyerek, bu değişiklikler üzerine farmakolojik dozda verilen melatonin'in etkilerini değerlendirdik. KBB'nin yapısına katılan çeşitli moleküllerin endotoksemiye bağlı olarak değiştiğini histokimyasal, immunohistokimyasal, western blot ve biyokimyasal yöntemler ile saptadık. Çalışmada, antiinflamatuvar özellikte bir hormon olan melatonin bu moleküller üzerinde beklediğimiz gibi koruyucu etki gösterdi. KBB'nin bozulmasıyla birlikte ortaya çıkması tahmin edilen inflamasyonda, inflamatuvar belirteçler açısından melatonin'in koruyuculuğu, literatürde mevcut çalışmalarda belirtilen sonuçlarla paralelliğe sahip değildi. Bütün bunlarla birlikte KBB hasarının neden olduğu çeşitli hastalıklara karşı ve ayrıca ilerleyen yaşlarda azalan bu hormonunun olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak adına, orta yaşlardan itibaren melatonin'in kullanılabileceği ve bu kullanımın da oldukça etkili olacağı düşüncesindeyiz.

6.KAYNAKLAR

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*, 2010; 37(1): 13-25.
- Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and molecular neurobiology*, 2005; 25(1): 5-23.
- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *The Journal of infectious diseases*, 2002; 186(10): 1522-5.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, 2004; 4(7): 499-511.
- Allison DJ, Ditor DS. The common inflammatory etiology of depression and cognitive impairment: a therapeutic target. *Journal of neuroinflammation*, 2014; 11(1): 151.
- Altinöz HC, Gökbudak R, Bayraktar A, Belli S. A pilot study of measurement of the frequency of sounds emitted by high-speed dental air turbines. *Journal of oral science*, 2001; 43(3): 189-92.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *The Lancet*, 2005; 365(9453): 63-78.
- Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep medicine reviews*, 2005; 9(1): 25-39.
- Arıncı K, Elhan A. *Anatomi* (5. Baskı), Güneş Kitabevi, Ankara 2001; ss 338-74.
- Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature*, 2010; 468(7323): 557-61.

- Arslantas MK, Cinel İ, Günerli A. Sepsis ve Ekstrakorporeal Membran Oksijenizasyonu/Sepsis and Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO). *Türk Yogun Bakim Dergisi*, 2013; 11(3): 86.
- Badshah H, Ali T, Rehman S-u, Amin F-u, Ullah F, Kim TH, et al. Protective effect of lupeol against lipopolysaccharide-induced neuroinflammation via the p38/c-Jun N-terminal kinase pathway in the adult mouse brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2016; 11(1): 48-60.
- Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of neuroinflammation*, 2015; 12(1): 223.
- Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2003; 284(6): L899-L914.
- Baron RM, Baron MJ, Perrella MA. Pathobiology of sepsis: are we still asking the same questions? *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2006; 34(2): 129-34.
- Baykal A, Iskit AB, Hamaloglu E, Guc MO, Hascelik G, Sayek I. Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNFalpha concentrations after lipopolysaccharide challenge. *The European journal of surgery*, 2000; 166(9): 722-7.
- Bendayan R, Lee G. Bendayan M. Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microscopy research and technique*, 2002; 57(5): 365-80.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Malecki A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacological reports : PR*, 2008; 60(5): 600-22.
- Bernard M, Guerlotte J, Greve P, Grechez-Cassiau A, Iuvone MP, Zatz M, Chong NW, Klein DC, Voisin P. Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Repr. Nutr. Dev*, 1999; 39: 325–334.
- Boado RJ, Pardridge WM. The Trojan horse liposome technology for nonviral gene transfer across the blood-brain barrier. *Journal of drug delivery*, 2011; 29: 61-51.

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 1992; 101(6): 1644-55.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, 1992; 101(6): 1644-55.
- Burmistrov SO, Arutyunyan AV, Stepanov MG, Oparina TI, Prokopenko VM. Effect of chronic inhalation of toluene and dioxane on activity of free radical processes in rat ovaries and brain. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2001; 132(3): 832-6.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *Journal of pineal research*, 1995; 18(4): 222-6.
- Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG. Differential roles of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain research*, 2003; 975(1-2): 37-47.
- Campese VM. Oxidative stress and sympathetic activity in hypertension. *American journal of hypertension*, 2010; 23(5): 456.
- Carneiro J. *Temel Histoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2006.
- Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *Journal of neuroinflammation*, 2014; 11(1): 1-15.
- Cemeli E, Smith IF, Peers C, Urenjak J, Godukhin OV, Obrenovitch TP, et al. Oxygen-induced DNA damage in freshly isolated brain cells compared with cultured astrocytes in the Comet assay. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 2003; 23(S2): 43-52.
- Chang CC, Tien CH, Lee EJ, Juan WS, Chen YH, Hung YC, et al. Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 and BV2 cells and a mouse model of meningitis. *Journal of pineal research*, 2012; 53(2): 188-97.

- Chen TY, Lee MY, Chen HY, Kuo YL, Lin SC, Wu TS, et al. Melatonin attenuates the postischemic increase in blood–brain barrier permeability and decreases hemorrhagic transformation of tissue-plasminogen activator therapy following ischemic stroke in mice. *Journal of pineal research*, 2006; 40(3): 242-50.
- Chen XM, O'Hara SP, Nelson JB, Splinter PL, Small AJ, Tietz PS, et al. Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense responses to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF- κ B. *The Journal of Immunology*, 2005; 175(11): 7447-56.
- Chern CM, Liao J-F, Wang Y-H, Shen Y-C. Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012; 52(9): 1634-47.
- Choi JJ, Choi YJ, Chen L, Zhang B, Eum SY, Abreu MT, et al. Lipopolysaccharide potentiates polychlorinated biphenyl-induced disruption of the blood–brain barrier via TLR-4/IRF-3 signaling. *Toxicology*, 2012; 302(2-3): 212-20.
- Constable PD. *General Medicine* (10th ed), Veterinary Medicine Ed Radostits OM, Salinders, USA 2007; pp 51:58.
- Cornford EM, Hyman S. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx*, 2005; 2(1): 27-43.
- Davies B, Cohen J. Endotoxin removal devices for the treatment of sepsis and septic shock. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011; 11(1): 65-71.
- Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *British Journal of Surgery*. 1997;84(7):920-35.
- Deng S, Ai Y, Gong H, Feng Q, Li X, Chen C, et al. Mitochondrial dynamics and protective effects of a mitochondrial division inhibitor, Mdivi-1, in lipopolysaccharide-induced brain damage. *Biochemical and biophysical research communications*, 2018; 496(3): 865-71.
- Doğan T. *Fonksiyonel Nöroanatomî*, Ankara Metu Pres, Ankara 2005; ss 89-97.
- Doğanay M. *Sepsis İnfeksiyon Hastalıkları Kitabı*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 1996; pp 473-85.
- Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends in pharmacological sciences*, 1995; 16(2): 50-6.

- Dunn DL. Gram-negative bacterial sepsis and sepsis syndrome. *Surgical clinics of North America*, 1994; 74(3): 621-35.
- Duvernoy HM. *The Human Hippocampus* (3rd Edition ed), Berlin Springer-Verlag, 2005.
- Eckman PL, King WM, Brunson JG. Studies on the blood brain barrier: I. Effects produced by a single injection of gram-negative endotoxin on the permeability of the cerebral vessels. *The American journal of pathology*, 1958; 34(4): 631.
- Ehrlich P. *Das sauerstoff-bedurfnis des organismus, Eine farbenanalytische studie*, 1885.
- Ehrlich P. *Über die Beziehung chemischer Constitution. Verteilung, und pharmakologischer Wirkung*, 1904.
- Ek CJ, Wong A, Liddelow SA, Johansson PA, Dziegielewska KM, Saunders NR. Efflux mechanisms at the developing brain barriers: ABC-transporters in the fetal and postnatal rat. *Toxicology letters*, 2010; 197(1): 51-9.
- Erdem M, Bostan B, Güneş T, Özkan F, Şen C, Özyurt H, et al. Melatoninin iskelet kası iskemi-reperfüzyon yaralanması üzerine koruyucu etkisi. *Joint Diseases and Related Surgery*, 2010; 21(3): 166-71.
- Erol FS, Topsakal C, Ozveren MF, Kaplan M, Ilhan N, Ozercan IH, et al. Protective effects of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation. *Neurosurgical review*, 2004; 27(1): 65-9.
- Ersahin M, Toklu HZ, Çetinel Ş, Yüksel M, Yeğen BÇ, Şener G. Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. 2009; 46(3): 324-32.
- Eşrefoğlu M, Gül M, Emre MH, Polat A, Selimoglu MA. Protective effect of low dose of melatonin against cholestatic oxidative stress after common bile duct ligation in rats. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2005; 11(13): 1951.
- Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul 2016.
- Dere F. *Nöroanatomi- Fonksiyonel Nöroloji Atlası ve Ders Kitabı*, Adana Nobel Tıp Kitap Evi, Adana 2000.
- Facheris M, Beretta S, Ferrarese C. Peripheral markers of oxidative stress and excitotoxicity in neurodegenerative disorders: tools for diagnosis and therapy? *Journal of Alzheimer's Disease*, 2004; 6(2): 177-84.

- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273(45): 29745-53.
- Fışgın NT. Sepsis. *OMÜ Tıp Dergisi*, 2004; 21(2): 100-9.
- Fricker G, Ott M, Mahringer A. *The blood brain barrier (BBB)*, Springer, 2014.
- Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Critical care clinics*, 2009; 25(1): 83-101.
- Gabellec MM, Griffais R, Fillion G, Haour F. Expression of interleukin 1 α , interleukin 1 β and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Molecular brain research*, 1995; 31(1-2): 122-30.
- García-Santos G, Antolín I, Herrera F, Martín V, Rodríguez-Blanco J, Carrera MdP, et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *Journal of pineal research*, 2006; 41(2): 130-5.
- Gartner PG HJ. *Color text Book of Histology* (3rd ed ed), WB Saunders Co, 2006.
- Germano AF, Tomasello F. *Blood-Brain Barrier Permeability Changes after Subarachnoid Haemorrhage: An Update: An Update: Clinical Implications, Experimental Findings, Challenges, and Future Directions*: Springer Science & Business Media; 2001.
- Gerros TC, Semrad SD, Proctor RA. Alterations in clinical, hematological and metabolic variables in bovine neonatal endotoxemia. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1995; 59(1): 34.
- Gerzanich V, Stokum JA, Ivanova S, Woo SK, Tsymbalyuk O, Sharma A, et al. Sulfonylurea receptor 1, transient receptor potential cation channel subfamily M member 4, and KIR6. 2: role in hemorrhagic progression of contusion. *Journal of neurotrauma*, 2019; 36(7): 1060-79.
- Goldmann EE. *Vitalfarbung am zentralnervensystem*, Abhandl Konigl preuss Akad Wiss 1913; pp 1-60.
- Gonca O, Türközkan N, Bircan FS, Balabanli B. Endotoksemi Modelinde Taurinin Beyin Dokusu Enerji Durumu Ve Malondialdehit Düzeylerine Etkisi Effect of Taurine on Brain Energy Status and Malondialdehyde Levels in Endotoxemia Model. *Bozok Tıp Dergisi*, 2018; 8(1): 11-7.

- Gorbet MB, Sefton MV. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*, 2005; 26(34): 6811-7.
- Gökmen FG. Sistematik Anatomi, Güven Kitabevi, İzmir 2003.
- Gürkan ÖU, ÇObanli B. SEPSİS ve SEPTİK ŞOK. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 1999; 52(01).
- Hardaway RM. A review of septic shock. *The American Surgeon*, 2000; 66(1): 22.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006; 38(3): 313-6.
- Hardeland R, Poeggeler B. Melatonin beyond its classical functions. *The Open Physiology Journal*, 2008; 1: 1-22.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *The Journal of cell biology*, 1998; 141(1): 199-208.
- Hawkins BT, Abbruscato TJ, Eggleton RD, Brown RC, Huber JD, Campos CR, et al. Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain research*, 2004; 1027(1-2): 48-58.
- Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*, 2005; 57(2): 173-85.
- He F, Peng J, Deng XL, Yang LF, Wu LW, Zhang CL, et al. RhoA and NF- κ B are involved in lipopolysaccharide-induced brain microvascular cell line hyperpermeability. *Neuroscience*, 2011; 188: 35-47.
- Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 2001; 153(3): 543-54.
- Hendriks JJA, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, 2005; 48(2): 185-95.
- Hillhouse EW, Mosley K. Peripheral endotoxin induces hypothalamic immunoreactive interleukin-1 β in the rat. *British journal of pharmacology*, 1993; 109(2): 289-90.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, et al. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *Journal of cell science*, 1997; 110(14): 1603-13.

- Hladky SB, Barrand MA. Fluid and ion transfer across the blood–brain and blood–cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2016; 13(1): 19.
- Howarth AG, Hughes MR, Stevenson BR. Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1992; 262(2): C461-C9.
- Hu Y, Wang Z, Pan S, Zhang H, Fang M, Jiang H, et al. Melatonin protects against blood-brain barrier damage by inhibiting the TLR-4/NF- κ B signaling pathway after LPS treatment in neonatal rats. *Oncotarget*, 2017; 8(19): 31638.
- Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends in neurosciences*, 2001; 24(12): 719-25.
- Iraz M, Iraz M, Eşrefoğlu M, Aydın MŞ. Protective effect of beta-glucan on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2015; 45(2): 261-7.
- İskit AB, Guc MO. The timing of endothelin and nitric oxide inhibition affects survival in a mice model of septic shock. *European journal of pharmacology*, 2001; 414(2-3): 281-7.
- İskit AB, Guc O. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock. *Acta pharmacologica Sinica*, 2003; 24(10): 953-7.
- İlter K, Zararsiz İ, Ögetürk M, Yilmaz HR. Formaldehit Nörotoksitesine Bağlı Hipokampusta Gelişen Oksidatif Hasar ve Melatonin Hormonunun Koruyucu Etkisi: Deneysel Bir Çalışma. *Fırat Tıp Dergisi*, 2007; 12(4): 256-60.
- İskit AB. Sepsiste deneysel modeller. *Yoğun Bakım Dergisi*, 2005 ;5(2) :133-6.
- Jangula A, Murphy EJ. Lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability is enhanced by alpha-synuclein expression. *Neuroscience letters*, 2013; 551: 23-7.
- Jeong SM, Hahm KD, Shin JW, Leem JG, Lee C, Han SM. Changes in magnesium concentration in the serum and cerebrospinal fluid of neuropathic rats. *Acta anaesthesiologica scandinavica*, 2006; 50(2): 211-6.

- Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood–brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2011; 44(2): 130-9.
- Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wu HY, Wen ST. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *Journal of pineal research*, 2004; 37(1): 55-70.
- Kaçmaz A, User EY, Şehirli AÖ, Tilki M, Ozkan S, Şener G. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surgery today*, 2005; 35(9): 744-50.
- Kang Q, Chen Y, Zhang X, Yu G, Wan X, Wang J, et al. Heat shock protein A12B protects against sepsis-induced impairment in vascular endothelial permeability. *Journal of Surgical Research*, 2016; 202(1): 87-94.
- Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2016; 1(1): 65-76.
- Kheir-Eldin AA, Motawi TK, Gad MZ, Abd-ElGawad HM. Protective effect of vitamin E, β -carotene and N-acetylcysteine from the brain oxidative stress induced in rats by lipopolysaccharide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001; 33(5): 475-82.
- Khodir AE, Ghoneim HA, Rahim MA, Suddek GM. Montelukast attenuates lipopolysaccharide-induced cardiac injury in rats. *Human & experimental toxicology*, 2016; 35(4): 388-97.
- Kotler M, Rodríguez C, Sáinz RM, Antolin I, Menéndez-Peláez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *Journal of pineal research*, 1998; 24(2): 83-9.
- Köse K. Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü [Melatonin: The antioxidant power of darkness]. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi/Erciyes Univ. J Health Sci*, 2004; 13: 56-65.
- Kuş İ, Sarsilmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2002; 22(2): 221-6.
- Lee JY, Song H, Dash O, Park M, Shin NE, McLane MW, et al. Administration of melatonin for prevention of preterm birth and fetal brain injury associated with

- premature birth in a mouse model. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2019; 82(3): e13151.
- Lee YK, Lee SR, Kim CY. Melatonin attenuates the changes in polyamine levels induced by systemic kainate administration in rat brains. *Journal of the neurological sciences*, 2000; 178(2): 124-31.
- Leon J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of pineal research*, 2005; 38(1): 1-9.
- Lewandowsky M. Zur lehre der cerebrospinal flussigkeit. *Z klin Med*, 1909; 40: 480-94.
- Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla A. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurgery Clinics*, 2007; 18(1): 81-92.
- Lippoldt A, Kniesel U, Liebner S, Kalbacher H, Kirsch T, Wolburg H, et al. Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood–brain barrier endothelial cells. *Brain research*, 2000; 885(2): 251-61.
- Liu J, Wang J, Luo H, Li Z, Zhong T, Tang J, et al. Screening cytokine/chemokine profiles in serum and organs from an endotoxic shock mouse model by LiquiChip. *Science China Life Sciences*, 2017; 60(11): 1242-50.
- Liu N, Li A-L, Zhou X-P, Chen Q, Cao W. P120 catenin attenuates lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier dysfunction and inflammatory responses in human brain microvascular endothelial cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015; 8(4): 4204.
- Lohuis JAC, Verheijden JHM, Burvenich C, Van Miert A. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants: 2. Metabolic aspects. *Veterinary Quarterly*, 1988; 10(2): 117-25.
- López-Burillo S, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and α -lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *Journal of pineal research*, 2003; 34(4): 269-77.
- Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in neuroendocrinology*, 2004; 25(3-4): 177-95.

- Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of pineal research*, 2015; 59(4): 403-19.
- Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 1997; 91(3): 295-8.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997; 388(6640): 394-7.
- Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, WB Saunders, Philadelphia 1998.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human-E-Book: Clinically Oriented Embryology*, Elsevier Health Sciences, 2018.
- Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 2007; 27(6): 687-94.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nature Reviews Neuroscience*, 2002; 3(3): 216-27.
- Nicaise C, Mitrecic D, Demetter P, De Decker R, Authelet M, Boom A, et al. Impaired blood–brain and blood–spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain research*, 2009; 1301: 152-62.
- Ning Q, Liu Z, Wang X, Zhang R, Zhang J, Yang M, et al. Neurodegenerative changes and neuroapoptosis induced by systemic lipopolysaccharide administration are reversed by dexmedetomidine treatment in mice. *Neurological research*, 2017; 39(4): 357-66.
- Nischwitz V, Berthele A, Michalke B. Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: an approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier. *Analytica chimica acta*, 2008; 627(2): 258-69.
- Nolan Y, Vereker E, Lynch AM, Lynch MA. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. *Experimental neurology*, 2003; 184(2): 794-804.

- Odaci E, Kaplan S. Melatonin and nerve regeneration. *International review of neurobiology*, 2009; 87: 317-35.
- Omurtag GZ, Tozan A, Şehirli AÖ, Şener G. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *Journal of pineal research*, 2008; 44(4): 432-8.
- Öz H. Sepsis ve Organ Yetersizlikleri: Koagülasyon. Dikmen Y, Demirkıran O (Editörler) *Güncel bilgiler ışığında sepsis*. 2006;51:27-9.
- Özgüner F, Özçankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S. Melatonin ve klinik önemi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 1995; 2(4): 1-6.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJM, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in neurobiology*, 2008; 85(3): 335-53.
- Pardridge WM. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron*, 2002; 36(4): 555-8.
- Pardridge WM. *Introduction to the blood-brain barrier: methodology, biology and pathology*, Cambridge University Press, 2006.
- Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR-4 complexes. *Experimental & molecular medicine*, 2013; 45(12): e66-e.
- Park E, Chun HS. Melatonin attenuates manganese and lipopolysaccharide-induced inflammatory activation of BV2 microglia. *Neurochemical research*, 2017; 42(2): 656-66.
- Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New England Journal of Medicine*, 1993; 328(20): 1471-7.
- Paulson OB. Blood–brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *European Neuropsychopharmacology*, 2002; 12(6): 495-501.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 2006; 443(7112): 700-4.
- Pollay M, Roberts PA. Blood-brain barrier: a definition of normal and altered function. *Neurosurgery*, 1980; 6(6): 675-85.
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu M-Y, Van Huffel C, Birdwell D, et al. Erratum: Genetic and physical mapping of the Lps locus: Identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 1999; 25(1): 78.

- 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): 453-62.
- Qin W, Li J, Zhu R, Gao S, Fan J, Xia M, et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging*, 2019; 11(23): 11391.
- Quan N, Whiteside M, Herkenham M. Time course and localization patterns of interleukin-1 β messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*, 1998; 83(1): 281-93.
- Qureshi ST, Gros P, Malo D. The Lps locus: genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflammation Research*, 1999; 48(12): 613-20.
- Raza SS, Khan MM, Ahmad A, Ashafaq M, Khuwaja G, Tabassum R, et al. Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain research*, 2011; 1420: 93-105.
- Reinhold AK, Rittner HL. Barrier function in the peripheral and central nervous system a review. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2017; 469(1): 123-34.
- Reiter, RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 1993; 49: 654–664.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and metabolic research*, 1997; 29(08): 363-72.
- Reiter RJ, Tan D-x, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 2003; 50(4): 1129-46.
- Reiter RJ, Tan D-x, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica*, 2007; 54(1): 1-9.
- Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism*, 2003; 17(2): 273-85.

- Reppart SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in pharmacological sciences*, 1996; 17(3): 100-2.
- Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *Journal of clinical immunology*, 2000; 20(3): 161-6.
- Roberts KM, Fitzpatrick PF. Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase. *IUBMB life*, 2013; 65(4): 350-7.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, 2004; 36(1): 1-9.
- Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews*, 1997; 77(3): 731-58.
- Rosales-Corral S, Tan D-X, Reiter RJ, Valdivia-Velázquez M, Acosta-Martínez JP, Ortiz GG. Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid- β onto the hippocampus in vivo. *Journal of Neuroimmunology*, 2004; 150(1-2): 20-8.
- Ross Michael H . *Histoloji Konu Anlatımlı Ve Atlas*, Palme Yayıncılık, Ankara 2014.
- Diker S. *İmmünoloji*, Medisan 2005, ss 191-3.
- Silverstein P, Shah A, Weemhoff J, Kumar S, P Singh D, Kumar A. HIV-1 gp120 and drugs of abuse: interactions in the central nervous system. *Current HIV research*, 2012; 10(5): 369-83.
- Snell R. *Klinik Nörotomi, Nörol Tıp Kitabevi*, 2011, pp 197-8.
- Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: evolving concepts and challenges. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2019; 52(4).
- Santhanasabapathy R, Sudhandiran G. Farnesol attenuates lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in Swiss albino mice by regulating intrinsic apoptotic cascade. *Brain research*, 2015; 1620: 42-56.
- Schulz P, Steimer T. Neurobiology of circadian systems. *CNS drugs*, 2009; 23(2): 3-13.
- Sebai H, Gadacha W, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Ben-Attia M. Protective effect of resveratrol against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat brain. *Brain Injury*, 2009; 23(13-14): 1089-94.

- Sener G, Sehirli AÖ, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BÇ. The protective effect of melatonin on renal ischemia–reperfusion injury in the rat. *Journal of pineal research*, 2002; 32(2): 120-6.
- Sener G, Tosun O, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoğlu-Dülger G. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life sciences*, 2003; 72(24): 2707-18.
- Shah SA, Khan M, Jo MH, Jo MG, Amin FU, Kim MO. Melatonin stimulates the SIRT1/Nrf2 signaling pathway counteracting lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress to rescue postnatal rat brain. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2017; 23(1): 33-44.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*, 2016; 315(8): 801-10.
- Smith BP. *Large animal internal medicine* (5th Edition), Mosby-Year Book, 1996.
- Somjen GG. *Ions in the brain: normal function, seizures, and stroke*, Oxford University Press, 2004.
- Song Y, Qin L, Yang R, Yang F, Kenechukwu NA, Zhao X, et al. Inhibition of HDAC6 alleviating lipopolysaccharide-induced p38MAPK phosphorylation and neuroinflammation in mice. *Pharmaceutical biolog*, 2019; 57(1): 263-8.
- Syed IB. *Islamic Medicine: 1000 years ahead of its times*. Jishim, 2002; 2: 2-9.
- Şener G, Şehirli AÖ, Şatiroğlu H, Keyer-Uysal M, Yeğen BÇ. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns*, 2002; 28(5): 419-25.
- Şener G, Toklu H, Ercan F, Erkanlı G. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *International immunopharmacology*, 2005; 5(9): 1387-96.
- Şener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanlı G, Kaçmaz A, et al. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surgery today*, 2005; 35(1): 52-9.
- Şener G. Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*, 2010; 14: 112-120.

- Taguchi T, Testa JR, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*, 1996; 32(3).
- Tan DX. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr j*, 1993; 1: 57-60.
- Taner D, Akşit D, Cumhuri M, İlgi S, Kural E, Başar R, Önderoğlu S, Tuncel M, Çelik H, Sargon MF, Sürücü S, Taşcıoğlu B, Yener N, Durgun B, Atasever A, Özkul E. *Fonksiyonel Nöroanatomi*, ODTÜ yayınevi, Ankara 2007, pp 49-88.
- The university of Arizona Health Sciences center web site Available at: [<http://users.ahsc.arizona.edu.tr>], Erişim tarihi: 9 Ağustos 2020
- Tizard IR. *Veterinary Immunology* (7th Edition ed), An Introduction, Saunders 2004.
- Tocharus J, Khonthun C, Chongthammakun S, Govitrapong P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *Journal of pineal research*, 2010; 48(4): 347-52.
- Tornavaca O, Chia M, Dufton N, Almagro LO, Conway DE, Randi AM, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *Journal of Cell Biology*, 2015; 208(6): 821-38.
- Tresguerres JAF, Kireev R, Tresguerres AF, Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2008; 108(3-5): 318-26.
- Tuğrul T, Ersoy F. Dostu düümanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll-like reseptörler (TLR). *Acta Medica*, 2004; 35(2): 114-8.
- Turrin NP, Gayle D, Ilyin SE, Flynn MC, Langhans W, Schwartz GJ, et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain research bulletin*, 2001; 54(4): 443-53.
- Sadler TW. *Langman's medikal embriyoloji*, 2005, pp 209-18.
- Varadaradjalou S, Féger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR-4 differentially activate human mast cells. *European journal of immunology*, 2003; 33(4): 899-906.
- Vasson MP, Reimund JM. Immune activation and nutritional status in adult Crohn's disease patients. *Dig Liver Dis*, 2005; 37(6): 424-31.

- Wang Ck, Ahmed MM, Jiang Q, Lu Nn, Tan C, Gao Yp, et al. Melatonin ameliorates hypoglycemic stress-induced brain endothelial tight junction injury by inhibiting protein nitration of TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator. *Journal of pineal research*, 2017; 63(4): 124-40.
- Wang P, You SW, Yang YJ, Wei XY, Wang YZ, Wang X, et al. Systemic injection of low-dose lipopolysaccharide fails to break down the blood–brain barrier or activate the TLR-4-MyD88 pathway in neonatal rat brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014; 15(6): 10101-15.
- Wang Q, Liu C. Protective effects of quercetin against brain injury in a rat model of lipopolysaccharide-induced fetal brain injury. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 2018; 71: 175-80.
- Wang X, Xue GX, Liu WC, Shu H, Wang M, Sun Y, et al. Melatonin alleviates lipopolysaccharide-compromised integrity of blood–brain barrier through activating AMP-activated protein kinase in old mice. *Aging Cell*, 2017 ;16(2): 414-21.
- Wang X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2009 ;15(4): 345-57.
- Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *The New England journal of medicine*, 1999; 340(3): 207-14.
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature neuroscience*, 2011; 14(11): 1398.
- Wu C, Ivars F, Anderson P, Hallmann R, Vestweber D, Nilsson P, et al. Endothelial basement membrane laminin $\alpha 5$ selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nature medicine*, 2009; 15(5): 519.
- Yeğenağa I. Sepsis ve akut böbrek yetmezliğinde hemodinamik ve patofizyolojik değişiklikler. *Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi*, 2006; 15(1): 25-34.
- Yıldırım M. İnsan Anatomisi (10.baskı), İstanbul Nobel Tıp Kitabevi, 2016, ss 16-24.
- Yorulmaz H, Öztaş B, Ozdıllı K. Enfeksiyonlar ve Kan-Beyin Engeli. *Journal of Cell & Molecular Biology*, 2010; 8(2).

- Yu GM, Tan W. Melatonin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in cultured mouse mammary tissue. *Mediators of Inflammation*, 2019; 2019: 1-9.
- Zhang J, Yu C, Zhang X, Chen H, Dong J, Lu W, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR-4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *Journal of neuroinflammation*, 2018; 15(1): 1-14.
- Zhou J, Deng Y, Li F, Yin C, Shi J, Gong Q. Icariside II attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation through inhibiting TLR-4/MyD88/NF- κ B pathway in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019; 111: 315-24.
- Zhou T, Zhao L, Zhan R, He Q, Tong Y, Tian X, et al. Blood–brain barrier dysfunction in mice induced by lipopolysaccharide is attenuated by dapson. *Biochemical and biophysical research communications*, 2014; 453(3): 419-24.



T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2018/131

28.06.2018

KONU: Sn. Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU

Sayın, Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU

“Endotokseminin neden olduğu kan beyin bariyeri hasarı üzerine melatoninin koruyucu etkisi” başlıklı projenize ait başvurunuz 28.06.2018 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ömer UYSAL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Şerife GÖNCÜ
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

ENDOTOKSEMİNİN NEDEN OLDUĞU KAN BEYİN BARIYERİ HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN KORUYUCU ETKİSİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 11	% 11	% 5	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	marmarapharmaceuticaljournal.com İnternet Kaynağı	% 1
2	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	fr.slideshare.net İnternet Kaynağı	% 1
4	alternatiftedaviler.com İnternet Kaynağı	% 1
5	www.turkishjic.org İnternet Kaynağı	% 1
6	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikerisim.nku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	fedorabg.bg.ac.rs İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

- **Adı Soyadı** : Kübra Tuğçe KALKAN
- **Doğum Yeri ve Tarihi** : Kadıköy-23.12.89
- **Medeni Durumu** : Evli
- **Mail** : ktugce.kalkan@gmail.com
- **Telefon** : 05557175875

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Erciyes Üniversitesi- Fen Fakültesi	2007-2011
Yüksek Lisans	Histoloji-Embriyoloji	Erciyes Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2012-2015
Doktora	Histoloji-Embriyoloji	Erciyes Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2016-2020

İŞ DENEYİMLERİ

- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Fatih/ İstanbul (12.03.2018 -23.11.2020)-Araştırma Görevlisi

VERDİĞİ DERSLER

- Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Pratikleri (Dönem 1-Dönem 2)
- Diş Hekimliği Histoloji Embriyoloji Pratikleri (Dönem 1-Dönem 2)
- Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Patoloji Laboratuvar Teknikleri Histoloji Embriyoloji Pratikleri

MAKALELER

1. Bastug O, **Cilenk KT**, Korkmaz L, Korkut S, Ozturk MA., et al.Can lycopene eliminate the harmful effects of hyperoxia in an immature brain? Arch Argent Pediatr. 2019 Aug 1;117(4):237-244.
2. Bastug O, Sonmez MF, Ozturk MA, Korkmaz L, Kesici H, **Cilenk KT**., et al.Effects of Lycopene in Hyperoxia-Induced Lung Injury in Newborn Rats. Int J Vitam Nutr Res. 2018 Dec;88(5-6):270-280.

3. **Cilenk KT.**, Öztürk İ., Sönmez MF. Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. *Experimental and Molecular Pathology*. 2016 Oct;101(2):207-213.
4. Sönmez MF., **Cilenk KT.**, Karabulut D., Ünalmiş S., Deligönül E., Öztürk İ., et al. Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016 Apr;79:44-51.
5. Güneş MS ., Külahlı I., Kökoğlu K., Vural A., Avcı D., Güleç S., et al. Evaluation of the effect of intranasal infiltrated botulinum toxin-A on a model of allergic rhinitis in rabbits: An Experimental Study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2016 Apr;83:51-6.
6. Argun M, Üzüm K, Sönmez MF, Özyurt A, Derya K, **Cilenk KT.**, et al. Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anatol J Cardiol*. 2016 Apr; 16(4): 234–241.
7. Sönmez M.F., Kiliç E., Karabulut D., **Cilenk KT.**, Deligönül E., Dündar M. Nitric oxide synthase in diabetic rat testicular tissue and the effects of pentoxifylline therapy. *Systems Biology In Reproductive Medicine*. 2016;62(1):22-30.
8. M Sönmez, Eser Kılıç, Derya Karabulut, Kübra Tuğçe Çilenk, Erkan Deligönül, Munis Dündar. The levels of NOS in rat testicular tissue damage created by diabetes and pentoxifylline therapy: *Acta Physiologica* 2015/11, 215.
9. The Cell Membrane: A historical narration. **Kalkan KT.**, Eşrefoğlu M. *Bezmialem Science* 2020;8(1):81-88.