



**SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİT İLE
OLUŞTURULAN KRONİK NÖROİNFLAMASYON
MODELİNDE BETÜLİNİK ASİDİN YANGI VE APOPTOZ
İNTRİNSİK YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Selahattin TUNÇ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

Doktora Tezi - 2026

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİT İLE OLUŞTURULAN KRONİK
NÖROİNFLAMASYON MODELİNDE BETÜLİNİK ASİDİN YANGI VE
APOPTOZ İNTRİNSİK YOLAĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Selahattin TUNÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Prof. Dr. Hasan ÖZEN
Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU
Doç. Dr. Onural ÖZHAN

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TDK-
2024-3425 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA
2026

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Sıçanlarda Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Kronik Nöroinflamasyon Modelinde Betülinik Asidin Yangı ve Apoptoz İntrinsik Yolağı Üzerine Etkileri” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

19 / 06 / 2026

Selahattin TUNÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nöroinflamasyon	3
2.1.1. Nöroinflamasyonda NF-κB Sinyal Yolağı	5
2.1.2. Nöroinflamasyonda Apoptoz.....	6
2.1.3. Nöroinflamasyonda Oksidatif Stres.....	8
2.1.4. Nöroinflamasyona Eşlik Eden Sistemik Biyokimyasal Bulgular.....	10
2.2. Lipopolisakkarit (LPS)	12
2.3. Betülinik Asit (BA).....	15
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	19
3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler.....	19
3.3. Gruplandırma ve Model Oluşturulması	20
3.4. Biyokimyasal Analizler.....	21
3.4.1. Malondialdehit Analizi (MDA).	22
3.4.2. Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz Analizi (Cu-Zn SOD).....	22
3.4.3. Redükte Glutasyon Analizi (GSH).....	23
3.4.4. Protein Tayini	24
3.4.5. ELISA Analizleri	24
3.5. Moleküler Genetik Analizler.....	25

3.5.1. RNA Saflaştırma.....	25
3.5.2. cDNA Sentezi.....	27
3.5.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-qPZT) Analizi.....	28
3.6. Histopatolojik Analizler.....	29
3.7. İstatistiksel Analizler.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Serum Biyokimya Sonuçları.....	30
4.2. Beyin Dokusu MDA, GSH Seviyeleri ve SOD Aktivitesi.....	32
4.3. Doku ve Serum ELISA Analiz Sonuçları.....	35
4.4. Gerçek Zamanlı RT-qPZT Sonuçları.....	36
4.5. Histopatoloji.....	42
5. TARTIşMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	56
EKLER.....	70
EK-1. Özgeçmiş.....	70
EK-2. Etik Kurul Kararı.....	71
EK.3. Primer Dizileri.....	72

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her aşamasında, engin bilgi birikimi ve yapıcı yönlendirmeleriyle bana bilimsel disiplini aşılayan, çalışmamın akademik derinliğe ulaşmasında kilit rol oynayan değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez İzleme Komitemde yer alarak, eleştirel gözleriyle çalışmama değer katan ve bilimsel standartları yükseltmeme yardımcı olan kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ ve Sayın Doç. Dr. Onural ÖZHAN'a katkıları için özel teşekkür ederim.

Tezin hazırlanma sürecindeki değerli katkıları, akademik desteği ve dostluğu için Dr. Merve DURHAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesine sağladıkları maddi destek nedeniyle İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje No: TDK-2024-3425) teşekkür ederim.

Son olarak, eğitim hayatım boyunca bana verdikleri kesintisiz manevi destek, sabır ve güvenle bu akademik yolculuğun tamamlanmasını sağlayan değerli aileme en derin minnet duygularımı belirtmek isterim.

Selahattin TUNÇ

ÖZET

Sıçanlarda Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Kronik Nöroinflamasyon Modelinde Betülinik Asidin Yangı ve Apoptoz İntrinsik Yolağı Üzerine Etkileri

Amaç: Bu tez çalışmasında, lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan deneysel nöroinflamasyon modelinde betülinik asidin inflamasyon ve intrinsik apoptotik yolak üzerindeki etkileri; moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Kontrol, LPS, BA ve BA+LPS olmak üzere dört grupta yer alan sıçanlara 28 gün boyunca aralıklı olarak LPS (1 mg/kg, i.p.) ve betülinik asit (10 mg/kg, i.p.) uygulandı. Serum ve beyin dokusu örneklerinde rutin biyokimyasal analizler ile oksidatif stres parametreleri (MDA, SOD, GSH) çalışılmıştır. Belirlenen kilit belirteçler (CASP3, CASP9, BAX, BCL-2, NF- κ B ve Cyt c) serum ve beyin örneklerinde ELISA, beyin dokusunda ise RT-qPCR yöntemiyle analiz edilmiş; ayrıca beyin dokusunun genel morfolojik durumu histopatolojik incelemelerle değerlendirilmiştir.

Bulgular: Serum sistemik biyokimyasal analizlerinde LPS grubunda BUN, total protein, direkt bilirubin, sodyum ve klor düzeyleri artarken, kalsiyum düzeyleri azaldı ($P < 0.05$). BA uygulamasının bazı biyokimyasal parametrelerde düzenleyici etkiler oluşturduğu görüldü. Oksidatif stres analizlerinde BA+LPS grubunda MDA düzeyi artarken, LPS grubunda GSH ve SOD düzeyleri yüksek bulundu ($P < 0.05$). Doku ELISA analizlerinde BA grubunda CASP3, BA+LPS grubunda ise Cyt c düzeyleri arttı ($P < 0.05$). Serum ELISA sonuçlarında BA+LPS grubunda Cyt c yüksek, BCL-2 düşük saptandı ($P < 0.05$). Gen ifade analizlerinde NF- κ B gen ifadesi LPS grubunda artarken, BA ve BA+LPS gruplarında baskılandı; Cyt c gen ifadesi LPS ve BA+LPS gruplarında artış gösterirken, *BCL2* gen ifadesi BA ve BA+LPS gruplarında düşük bulundu ($P < 0.05$). Histopatolojik incelemelerde LPS grubunda infiltrasyon, ödem, hiperemi ve kanama bulguları gözlenirken, BA uygulanan gruplarda bu değişikliklerin azaldığı görüldü.

Sonuç: Betülinik asidin, LPS ile oluşturulan deneysel nöroinflamasyon modelinde inflamatuvar, oksidatif ve mitokondriyal apoptotik süreçler üzerinde düzenleyici/nöroprotektif etkiler gösterebileceği değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Betülinik Asit, LPS, Nöroinflamasyon, Apoptoz, Yangı

ABSTRACT

Effects of Betulinic Acid on Inflammation and Apoptosis Intrinsic Pathway in a Chronic Neuroinflammation Model Induced by Lipopolysaccharide in Rats

Aim: This thesis aimed to evaluate the effects of betulinic acid on inflammation and the intrinsic apoptotic pathway in a lipopolysaccharide (LPS)-induced experimental neuroinflammation model using molecular, biochemical, and histopathological analyses.

Material and Method: Rats were divided into four groups: Control, LPS, BA, and BA+LPS. LPS (1 mg/kg, i.p.) and betulinic acid (10 mg/kg, i.p.) were administered intermittently for 28 days. Brain tissue and serum samples were analyzed for systemic biochemical parameters and CASP3, CASP9, BAX, BCL-2, NF- κ B, and Cyt c levels using ELISA, RT-qPCR, and histopathological methods.

Results: In the LPS group, serum BUN, total protein, direct bilirubin, sodium, and chloride levels increased, whereas calcium levels decreased ($P < 0.05$). BA administration showed regulatory effects on several biochemical parameters. Oxidative stress analyses demonstrated increased MDA levels in the BA+LPS group, while GSH and SOD levels were elevated in the LPS group ($P < 0.05$). Tissue ELISA analyses revealed increased CASP3 levels in the BA group and increased Cyt c levels in the BA+LPS group ($P < 0.05$). Serum ELISA findings showed elevated Cyt c and decreased BCL-2 levels in the BA+LPS group ($P < 0.05$). NF- κ B gene expression increased in the LPS group but decreased in BA and BA+LPS groups. Cyt c expression increased in LPS and BA+LPS groups, whereas *BCL2* gene expression decreased in BA and BA+LPS groups ($P < 0.05$). Histopathological examination revealed infiltration, edema, hyperemia, and hemorrhage in the LPS group, while these alterations were reduced in BA-treated groups.

Conclusion: Betulinic acid may exert regulatory and neuroprotective effects on inflammatory, oxidative, and mitochondrial apoptotic processes in LPS-induced neuroinflammation.

Keywords: Betulinic Acid, LPS, Neuroinflammation, Apoptosis, Inflammation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta\Psi_m$	: Mitokondriyal Elektriksel Gradyan
ACTB	: Actin Beta
ADPR	: Adenozin Difosfat Riboz
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BA	: Betülinik Asit
BAX	: BCL2 İlişkili X Proteini
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma 2
BUN	: Kan Üre Azotu
CASP3	: Kaspaz-3 Geni
CASP9	: Kaspaz-9 Geni
CAT	: Katalaz
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CD95-L	: FAS Ligandı
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CuCl₂	: Bakır (II) Klorit
Cyt c	: Sitokrom C
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzim Bağlı İmmüno Absorbe Analiz
FADD	: Fas ile İlişkili Ölüm Alanı Proteini
GGT	: Gamma Glutamil Transferaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta

IKK	: Kappa Kinaz Kompleksi
KSR2	: Kinaz Supressor Ras 2 Geni
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz Geni
MC4R	: Melanokortin 4 Reseptör Geni
MDA	: Malondialdehit
MyD88	: Miyeloid Farklılaşma Birincil Yanıtı 88
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NRF1	: Nükleer Solunum Faktörü Geni
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
PCSK1	: Proprotein Konvertaz Subtilisin/Kexin Tip 1 Geni
PGE2	: Prostaglandin E2
RNA	: Ribonükleik Asit
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
qRT-PZT	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
TGFα	: Transforming (Dönüştürücü) Büyüme Faktörü Alfa
TNFα	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TRP	: Transient Reseptör Potansiyel
v.a	: Vücut Ağırlığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. MSS ve nörovasküler ünite.....	4
Şekil 2.2. Betülinik asit tarafından indüklenen intrinsik apoptotik yolak.....	8
Şekil 2.3. LPS yapısı.....	13
Şekil 2.4. LPS'nin MyD88 bağımlı inflamasyon yolağı.....	14
Şekil 2.5. Betülinik asidin açık formülü (65).	16
Şekil 2.6. Betülinik asidin nöroinflamasyona etkisi.	17
Şekil 3.1. Deney grupları ve dozların uygulama süreci.	21
Şekil 3.2. Grupların total RNA agaroz jel görüntüsü.	27
Şekil 4.1. Gruplara ait beyin doku MDA seviyeleri.....	34
Şekil 4.2. Gruplara ait beyin doku GSH seviyeleri.....	34
Şekil 4.3. Gruplara ait beyin doku SOD aktivitesi.....	35
Şekil 4.4. Beyin cDNA örneklerinden RT-qPZT ile çoğaltılan ACTB, NF-κB, Cyt c, CASP3, CASP9, BCL2 ve BAX eğrileri.	37
Şekil 4.5. ACTB, NF-κB, Cyt c, CASP3, CASP9, BCL2 ve BAX genlerine ait çoğaltılan ürünlerin agaroz jel görüntüleri.	37
Şekil 4.6. Gruplarda beyin dokusuna ait <i>CASP3</i> gen ifade seviyeleri.	38
Şekil 4.7. Gruplarda beyin dokusuna ait <i>NF-κB</i> gen ifade seviyeleri.....	39
Şekil 4.8. Gruplarda beyin dokusuna ait <i>Cyt c</i> gen ifade seviyeleri.	39
Şekil 4.9. Gruplarda beyin dokusuna ait <i>CASP9</i> gen ifade seviyeleri.	41
Şekil 4.10. Gruplarda beyin dokusuna ait <i>BAX</i> gen ifade seviyeleri.	41
Şekil 4.11. Gruplarda beyin dokusuna ait <i>BCL2</i> gen ifade seviyeleri.....	42
Şekil 4.12. Beyin dokularına ait H-E boyanmış mikroskopik görüntüler.	43

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. MDA analiz reaksiyonu tablosu.	22
Tablo 3.2. SOD analiz reaksiyonu tablosu.	23
Tablo 3.3. GSH analiz reaksiyonu tablosu.	24
Tablo 3.4. Doku örneklerinden elde edilen toplam RNA ölçüm değerleri.	26
Tablo 3.5. Primer bilgileri.	28
Tablo 4.1. Serum BUN, Kreatinin, Total protein ve Albumin değerleri.	30
Tablo 4.2. Serum Total Bilirubin, Direkt Bilirubin, AST, ALT ve ALP değerleri.	31
Tablo 4.3. Serum Sodyum, Potasyum, Klor, Kalsiyum ve Magnezyum değerleri.	32
Tablo 4.4. Gruplara ait beyin doku MDA, GSH seviyeleri ile SOD aktivite değerleri.	33
Tablo 4.5. Doku ELISA analiz sonuçları.	35
Tablo 4.6. Serum ELISA analiz sonuçları.	36
Tablo 4.7. Beyin dokusu <i>NF-κB</i> , <i>Cyt c</i> ve <i>CASP3</i> gen ifadeleri.	38
Tablo 4.8. Beyin dokusu <i>CASP9</i> , <i>BCL-2</i> ve <i>BAX</i> gen ifadeleri.	40

1. GİRİŞ

İnflamasyon, latince "*inflammare*" kelimesinden köken almıştır. Tutuşturmak veya yakmak anlamına gelen bu kelime yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ateşe benzetilmesindeki temel nedenin, inflamasyonun potansiyel tehdide karşı, önlem amacıyla "tutuşturması" ve tehdidi etkisiz hale getirildikten sonra kendiliğinden "sönmesi" olduğu varsayılmaktadır (1). İnflamatuvar yanıt hem hastalıklı hem de sağlıklı dokularda yangı meydana getirebilmektedir ve böylece sürekli devam eden veya kontrol altına alınamayan inflamatuvar süreçleri oluşabilmektedir (2). İki tarafı keskin bir bıçak olan inflamasyonun, homeostazı ve doku onarımını yeniden sağlayabilmesi için; iyi dengelenmiş ve hassas şekilde kontrol edilmesi gerektiği düşünülmektedir (3).

Nöroinflamasyon; merkezi sinir sistemi (MSS) ekseninde yer alan beyin veya omurilikteki inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Bu yanıtta nöron, makroglia ve mikroglia dahil tüm hücrelerin ilişkili bir savunma mekanizması içerisinde olduğu düşünülmektedir. Ayrıca nöroinflamasyon; adaptif bağışıklık sistemi, beyin parenkimindeki astrositlerin aktivasyonu, sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri (ROT) ve moleküler altyapı olarak incelendiğinde oldukça kompleks bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

Mikrobiyomun sağlık üzerindeki etkisine dair birçok araştırma yapılmıştır. Mikroorganizmaların moleküler ürünlerinin çeşitli kronik inflamatuvar hastalıkların etyopatogenezinde güçlü bir rol oynadığı gösterilmiştir. Çeşitli bakteriyel bileşenler doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından tanınabilmektedir (5). Bunlar arasında en kapsamlı araştırılanlar; *Escherichia coli*, *Salmonella* türleri, *Porphyromonas* türleri ve *Helicobacter* türleri gibi gram negatif bakterilerin hücre duvarından türetilen lipopolisakkarit (LPS) olup endotoksin olarak da bilinmektedir. LPS dolaşıma girdikten sonra bağışıklık sistemi üzerinde belirgin bir uyarıcı etkiye sahiptir ve bir dizi patolojiye neden olabilmektedir. Şiddetli vakalarda bu sepsise de yol açabilmektedir. LPS'nin fizyolojik etkilerine ilişkin araştırmaların çoğu sepsis odaklı yürütülmüş olsa da LPS'nin aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok kronik inflamatuvar hastalığın patofizyolojisinin temelinde yattığı bilinmektedir (5).

Terpenler, bitkilerde çevreyle etkileşimler sonucunda doğal olarak üretilen ikincil metabolitler olarak bilinmektedir. Yosunlarda, alglerde, likenlerde ve hatta bazı

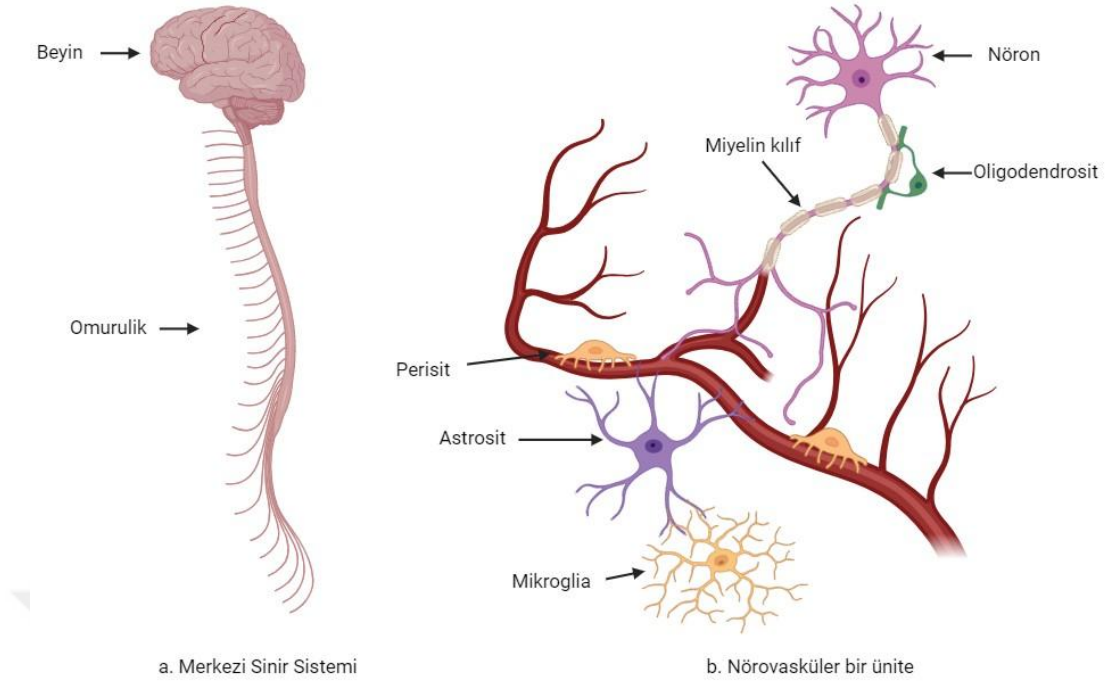
memelilerde de bulunabilirler. Terpenlerin en önemlilerinden biri lupan tipi bir pentasiklik triterpen olan betülinik asit (BA) olarak öne sürülmüştür (6). BA'nın diüretik, antimikrobiyal, antiviral, antiHIV, antidiyabetik, antiparaziter, immünomodülatör ve antikanser gibi etkileri araştırılmış olup özellikle immüno-modulator olarak birçok etkisinin olduğu da düşünülmektedir (7). BA, apoptoz sinyal iletiminde önemli rol oynayarak mitokondriyal membran stabilitesini azaltabilmektedir. Membranın depolarizasyonu apoptotik sinyal yolunu aktive edebilmektedir (8). Apoptoz genellikle inflamasyon ve çevre dokulara zarar vermeden yürüyen bir süreç olarak görülmektedir. Apoptoz yoluyla bağışıklık sistemi uyarılmadan hasarlı, enfekte veya yaşlanan hücreler elimine edilebilmektedir (9).

Tezimizin temel hipotezi, LPS uygulaması ile oluşturulan deneysel sıçan nöroinflamasyon modelinde betülinik asidin, Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) yoluyla inhibisyonu ve apoptotik mekanizmalar üzerindeki düzenleyici etkileri aracılığıyla nöroprotektif etki göstereceği yönündedir. Bu doğrultuda, betülinik asidin beyin dokusunda inflamasyon ve apoptoz yolları üzerindeki etkileri moleküler genetik, biyokimyasal ve histopatolojik açıdan incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon; inflamatuvar düzenleyicilerin sekresyonu, şiddetli oksidatif stres ve hücreler arası boşlukta biriken glutamatın yarattığı nörotoksik etkilerle karakterize edilmiştir. Organizmadaki diğer tüm organların işlevlerinin, nöronal bağlantılar ve sinyal iletimi aracılığıyla beyin ve MSS tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir. MSS vücuttaki en karmaşık ve az bilinen yapı olarak karşımıza çıkmaktadır. MSS'deki nöronal yapılar ve işlevleri inflamasyon sürecinde bozulabilmektedir. İnflamasyon; vücuttaki hasarlı doku veya hücreleri, enfeksiyöz ajanları, parazitleri veya toksinleri vücuttan atmak, onarmak ve yenilemek için oluşmuş bir savunma mekanizması olarak bilinmektedir. Nöroinflamasyonda ise bu süreç mikroglia, astrositler, nöronlar, T hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri ve bu hücrelerden salgılanan inflamatuvar düzenleyiciler tarafından gerçekleşmektedir. Diğer hücrelerin aksine nöronların, hasar gördüğünde veya dejenerasyona uğradığında, onarılma veya yenilenme yeteneğine sahip olmadığı bilinmektedir. Nöroinflamasyon başlangıçta beyinde koruyucu bir yanıt olarak ortaya çıkmasına rağmen, aşırı inflamatuvar tepkilerin zararlı etkilere neden olduğu ve nöronal rejenerasyonu engellediği düşünülmektedir (10). Nöroinflamasyon mekanizmasında iki temel yolak karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan ilki hücresel, ikincisi moleküler yolak olarak adlandırılmaktadır. Hücresel yolakta nöronlara odaklanmak gerekmektedir. Nöronlar hücre gövdesi, sinyalleri alan dendritler ve bu sinyalleri ileten aksonlardan oluşmaktadır. Ayrıca nöronlar yapısal destek, koruma ve beslenme sağlayan glial hücreler (mikroglia, astroglia, perisit, miyelin kılıf ve oligodendroglia) ile diğer hücrelerle iletişime girmektedirler (11). Tüm bu yapılar bir nörovasküler üniteyi tarif etmektedir (Şekil 2.1).



Şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur.

Şekil 2.1. MSS ve nörovasküler ünite.

Mikroglial hücreler homeostazın korunması, nöronal fonksiyonların düzenlenmesi ve patolojik durumlara yanıt vermekte rol almaktadırlar. Yaralanma, enfeksiyon ve nörodejenerasyonda çeşitli yollarla mikroglialar aktive olabilirken amip benzeri bir morfolojiye dönüşebilmektedirler (12). Mikroglialının aşırı aktivasyonu nedeniyle oluşan kronik nöroinflamasyon, nöronal hasara, sinaptik kayba ve hücre ölümüne yol açabilmektedir. Mikroglia, değişen koşullara bağlı olarak polarizasyon süreci sonucunda iki temel fenotipe dönüşebilmektedir. Bunlardan M1 fenotipi proinflamatuvar yanıtla ilişkilendirilirken; öldürme ve inflamasyonu başlatma gibi işlevlerle karakterizedir. M2 fenotipi ise anti-inflamatuvar yanıtla ilişkilendirilmekte olup inflamasyonu baskılama ve onarım süreçlerinde rol oynamaktadır. Bu iki fenotip arasındaki dengenin oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (13). Astrositler, MSS homeostazının korunması ve nöronların yapısal destek, sinaptik iletim, plastisitesinde önemli rol oynamaktadırlar (14). Nöroinflamatuvar süreçte astrositler, farklı patolojik uyarılara karşı morfolojik, transkripsiyonel ve fonksiyonel bir yeniden yapılanma olan “reaktif astrositoz” fenotipine bürünmektedir. Bu hücreler, proinflamatuvar molekül salınımı ve doku rejenerasyonu yoluyla nöroprotektif bir rol üstlenirler de kronik seyreden reaktif yanıtlar, doku hasarına yol açarak MSS üzerinde homeostatik dengenin bozulmasına neden olabilmektedir (15). Oligodendrositler, aksonları yalıtın, elektrik sinyallerinin yayılmasını sağlayan ve

miyelin kılıflarının oluşumundan sorumlu olan, MSS'deki glial hücre topluluğu olarak bilinmektedir. Diğer glial hücrelerde olduğu gibi, oligodendrositler de nöroinflamasyon sürecinde çeşitli efektör moleküller salgılayabilmektedir (16). Bu süreçte rol oynayan temel moleküler mekanizmalar; NF- κ B sinyal kaskadı, janus kinaz sinyal iletilici ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) yolağı, nod benzeri reseptör protein 3 (NLRP3) inflamazomu ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yollarıdır. Söz konusu yolların her biri; enfeksiyonlar, hatalı katlanmış protein agregatları ve hücresel stres gibi farklı patolojik uyaranlar aracılığıyla aktive edilmektedir (17).

2.1.1. Nöroinflamasyonda NF- κ B Sinyal Yolağı

NF- κ B, ilk olarak 1986 yılında Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından, immüoglobulin kappa hafif zincir enhancer bölgesine bağlanabilen bir B hücre çekirdek faktörü olarak tanımlanmıştır (18). İnaktif formda hemen tüm hücrelerin sitoplazmasında yer aldığı ve *Drosophila*'dan insanlara kadar geniş bir canlı grubunda korunmuş olduğu bildirilmektedir. Hücresel aktivasyon sonrasında çekirdeğe taşınarak çok sayıda immün yanıt, hücre büyümesi ve inflamasyonla ilişkili genin transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (19). NF- κ B yolağı hem periferik hem de merkezi bağışıklık sistemlerinde en belirgin inflamasyon düzenleyicilerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Memelilerde, NF- κ B ailesi beş alt birimden oluşmaktadır: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB ve c-Rel, bunlar homo- veya hetero-dimerik kompleksler oluşturabilmektedir (18). Uyarılmamış hücrelerde, NF- κ B, I κ B inhibitörleriyle (I κ B) birleşerek inaktif bir formda sitoplazmada hapsedilmiştir. Çeşitli uyarılardan sonra, NF- κ B sinyal yolağı aktive olmaktadır. İki katalitik alt birim olan IKK α , IKK β ve düzenleyici bir alt birim olan IKK γ 'den oluşan I κ B kinaz (IKK) kompleksi etkinleşmektedir. Ayrıca I κ B'nin fosforilasyonunu, ubiquitinasyonunu ve proteazomal bozunmasını sağlamaktadır. NF- κ B'nin p50/p65 dimerleri, I κ B'den ayrılarak NF- κ B'nin çekirdeğe taşınmasına ve hedef gen transkripsiyonunu düzenlemesine olanak tanımaktadır (20). MSS, mikroglia, astrositler ve nöronlarda NF- κ B yolağının aktivasyonu; bağışıklık hücrelerinin uyarımını, inflamatuvar yanıtı, sitokinleri, kemokinleri ve adezyon moleküllerinin üretimini sağlamaktadır (21). Ayrıca NF- κ B baskılanması apoptoza giden yolu açmaktadır (22). NF- κ B yolağı, Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve interleukin-1 beta (IL-1 β) dahil olmak üzere çeşitli moleküller tarafından tetiklenebilmektedir. Bu yolağın düzensizliği ve kronikleşmesi, nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır. Örneğin,

aşırı NF- κ B aktivasyonu, amiloid beta plaklarının ve tau patolojisinin üretimini teşvik ettiği için Alzheimer hastalığında rol oynamaktadır. NF- κ B yolağını hedeflemek, nöroinflamasyonu azaltmak ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için umut verici bir strateji olarak görülmektedir (23).

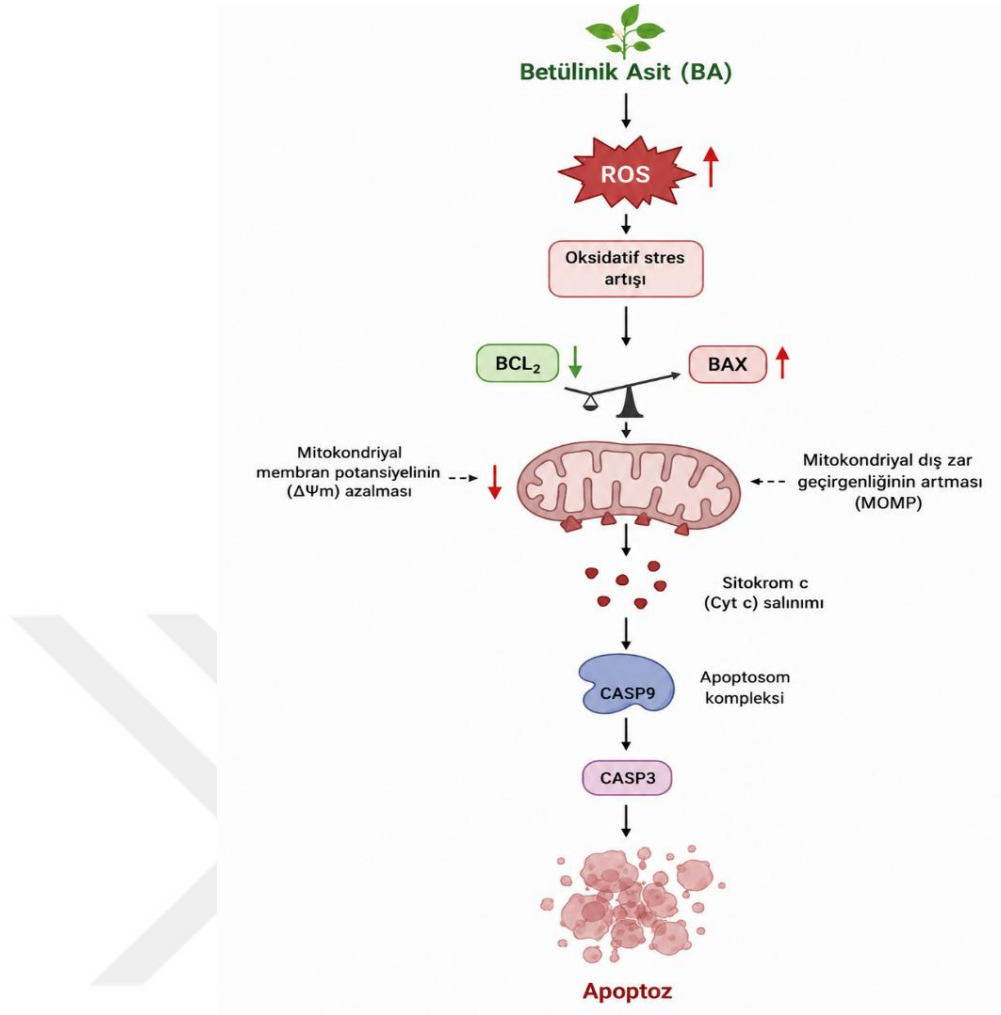
2.1.2. Nöroinflamasyonda Apoptoz

Apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Hücre ölümünün travmatik bir versiyonu olan nekrozun aksine, apoptoz organizmanın yararı için belirli hücreleri feda etmek üzerine kurulu bir süreç olarak belirtilmektedir. Apoptoz çok hücreli organizmaların fizyolojik döngüsünde rutin olarak gerçekleşmektedir (24). Bağışıklık denetimindeki disfonksiyon ve kan beyin bariyeri (KBB)'nin yapısal yıkımı, patolojik süreci derinleştirerek nöronal apoptozu tetikleyen temel mekanizmaları oluşturmaktadır. Organizmanın homeostazı için apoptoz hayati önem taşımaktadır. Morfolojik olarak başlıca belirtiler; çekirdeğin büzülmesi ve kromatinlerin yoğunlaşması, kromozomal DNA'nın bozulması, nükleolusun yırtılması, sitozolik membranda veziküllerin oluşması, hücrenin bu apoptotik veziküllere bölünmesi ve nihayetinde fagosite edilerek ortadan kaldırılması şeklinde sıralanabilmektedir (25). Apoptoz temel olarak ekstrinsik ve intrinsik yolak olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir. Ekstrinsik yolak hücre ölüm reseptörü aracılı yolak olarak, intrinsik yolak ise mitokondri aracılı yolak olarak tanımlanmaktadır (26).

Ekstrinsik yolak, reseptör ve ligand bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Bir ölüm ligandının (örneğin CD95-L, FasL, APO-1L veya TRAIL) bir ölüm reseptörüne (örneğin CD95, FasR, APO-1 veya TRAIL-R) bağlanmasıyla tetiklenmektedir. Bu ligand-reseptör etkileşimi, bir adaptör protein olan Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) aracılığıyla ölüm indükleyici sinyal kompleksi'nin (DISC) oluşumunu tetiklemektedir. Ekstrinsik yolakta sinyalin sitoplazmik kaspazlara iletildiği kritik bir aşamayı temsil eden DISC oluşumu; başlatıcı kaspazlar olan caspase-8 ve caspase-10'un aktivasyonunu indüklemektedir. Bu aktivasyon süreci, kaspaz kaskadını bir üst seviyeye taşıyarak caspase-3, -6 ve -7 gibi efektör kaspazların etkinleşmesini sağlamakta ve hücreyi geri dönüşü olmayan apoptoz fazına sokmaktadır (27).

İntrinsik yolak, çeşitli etmenlere bağlı olarak oluşan DNA hasarı ile aktive olmakta ve özellikle mitokondriyal dış zar geçirgenliğindeki artış ile ilişkilendirilmektedir. Bu yolakta reseptör aracılı bir mekanizma bulunmamakta olup, hücre içi sinyaller doğrudan mitokondri üzerinden apoptotik süreci başlatmaktadır. Ekstrinsik yolaktan farklı olarak

intrinsik yolak, temel olarak hücreli lenfoma 2 (BCL-2) ailesi proteinlerinin düzenleyici rolüne dayanmaktadır. BCL-2 ailesi proteinleri fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre üç ana gruba ayrılmaktadır: İlki; BCL-2 ilişkili X proteini (BAX) ve BCL-2 antagonisti (BAK) gibi çok alanlı (multi-domain) proapoptotik proteinler, ikincisi; sadece BCL-2 homoloji alanı 3 (BH3) sahip olan proteinler (örn. BAD, BID, PUMA, NOXA) ve üçüncüsü; BCL-2 homoloji alanı 4 (BH4) alanını da içeren antiapoptotik proteinlerdir (örn. Bcl-xL, BCL-2, Mcl-1). Hücrenin kaderini belirleyen proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki hassas denge, özellikle BH3 proteinlerinin aktivasyonu ile bozulmaktadır. Örneğin betülinik asit gibi ajanların hücrede ROT miktarını artırarak oksidatif strese ve mitokondriyal membran disfonksiyonuna yol açması, bu dengenin bozulmasını tetiklemektedir (28). Bu durum, mitokondriyal dış zar geçirgenliğinin artmasına ve takiben sitokrom c (Cyt c) salınımına yol açarak apoptoz kaskadını geri dönüşü olmayan aşamaya taşımaktadır (29). Mitokondrinin dış zarında bulunan bu proteinlerin, normal koşullar altında apoptozun inhibisyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir. Ancak hücrenin strese maruz kalması durumunda proapoptotik proteinlerden BAX aktive olarak anti-apoptotik BCL-2'nin etkisini antagonize etmekte ve mitokondriyal dış zar geçirgenliğini artırmaktadır. Bunun sonucunda Cyt c başta olmak üzere çeşitli moleküller sitoplazmaya salınmaktadır. Cyt c, caspase-9 ile apoptozom kompleksini oluşturarak caspase-3'ün aktivasyonunu sağlamaktadır. Böylece süreç, intrinsik apoptotik yolak kaskadı ile tamamlanmaktadır (Şekil 2.2) (30).



Betülinik asidin hücre içerisinde reaktif oksijen türleri üretimini artırması sonucu oksidatif stres oluşmaktadır. Artan oksidatif stres, anti-apoptotik BCL-2 düzeyinin azalmasına ve proapoptotik BAX aktivasyonunun artmasına neden olmaktadır. BAX/BCL-2 dengesinin proapoptotik yönde değişmesi, mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) azalmasına ve mitokondriyal dış zar geçirgenliğinin artmasına yol açmaktadır. Bu süreç sonucunda sitokrom c mitokondriden sitoplazmaya salınmakta ve apoptosom kompleksi aracılığıyla caspase-9 aktivasyonu gerçekleşmektedir. Ardından caspase-3'ün aktive olmasıyla intrinsik apoptotik yolak tamamlanmakta ve hücre apoptoza girmektedir.

Şekil 2.2. Betülinik asit tarafından indüklenen intrinsik apoptotik yolak.

2.1.3. Nöroinflamasyonda Oksidatif Stres

Oksidatif stres, serbest radikallerin özellikle ROT'un üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Başlıca ROT molekülleri arasında süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) yer almaktadır. Bu moleküller bağışıklık yanıtı, apoptoz, protein fosforilasyonu ve çeşitli hücresel sinyal yolları sırasında üretilmektedir. Organizmada ROT başlıca mitokondri, peroksisom ve endoplazmik retikulumda üretilmektedir. Enzimatik kaynakları arasında ise siklooksijenazlar, NADPH oksidaz kompleksi, ksantin oksidaz ve lipoksijenazlar bulunmaktadır (31). Düşük düzeydeki ROT, hücresel

süreçlerin düzenlenmesinde 'ikincil haberci' olarak görev yaparak homeostazın korunmasına katkıda bulunabilmektedir. Buna karşın, artan oksidatif yük; protein, lipid ve DNA gibi kritik hücrel bileşenlerde oksidatif modifikasyonlara neden olmaktadır. Bu durum, NF- κ B gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin dengesini bozarak hücrel yanıtın adaptif fazdan patolojik faza geçmesine ve doku hasarıyla sonuçlanan kronik inflamatuvar süreçlerin tetiklenmesine sebebiyet vermektedir (32).

Süperoksit dismutaz (SOD), hücrelerin oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturan temel antioksidan enzimlerden biridir. SOD, reaktif oksijen türlerinden biri olan süperoksit anyonunu daha az toksik ürünlere dönüştürerek hücrel redoks homeostazının korunmasında kritik rol oynamaktadır. Sitoplazmada en çok bulunan formu Cu/Zn-SOD (Bakır/Çinko-SOD) bir kofaktör olarak süperoksit anyonlarının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir (33). G-glutamil-sisteinil-glisin yapısındaki bir tripeptit olan indirgenmiş glutatyon (GSH), hücrel redoks homeostazının idamesinde temel non-enzimatik antioksidan bileşen olarak işlev görmektedir. GSH, reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin doğrudan nötralizasyonunun yanı sıra, glutatyon peroksidaz (GPx) katalizörlüğünde hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin indirgenmesinde kritik bir kofaktör rolü üstlenmektedir. Ayrıca, protein tiyol gruplarının S-glutatyonylasyon aracılığıyla korunması ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyon süreçlerinde merkezi bir regülatör olan GSH, oksidatif stresin indüklediği hücrel hasara karşı yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün korunmasında birincil savunma hattını oluşturmaktadır (34). Malondialdehit (MDA), membran lipidlerinin ROT aracılı peroksidasyonu sonucu açığa çıkan temel aldehit yapılı son ürünlerden biridir. MDA düzeyindeki artışın, lipid peroksidasyonunun derecesi ile doğrudan ilişkili olduğu ve hücrel oksidatif stresin önemli biyokimyasal göstergelerinden biri olarak kabul edildiği bildirilmektedir. Ayrıca MDA proteinler, nükleik asitler ve membran bileşenleri ile etkileşime girerek hücrel yapı ve fonksiyonlarda bozulmalara neden olabilmektedir. Bu nedenle MDA düzeyinin, oksidatif hasarın değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan güvenilir biyobelirteçlerden biri olduğu ifade edilmektedir (35). Nöroinflamasyonda oksidatif stres belirteçleri olan GSH, SOD ve MDA sıklıkla birlikte değerlendirilmektedir. Genel olarak nöroinflamatuvar süreçte antioksidan savunmayı temsil eden GSH ve SOD düzeyleri azalırken, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyi artmaktadır. Bu değişim; ROT üretimi, mitokondriyal hasar ve nöronal dejenerasyon ile ilişkilendirilmektedir (36-38). Hücrelerin, yüksek ROT seviyelerinin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla

antioksidan savunma sistemlerine sahip olduğu bilinmektedir. Bu sistemler başlıca SOD, katalaz (CAT) ve GPx gibi enzimatik mekanizmaları içermektedir. Endojen ve eksojen antioksidanlar, ROT homeostazının korunmasında kritik rol oynayarak sağlıklı hücresel işleyişin sürdürülmesine katkı sağlamaktadır. ROT üretimi ile antioksidan tüketimi arasında dinamik bir denge bulunmakta olup, bu dengenin korunması gereklidir. Ancak patolojik durumlarda ROT üretimi, organizmanın antioksidan kapasitesini aşarak hücre ve dokularda hasara yol açmakta ve hastalık progresyonunu destekleyen oksidatif stres dengesizliğine neden olmaktadır (39).

MSS’de ROT üretiminde özellikle iki başlıkta yoğunlaşmaktadır: bunlardan ilki doğuştan gelen bağışıklık hücreleri (örneğin mikrogial hücreler) ikincisi ise mitokondriler olarak belirtilmektedir. Mikrogial hücreler ilk savunma hattı olarak sitokin aracılığıyla nöroinflamasyonu tetiklerken, ROT oluşumunu da teşvik etmektedir. Ancak kalıcı mikrogial aktivasyonun getirmiş olduğu proinflamatuvar ve prooksidan ortamın zararlı olduğu saptanmıştır. Mitokondriler ise elektron taşıma zinciri reaksiyonunun bir yan ürünü olarak ROT oluşumuna sebep olmaktadır. Bu organeller aynı zamanda doğrudan ROT hedefi olarak da bilinmektedir. Oksidatif stresle ilişkili mitokondriyal düzensizliklerin nörodejeneratif hastalıklara da neden olduğu gösterilmiştir (40). Son zamanlarda “mitoinflamasyon” kavramı türemiştir. Mitoinflamasyon yaklaşımına göre; mitokondri, patojen ilişkili moleküler örgüler (PAMP’ler) tarafından hücre içi sinyal yollarında aşağı yönlü bir düzenleme gösterirken, mitokondriyal hasarlı ilişkili moleküler örgülerle’de (mtDAMP’ler) aktivasyon sağlamaktadır. Mitoinflamasyon sırasında, mitokondriyal reaktif oksijen türleri (mtROT), mitokondriyal DNA (mtDNA), ATP, kardiyolipin ve mitokondriyal Ca^{2+} , sitozolde veya hücre dışı ortamda düzensizlik oluşturarak çok sayıda proinflamatuvar medyatörün ekspresyonunu ve salınımını tetiklemektedir (41).

2.1.4. Nöroinflamasyona Eşlik Eden Sistemik Biyokimyasal Bulgular

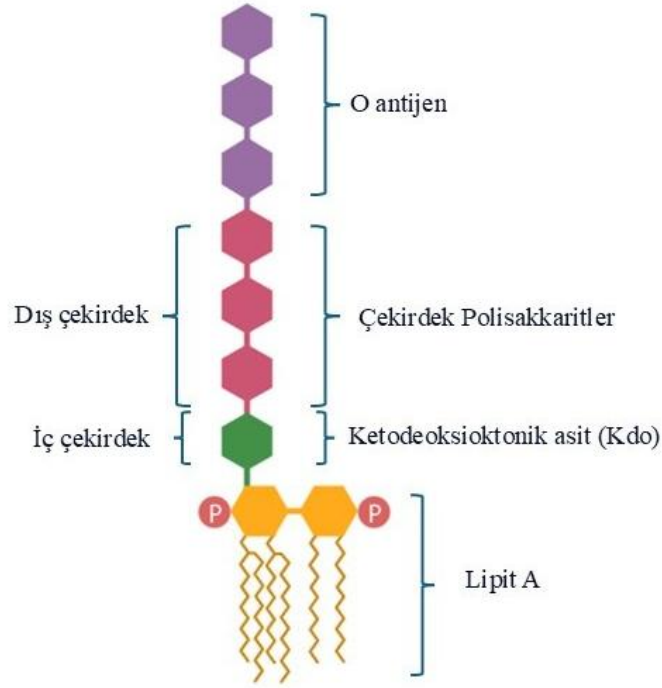
Nöroinflamasyon, yalnızca MSS ile sınırlı kalmayıp periferik organlar, metabolik süreçler ve biyokimyasal homeostaz üzerinde de etkiler oluşturabilen kompleks bir inflamatuvar yanıt olarak değerlendirilmektedir. Özellikle LPS ile oluşturulan deneysel modellerde inflamatuvar mediyatörler ve oksidatif stres ürünleri; karaciğer, böbrek, protein metabolizması ve elektrolit dengesi üzerinde değişikliklere yol açabilmektedir. Bu nedenle serum biyokimyasal parametrelerinin incelenmesi, nöroinflamasyonun sistemik etkilerinin değerlendirilmesi açısından önemli kabul edilmektedir (42, 43).

Kan üre azotu (BUN), protein metabolizması sonucu oluşan ürenin kandaki azot miktarını yansıtan ve böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan temel biyobelirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir (44). Kreatinin ise kas metabolizması sonucu oluşan ve glomerüler filtrasyon hızının değerlendirilmesinde kullanılan temel renal biyobelirteçlerden biri olarak bilinmektedir. Serum kreatinin düzeyleri, böbreğin filtrasyon kapasitesi hakkında önemli bilgi sağlamaktadır (45). Aspartat aminotransferaz (AST), başta karaciğer, kalp ve iskelet kası olmak üzere birçok dokuda bulunan ve aminoasit metabolizmasında görev alan önemli bir enzim olarak bilinmektedir. Serum AST düzeylerindeki artışın, hepatoselüler hasar, hücresel yıkım ve metabolik stresin biyokimyasal göstergelerinden biri olduğu bildirilmektedir (46). Alanin aminotransferaz (ALT), özellikle hepatosit sitoplazmasında yoğun olarak bulunan ve aminoasit dönüşüm reaksiyonlarında rol alan bir enzim olarak tanımlanmaktadır. Klinik biyokimyada serum ALT düzeylerindeki yükselme, karaciğer hücre hasarı ve hepatik fonksiyon bozukluklarının değerlendirilmesinde duyarlı belirteçlerden biri olarak değerlendirilmektedir (47). Alkalen fosfataz (ALP), başlıca karaciğer, safra yolları, kemik ve bağırsak dokularında bulunan; fosfat esterlerinin hidrolizinde görev alan önemli bir enzim olarak bilinmektedir. Serum ALP düzeylerindeki değişimlerin, özellikle hepatobiliyer fonksiyon bozuklukları, kolestatik süreçler ve kemik metabolizmasındaki değişikliklerin değerlendirilmesinde klinik önem taşıdığı bildirilmektedir (47). Total bilirubin, eritrosit yıkımı sonrası ortaya çıkan bilirubinin kandaki toplam konsantrasyonunu ifade eden ve bilirubin metabolizması ile karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan biyokimyasal göstergelerden biri olarak bilinmektedir. Serum total bilirubin düzeylerindeki değişimlerin; hemolitik süreçler, hepatik metabolizma ve safra eliminasyonundaki farklılıklarla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (48). Direkt bilirubin ise karaciğerde konjugasyona uğrayarak suda çözünür hale gelen bilirubin fraksiyonunu ifade etmekte olup, özellikle hepatobiliyer sistem fonksiyonları ve safra akışının değerlendirilmesinde önemli parametrelerden biri olarak kabul edilmektedir. Serum direkt bilirubin düzeylerindeki artışın, hepatik konjugasyon süreçleri ve safra sekresyonundaki bozukluklarla ilişkili olabileceği belirtilmektedir (49). Total protein, serumda bulunan albumin ve globulin başta olmak üzere tüm protein fraksiyonlarının toplamını ifade eden ve beslenme durumu, inflamasyon, karaciğer fonksiyonları ile protein metabolizmasının değerlendirilmesinde kullanılan önemli biyokimyasal parametrelerden biri olarak kabul edilmektedir. Serum total protein düzeylerindeki değişimlerin; inflamatuvar yanıt, hepatik sentez kapasitesi ve

metabolik homeostazdaki farklılıklarla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (50). Albumin, karaciğerde sentezlenen ve plazma proteinlerinin büyük bölümünü oluşturan temel bir taşıyıcı protein olarak bilinmektedir. Ozmotik basıncın korunması, birçok endojen ve eksojen molekülün taşınması ile antioksidan savunma mekanizmalarında önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Serum albumin düzeylerindeki değişimlerin; inflamasyon, hepatik sentez kapasitesi, beslenme durumu ve sistemik metabolik yanıt ile ilişkili olabileceği kabul edilmektedir (51). Sodyum (Na^+), potasyum (K^+), klor (Cl^-), kalsiyum (Ca^{2+}) ve magnezyum (Mg^{2+}); hücre içi ve hücre dışı sıvı dengesinin korunması, membran potansiyelinin sürdürülmesi, sinir iletimi, kas fonksiyonu, asit-baz dengesi ve hücresel sinyal iletimi gibi temel fizyolojik süreçlerde görev alan başlıca elektrolitlerdir. Sodyum ve klor daha çok hücre dışı sıvı dengesinde, potasyum hücre içi membran potansiyelinde, kalsiyum hücresel sinyal iletimi ve nörotransmitter salınımında, magnezyum ise enzimatik reaksiyonlar ve nöronal stabilitenin korunmasında önemli rol oynamaktadır (52, 53).

2.2. Lipopolisakkarit (LPS)

LPS, gram-negatif bakterilerin hücre duvarının önemli bir bileşeni olmakla beraber bakteriye hücre bütünlüğü, canlılık ve çevresel strese karşı savunmak için hayati bir yetenek kazandırmaktadır. LPS, neredeyse tüm gram-negatif bakterilerde yüksek oranda korunmuştur ve güçlü bir inflamatuvar yanıt indükleyicisi olarak bilinmektedir. LPS, üç temel bölgeden oluşan ısıya dayanıklı amfifilik bir moleküldür. Bu bölgeler; hidrofobik lipid A, hidrofilik polisakkaritler (şeker çekirdeği) ve O-antijeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Polisakkarit bölgesi ayrıca iç ve dış çekirdek olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Bu bölüm genellikle ketodeoksioktonik asit (Kdo) kalıntıları, heptozlar ve fosfat moleküllerini (Şekil 2.3) içermektedir (54). LPS'nin lipid A kısmının immünoestimülator olduğu belirtilmektedir. Çeşitli gram-negatif bakteriler üzerinde yapılan çalışmalar, lipid A'nın yapısının bakteri türleri arasında farklılık gösterdiğini ve açıl zincirlerinin (yağ asidi) sayısının LPS'nin immünoestimülator kapasitesini belirlediğini göstermektedir. Açıl sayısının fazla olmasının tetiklenmeyi arttırdığı belirtilmiştir. Örneğin, *Escherichia coli* yüksek derecede immünoestimülator olan hekza-açıl edilmiş lipid A içermektedir (55).

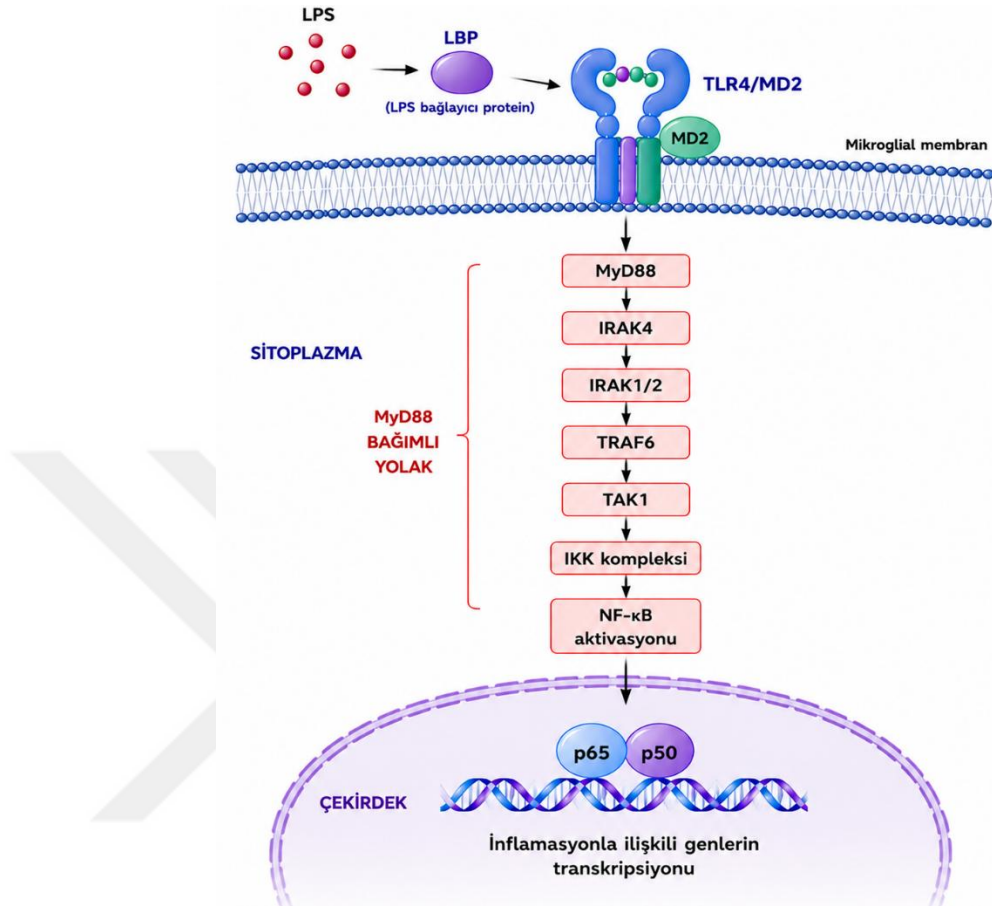


Şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur.

Şekil 2.3. LPS yapısı.

LPS, ilk olarak Toll benzeri reseptör 4 (TLR-4) ligandı olarak tanımlanmıştır (56). LPS, örgü tanıma reseptörleri (PRR'ler) olarak sınıflandırılan Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein (NOD) benzeri reseptörlerle etkileşime girmektedir. LPS'nin TLR4'e bağlanması, LPS bağlayıcı protein (LBP) tarafından kolaylaştırılır ve bu da miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88) bağımlı yolak aracılığıyla TLR4-MD2 (miyeloid farklılaşma proteini 2) kompleksinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (57). Ayrıca bu bağlanma LPS bağlayıcı protein (LBP) aracılığıyla kolaylaştırılmaktadır. Reseptör aktivasyonunu takiben sitoplazmada MyD88 aracılı sinyal iletim basamakları aktive olmakta; interlökin-1 reseptör ilişkili kinaz 4 (IRAK4), interlökin-1 reseptör ilişkili kinaz 1/2 (IRAK1/2), TNF reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β ile aktive olan kinaz 1 (TAK1) üzerinden IKK kompleksinin uyarılması gerçekleşmektedir. Aktive olan IKK kompleksi, NF- κ B'nin aktifleşmesine neden olarak p65/p50 alt birimlerinin çekirdeğe translokasyonunu sağlamaktadır. Çekirdekte NF- κ B'nin DNA üzerindeki hedef bölgelerine bağlanması sonucunda inflamasyonla ilişkili genlerin transkripsiyonu artmakta ve TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 ile çeşitli kemokinler gibi proinflamatuvar sitokin ve mediyatörlerin salınımı

gerçekleşmektedir. Bu süreç nöroinflamatuvar yanıtın oluşumunda temel rol oynamaktadır (Şekil 2.4) (58).



LPS bağlayıcı protein (LBP) yardımıyla mikroglial hücre membranında yer alan TLR4/MD2 kompleksine bağlanması, MyD88 aracılı hücre içi sinyal iletim mekanizmasını başlatmaktadır. Bu süreçte IRAK4, IRAK1/2, TRAF6 ve TAK1 gibi ara sinyal proteinleri aktive olarak IKK kompleksini uyarmaktadır. Ardından NF-κB'nin aktifleşmesiyle p65/p50 alt birimleri çekirdeğe taşınmakta ve inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonu artmaktadır. Sonuç olarak bu yolak, proinflamatuvar sitokin ve kemokin sentezinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Şekil 2.4. LPS'nin MyD88 bağımlı inflamasyon yolağı.

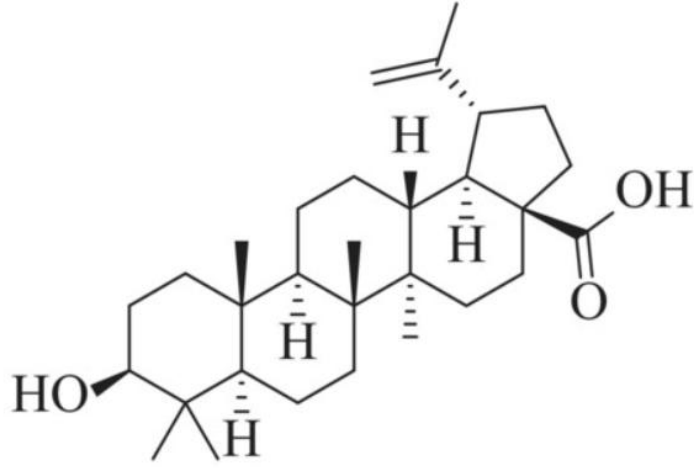
TLR4 öncelikle mikroglialar üzerinde ifade edilmektedir. LPS ayrıca KBB'ye zarar vermekte, nöronal hücrelerin apoptozunu uyarmakta ve NF-κB sinyal yolu aracılığıyla mikroglialı aktive ederek bilişsel bozulma ve nöroinflamasyona da neden olabilmektedir. LPS tarafından mikroglialının kronik veya uzun süreli polarizasyonu (aktivasyonu) nöronal ölüme ve TNF-α, (IL)-1β, prostaglandin E2 (PGE2) ve nitrik oksit (NO) gibi proinflamatuvar sitokinlerde, özellikle hipokampüste bir artışa yol açmaktadır (59). Yine LPS ile ilişkili TLR4 aktivasyonu yaygın nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır. LPS maruziyeti ROT ve reaktif nitrojen türleri (RNT) birikimini arttırmakta ve bunun sonucunda proinflamatuvar düzenleyicilerinin aktivasyonuna neden olmaktadır.

Dolaşımdaki yüksek LPS seviyeleri mikrogliya ve astrositlerin hiperaktivasyonunu tetikleyerek nöronların, sinapsların ve bilişsel işlevlerin bozulmasına, nöroinflamasyona yol açmaktadır (60). LPS'nin sistemik uygulaması, TLR4/NF- κ B sinyal yolağıyla hafıza bozukluğunu da tetiklemektedir. Bu süreç çeşitli proinflamatuvar sitokinler/kemokinler dahil olmak üzere inflamasyonla ilişkili genlerin ve moleküllerin ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır (58).

Deneysel nöroinflamasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan LPS; akut ve kronik inflamasyonun yanı sıra sepsis ve nörodejenerasyon modellerinin oluşturulmasında kritik bir rol oynamaktadır. Uygulama rotası genellikle intraperitoneal yol üzerinden ilerlese de doğrudan santral sinir sistemini hedefleyen intraserebroventriküler enjeksiyonlar veya non-invaziv oral yaklaşımlar da literatürde mevcuttur. Çalışmanın hipotezine bağlı olarak tekil doz veya tekrarlayan doz protokolleriyle optimize edilen LPS modelleri, nöroinflamatuvar yanıtın moleküler mekanizmalarını anlamak için güvenilir bir deneysel zemin sunmaktadır (43).

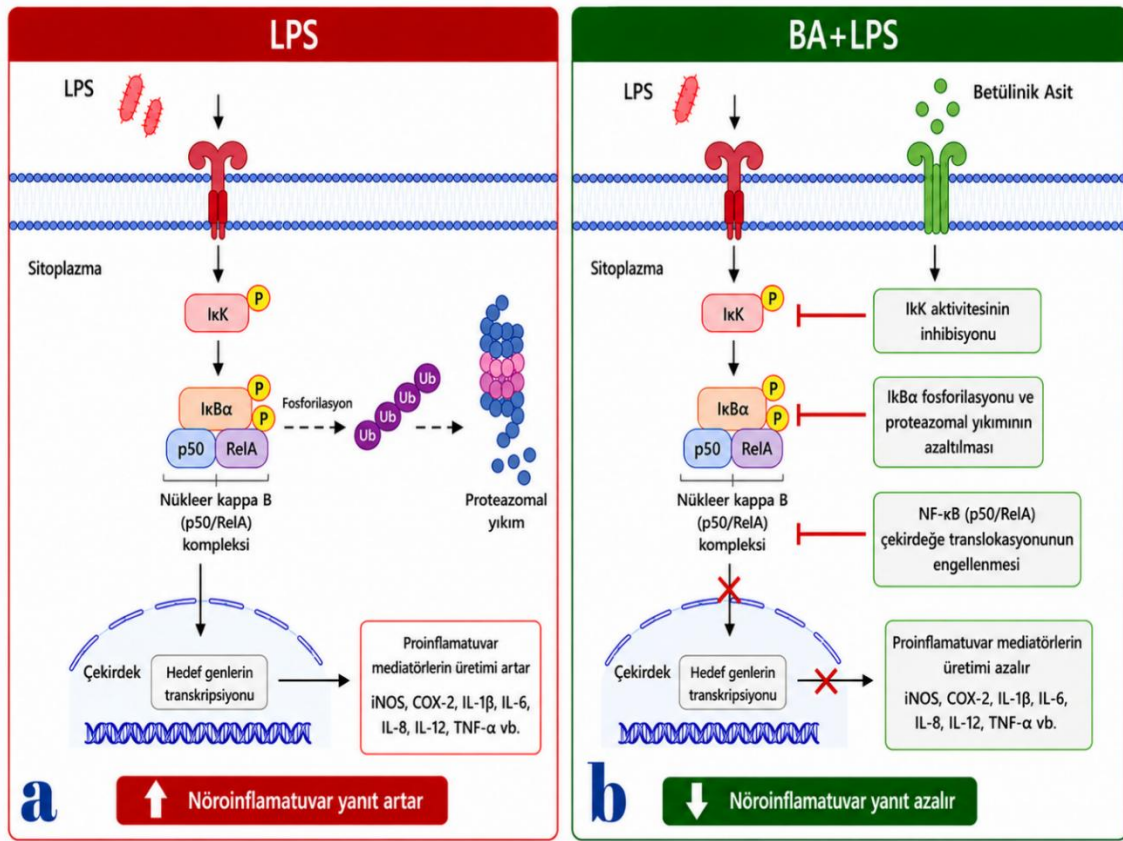
2.3. Betülinik Asit (BA)

Terpenler, (izoprenoidler veya terpenoidler) çeşitli bitkilerde yaygın olarak bulunan organik bileşikler olarak adlandırılmaktadır. 30 karbonlu terpenoidleri içeren gruba triterpenler veya triterpenoidler denmektedir. Triterpenlerin en sık görülen yapıları pentasiklik ve tetrasiklik triterpenler olarak belirtilmiştir (61). Birkaç istisna dışında, pentasiklik triterpenler genellikle bitki organlarının kuru ağırlığının % 0.1'inden daha azını oluşturmaktadır. İstisnalarından biri, % 34 oranında pentasiklik bir triterpenoid olan betulin içeren beyaz huş ağacı kabuğu olarak bildirilmiştir (62). Betülin (lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) izopropiliden grubu ve beş üyeli halka ile karakterize edilen bir lupane tipi bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır. Betülin geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olmasına rağmen, sulu çözeltilerdeki zayıf çözünürlüğü terapötik potansiyelini önemli ölçüde kısıtlamıştır. Bu kısıtlamayı aşmak amacıyla, betülinin oksidasyonu sonucu elde edilen betülinik asit üzerine odaklanılmıştır. Betülinik asit, betüline kıyasla daha elverişli farmakolojik özellikler sergilemesi nedeniyle klinik çalışmalarda daha anlamlı bir karşılık bulmuş ve literatürde daha yoğun bir araştırma ilgisine konu olmuştur (63). Kimyasal formülü (3 β -hidroksi-lup-20(29)-en-28-oik asit) şeklinde olan betülinik asit doğal olarak elde edilen ilaçlar arasında özel bir yere konumlandırılmıştır (Şekil 2.5). Betülin içeren huş ağacı kabuğu, aktif bileşen özellikleri nedeniyle yüzyıllardır halk hekimliğinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (64).



Şekil 2.5. Betülinik asidin açık formülü (65).

BA, güçlü fizyolojik ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle araştırmalarda büyük ilgi görmüştür. BA'nın antitümör, antienflamatuvar, antiHIV, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral ve antimalaryal vb. gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (66). NO'nun aşırı üretimi nöroinflamatuvar hastalıkların oluşmasına yol açabilmektedir. Betülinik asidin NO'nun üretimini baskılayabileceği gösterilmiştir. BA, siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesini de inhibe etmektedir ve dolayısıyla PGE2 sentezini azaltmaktadır. PGE2 ateş, ağrı ve trombosit agregasyonu gibi inflamatuvar semptomlardan sorumludur ve bu nedenle PGE2 inhibisyonu anti-inflamatuvar ilaçların keşfi için BA'yı stratejik bir noktaya taşımaktadır. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF gibi kritik proinflamatuvar sitokinlerin üretimi de BA tedavisiyle azaltılmaktadır (67). Birçok proinflamatuvar etkenin azaltılmasında aslında BA'nın NF- κ B inhibisyonuyla bunu sağladığı belirtilmiştir. Normal şartlarda NF- κ B, inhibitör κ -B α (I κ -B α), p50 ve RelA kompleksiyle sabit bir şekilde sitoplazmada yer almaktadır. Ancak bir inflamatuvar yanıtta bu kompleks fosforile edilmekte ve proteazom aracılığı ile bozunma yaşamaktadır. Böyle bir durumda NF- κ B çekirdeğe taşınmakta ve inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonuna neden olmaktadır. BA'nın bu kompleksi inhibe ettiği düşünülmektedir (Şekil 2.6) (7).



a) LPS uyarısı sonrası TLR4 aracılı sinyalizasyon ile IκBα fosforilasyonu ve proteozomal yıkımı gerçekleşmekte, böylece NF-κB (p50/RelA) kompleksi çekirdeğe taşınarak proinflamatuar mediyatörlerin ifadesini artırmaktadır. b) BA varlığında ise IKK aktivasyonu ve IκBα fosforilasyonu inhibe edilerek NF-κB'nin çekirdeğe geçişi baskılanmakta ve nöroinflamatuvar yanıt azalmaktadır.

Şekil 2.6. Betülinik asidin nöroinflamasyona etkisi.

BA'nın en dikkat çekici farmakolojik özelliklerinden biri, apoptozu alışılagelmiş yolların ötesinde özgün mekanizmalarla aktive edebilme yeteneğidir. Literatürde öne çıkan bulgular, BA'nın doğrudan mitokondriyal membran potansiyeli gradyanını bozarak kaspaz bağımlı bir süreci başlattığını göstermektedir. Bu süreçte mitokondriyal bütünlüğün yitirilmesini takiben gerçekleşen Cyt c salınımı, apoptoz kaskadının geri dönüşü olmayan bir şekilde aktive olmasını sağlamaktadır (68).

BA'nın biyolojik etkinliğinin değerlendirilmesinde, farmakokinetik özellikleri ve merkezi sinir sistemine ulaşabilme kapasitesi önemli parametreler arasında yer almaktadır. Udeani ve arkadaşlarının yapmış oldukları *in vivo* çalışmalarda, BA'nın intraperitoneal uygulamayı takiben 11,5 ila 11,8 saatlik bir eliminasyon yarı ömrüne sahip olduğu ve beyin dokusunda saptanabildiği (1 µg/g) gösterilmiştir; bu durum, bileşiğin KBB geçebilme potansiyeline dair ilk kantitatif kanıtları sunmuştur (69). Literatürdeki kapsamlı çalışmalar, BA'nın KBB'yi penetre edebilme yeteneği sayesinde glioblastoma gibi agresif merkezi sinir sistemi tümörlerinde karşılaşılan önemli terapötik engellerin

aşılabileceğini göstermektedir. Bu özellik, BA'yı nörolojik patolojilerin tedavisinde umut vadeden bir ajan konumuna getirmektedir (70).



3. MATERYAL VE METOT

Bu doktora tezine ait deneysel çalışmalar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi (İNÜTF-DEHÜM) ile İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yürütüldü. Tüm uygulamalar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 23/01/2023 tarihinde onaylanan (2023/2-2 karar sayılı ve 16870 HAYBİS numaralı) etik kurul protokolü doğrultusunda yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Betülinik Asit (Santa Cruz), LPS (Sigma), Ksantin oksidaz (Sigma), Sodyum Klorür (NaCl, Sigma), Nitrotetrazolium Blue Klor (Sigma), 2-Tiyobarbütirik Asit (Sigma), 5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (Sigma), Sığır Serum Albümin (Sigma), Agaroz (Sigma), Potasyum Klorür (Merck), N-Butanol (Fluka), Trikloroasetik asit (AppliChem), Sodyum Sitrat Tri-bazik Dihidrat (Sigma), Sodyum Asetat (Sigma), Guanidin Tiyosiyanat (Sigma), Hidroklorik Asit (Sigma), Hidrojen Peroksit (Sigma-Aldrich), Na-K-tartarat (Sigma-Aldrich), Ksantin (Sigma), Etilendiamintetraasetik Asit (Sigma-Aldrich), 1,1,3,3-Tetramethoksipropan (Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich), tri sodyum sitrat (Sigma-Aldrich), potasyum dihidrojen fosfat (Sigma-Aldrich), Dipotasyum Hidrojen Fosfat (Sigma-Aldrich), Etidyum bromid (Fisher Scientific), Sodyum Dihidrojen Fosfat (Riedel-de-Haen), Disodyum Hidrojen Fosfat (Riedel-de-Haen), Fosforik Asit (Riedel-de-Haen). Caspase-3, Caspase-9, NF- κ B, BAX, BCL-2 ve Cyt c ELISA kitleri BT LAB; RNA saflaştırma kiti, cDNA sentez kiti, qPCR master mix ve primerler ise QIAGEN firmasından temin edildi.

3.2. Kullanılan Alet ve Gereçler

RT-qPZT analizleri için Roche LC96 (İsviçre, Basel) model gerçek zamanlı RT-qPZT sistemi kullanıldı. Tartım işlemleri Denver Instrument (ABD, Colorado) terazi ve Ohaus hassas terazi (İsviçre, Nanikon) ile yapıldı. Elektroforez uygulamalarında Biorad (ABD, Kaliforniya) güç kaynağından yararlanıldı. Doku homojenizasyonu Retsch MM400 bilyeli parçalama cihazıyla sağlandı. pH ölçümleri Mettler Toledo EL20 (ABD, Ohio) cihazıyla yapıldı. Santrifügasyon aşamalarında Hettich-zentrifugen 200 (Almanya, Tuttlingen) model soğutmalı masaüstü santrifüj ile Hermle Z216MK (Almanya,

Wehingen) mikro santrifüj cihazları kullanıldı. Absorbans ölçümleri EpochBiotek (ABD, Kaliforniya) marka spektrofotometreyle gerçekleştirildi. Çözeltilerin hazırlanmasında Heidolph vorteks (Almanya, Schwabach) ve Heidolph manyetik karıştırıcı kullanıldı. Deney ortamının soğutulmasında kullanılan buzlar Scotsmann (ABD, Vernon Hills) marka buz makinesinden elde edildi. Kesit alma ve mikroskopik incelemelerde ise Leica (Almanya, Wetzlar) marka mikrotom ve mikroskop cihazlarından yararlanıldı.

3.3. Gruplandırma ve Model Oluşturulması

Çalışmada Sprague Dawley ırkı 7 haftalık erkek sıçan (ortalama ağırlıkları 150-225 g) kullanıldı. Yapılan power analizi sonucunda I. Tip hata miktarı (alfa) 0.05, testin gücü (1- beta) 0.8 ve etki büyüklüğü 0.60 iken tek yönlü varyans analizi kullanılarak uygulanan teorik güç analizi işlemine göre gerekli olan minimum örneklem büyüklüğü her bir grupta en az 10 olmak üzere toplamda 4 grup için minimum 40 hayvan olarak hesaplandı. 4 deney grubu rastgele atama yöntemiyle oluşturuldu (71). Ancak kontrol grubunda yer alan bir hayvan çalışma sürecinin ilk gününde eksitus olduğundan, deneysel süreç Kontrol grubunda 9 (n=9), LPS grubunda 10 (n=10), BA grubunda 10 (n=10) ve BA+LPS grubunda 10 (n=10) hayvan ile sürdürülmüş ve tamamlanmıştır. Çalışmanın tasarımı, uygulanması ve raporlanması sürecinde ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) kılavuzu esas alınmış ve ilgili önerilere uyulmuştur (72).

Kontrol Grubu (Kontrol, n=9): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca, 3 günde 1 defa (toplam 10 kez) LPS ve BA'nın çözücülerini olan % 0.5 sodyum karboksimetil selüloz ve salin karışımı (CMC-Na/Salin) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı (73).

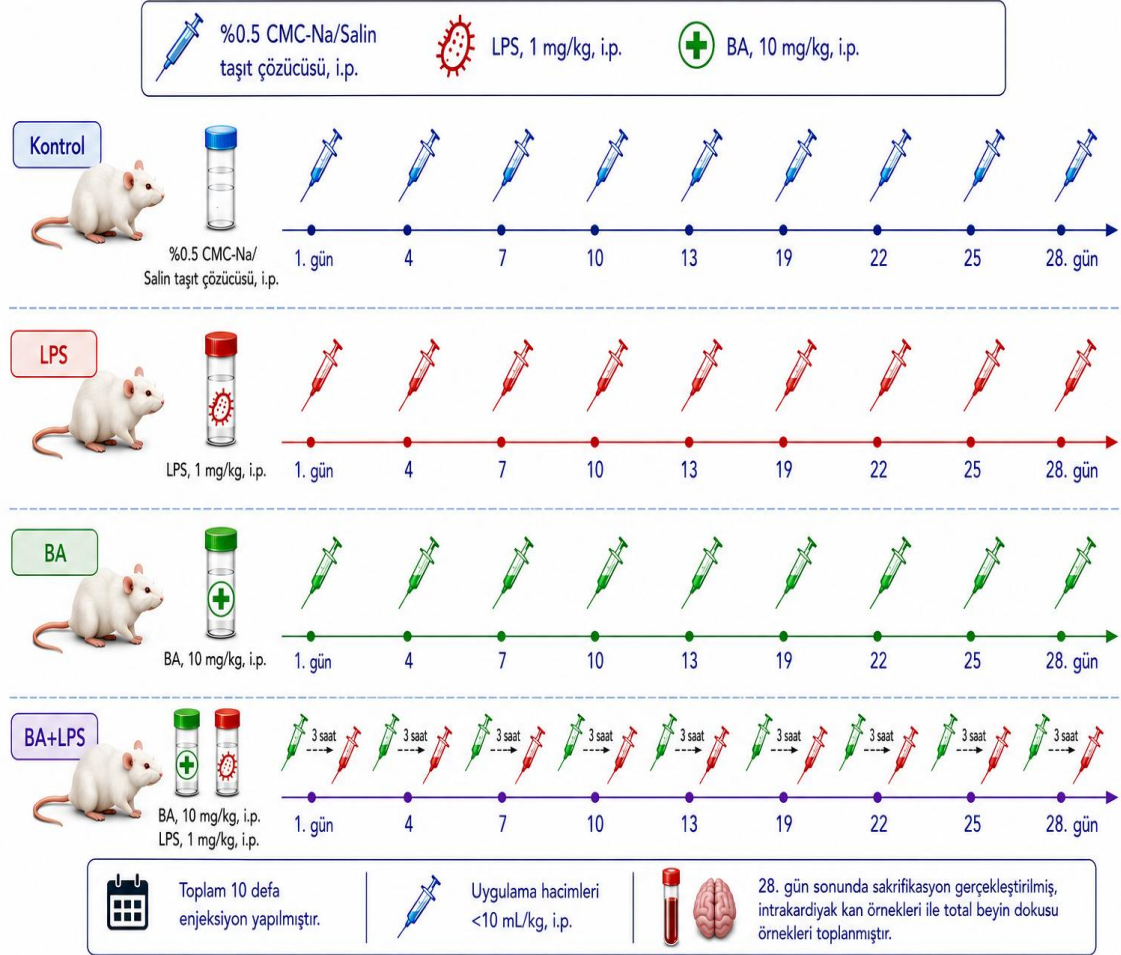
Lipopolisakkarit Grubu (LPS, n=10): Sıçanlara 28 gün boyunca, 3 günde 1 defa (toplam 10 kez) 1 mg/kg vücut ağırlığında LPS, i.p olarak uygulandı (74-76).

Betülinik Asit Grubu (BA, n=10): Sıçanlara 28 gün boyunca, 3 günde 1 defa 10 mg/kg (toplam 10 kez) vücut ağırlığında betülinik asit, i.p olarak uygulandı (77, 78)

BA+LPS Grubu (n=10): Sıçanlara 28 gün boyunca, 3 günde 1 defa (toplam 10 kez), 10 mg/kg vücut ağırlığında betülinik asit ve 3 saat sonrasında 1 mg/kg vücut ağırlığında LPS i.p olarak uygulandı (Şekil 3.1) (74, 79).

Deney süresince yapılan tüm i.p. uygulamalarda enjeksiyon hacimleri, hayvanların canlı ağırlıkları dikkate alınarak <10 mL/kg sınırını aşmayacak şekilde standardize edildi. 28 günlük enjeksiyon periyodunun bitiminde, tüm gruplardaki sıçanlar cerrahi yöntemle kansız bırakılarak ötanazi edildi. Sakrifikasyon prosedürü sırasında,

biyokimyasal ve moleküler parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla eş zamanlı olarak intrakardiyak kan örnekleri ve total beyin dokusu izole edilerek uygun saklama koşullarına alındı.



Şekil 3.1. Deney grupları ve dozların uygulama süreci.

3.4. Biyokimyasal Analizler.

Sıçanlardan toplanan kan örnekleri 10 ml'lik kan ayırma tüplerine alınıp 1.500 x g'de, 10 dakika santrifüj edildi ve serumun ayrılması sağlandı. Serum örnekleri mikro santrifüj tüplerine ayrılarak analiz edilinceye kadar -80 °C'de saklandı. Serum örneklerinin bir kısmından İnönü Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda Beckmann Coulter AU5800 (ABD, Kaliforniya) cihazıyla albumin, albumin DG, direkt bilirubin, total bilirubin, BUN, GGT, kalsiyum, klor, kreatinin, magnezyum, potasyum, sodyum, total protein, AST, ALT ve ALP analizleri yapıldı.

3.4.1. Malondialdehit Analizi (MDA).

Mihara ve Uchiyama yöntemi, sıçan beyin doku örneklerinin çalışılmasında kullanıldı (80). Örnekler % 1.15 KCl çözeltisinde % 10 konsantrasyonda olacak şekilde 1 dakika buz üzerinde, 15.000 x g'de ayarlanmış homojenizatör kullanılarak parçalandı. Homojenatlar doğrudan analiz için kullanıldı.

Tablo 3.1. MDA analiz reaksiyonu tablosu.

Reaktifler	Miktar
Homojenat	250 µl
% 1 Fosforik Asit	1500 µl
% 0.6 (Tiyobarbütirik Asit) TBA	500 µl

Tablo 3.1'de belirtilen oranlara göre cam tüplerde hazırlanan karışımlar vortekslendikten sonra, tüpler en az 95 °C'de bir saat su banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda soğutulan tüplere 2 mL n-butanol ilave edilerek karışımlar en az beş dakika boyunca vortekslendi. Faz ayrımının sağlanabilmesi için örnekler 1.500 × g'de en az 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen renkli üst fazın absorbans değerleri spektrofotometrik olarak 520 ve 535 nm dalga boylarında ölçüldü. MDA konsantrasyonları, 1,1',3,3'-tetrametoksipropan kullanılarak hazırlanan standart eğrisi üzerinden hesaplandı ve sonuçlar nmol/gram yaş doku (g.y.d.) olarak ifade edildi.

3.4.2. Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz Analizi (Cu-Zn SOD)

Beyin doku örneklerinin SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre analiz edildi (81). Doku örnekleri, distile su kullanılarak % 10'luk konsantrasyon olacak şekilde 15.000 x g hızındaki homojenizatör ile buz üzerinde bir dakika boyunca parçalanarak homojenize edildi. Homojenize edilen karışımlar mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp 8.000 × g'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantın üzerine, 3:5 oranında hazırlanmış kloroform/etanol çözeltisi eşit hacimde (1:1) eklenerek karışım tekrar 1.500 × g'de 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. İşlemin ardından tüplerin üst kısmında oluşan berrak kloroform fazı dikkatlice ayrılarak CuZn-SOD analizlerinde kullanılmak üzere toplandı.

Tablo 3.2. SOD analiz reaksiyonu tablosu.

Reaktifler	Örnek	Kör
Analiz reaktifi (0.3 mM/L ksantin, 0.6 mM/L Na₂EDTA, 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1 g/L BSA)	2.45 ml	2.45 ml
Süpernatant	0.5 ml	-
Distile Su	0.5 ml	-
Ksantin Oksidaz (167 Ü/L)	0.05 ml	0.05 ml

Tablo 3.2’de belirtilen tüm reaktifler eklendikten sonra karışım vortekslenerek oda sıcaklığında ve ışık almayan bir ortamda 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandığında, reaksiyonu sonlandırmak amacıyla tüplere 1 mL CuCl₂ (0.8 mmol/L) ilave edildi. Spektrofotometre distile su ile sıfırlandıktan sonra örneklerin absorbensları 560 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen değerler kullanılarak enzim aktivitesi, Ü/gr protein cinsinden ilgili formül üzerinden hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Absorbans (kör)} - \text{Absorbans (numune)}}{\text{Absorbans (kör)}} \times 100$$

$$\text{Ü / ml SOD} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{\% 50 \text{ inhibisyon}}$$

3.4.3. Redükte Glutasyon Analizi (GSH)

Sıçan beyin dokularında glutasyon düzeyleri, Ellman tarafından tanımlanan yöntem temel alınarak belirlendi (82). Doku numuneleri, distile su ile %10’luk konsantrasyon olacak şekilde 15.000 x g hızında çalışan homojenizatör ile buz üzerinde bir dakika boyunca mekanik olarak parçalanarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, mikrosantrifüj tüplerine aktararak 4 °C’de 1.500 × g’de 15 dakika santrifüj edildi. Ayrılan süpernatantlar, eşit hacimde (%10) trikloroasetik asit (TCA) ile 1:1 oranında karıştırılıp yeniden santrifüj işlemine tabi tutuldu. Son santrifüj sonrası elde edilen süpernatant GSH tayini için kullanıldı.

Tablo 3.3. GSH analiz reaksiyonu tablosu.

Reaktifler	Örnek	Kör
% 10'luk homojenat	500 µl	-
0.3 M Na ₂ HPO ₄	4 ml	4 ml
5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)-DTNB (4 mg DTNB+10 ml %1'lik trisodyum sitrat)	500 µl	500 µl
Distile Su	-	500 µl

Tablo 3.3'te belirtilen GSH reaktif karışımlarına, örnekler ile aynı hacimde DTNB ilave edildikten sonra karışımlar vortekslenerek oda sıcaklığında ve ışık almayan bir ortamda 5–10 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından elde edilen absorbans değerleri 410 nm'de ölçülerek hazırlanan glutasyon standart eğrisi ile kıyaslandı ve sonuçlar µmol/gram yaş doku (µmol/gyd) şeklinde ifade edildi.

3.4.4. Protein Tayini

Örneklerin protein düzeyleri, sığır serum albümininin (BSA) standart olarak kullanıldığı Biüret analizi temel alınarak hesaplandı (83).

3.4.5. ELISA Analizleri

Sıçanlardan elde edilen serum ve beyin dokusu örneklerinde ELISA analizleri yapıldı. BT-LAB firmasından temin edilen Caspase-3 (katalog no: E1648Ra), Caspase-9 (katalog no: E1898Ra), BCL-2 (katalog no: E0037Ra), BAX (katalog no: E0034Ra), NF-κB (katalog no: E0287Ra) ve Cytochrome-c (katalog no: E0627Ra) kitleri (tüm kitlerin lot numarası 202410006), üretici tarafından belirtilen ortak “Sandwich ELISA” protokolüne uygun olarak kullanıldı. Beyin dokusu, PBS ile 1:9 oranında seyreltilerek homojenize edildi ve ardından 5.000 × g'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant analizlerde kullanıldı. Serum örnekleri ise herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan doğrudan çalışmaya alındı. Analiz prosedürü şu şekilde uygulandı: Standart çözeltilerden 50 µL, numune örneklerinden ise 40 µL kuyucuklara pipetlendi ve her numune kuyusuna 10 µL spesifik antikor eklendi. Numune ve standart kuyularının tamamına 50 µL streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildikten sonra plak, sızdırmaz film ile

kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plak yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı ve her yıkama arasında birer dakika beklendi. Ardından her kuyucuğa 50 µL Substrat A çözeltisi eklenerek plak yeniden kapatıldı ve 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda kuyucuklara 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiş olup mavi rengin sarıya döndüğü gözlemlendi. On dakika bekleme süresinin ardından absorbans değerleri 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen ölçümler, standart eğrileri kullanılarak değerlendirilmiş ve örneklerdeki hedef protein düzeyleri hesaplandı.

3.5. Moleküler Genetik Analizler

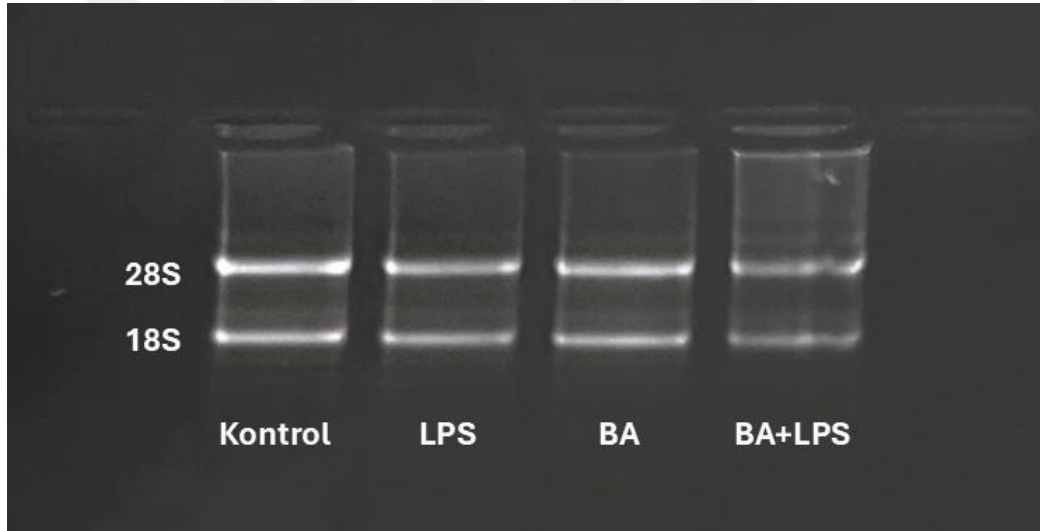
3.5.1. RNA Saflaştırma

Beyin dokusundan RNA izolasyonu, QIAGEN RNAeasy Mini Kit (katalog no: 74104) protokolü uygulanarak yapıldı. Doku örnekleri, % 10’luk homojenat elde edilecek şekilde 1:10 oranında β-merkaptoetanol ile hazırlanmış RLT lizis çözeltisi içinde mekanik parçalamaya tabi tutuldu. Homojenizasyon işlemi, Retsch MM 400 cihazı kullanılarak 30 Hz frekansta 1 dakika süreyle gerçekleştirildi. Elde edilen homojenatlar $15.000 \times g$ ’de 3 dakika santrifüj edildi ve oluşan süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı. Süpernatantlar, hacimce eşit miktarda (% 70) etanol ile karıştırılarak spin-kolonlara yüklendi ve kolonlar $8.000 \times g$ ’de 15 saniye santrifüj edilip alt haznedeki sıvı atıldı. DNA bulaşını önlemek amacıyla, kolon filtresi üzerine DNaz çözeltisi uygulanarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından kolona 700 µL RW1 çözeltisi eklenip $8.000 \times g$ ’de 15 saniye santrifüj edildi ve dipteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem sonrasında kolona sırasıyla 500 µL RPE çözeltisi eklendi ve 15 saniye santrifüj edildi; dipteki sıvı döküldükten sonra aynı hacimde RPE çözeltisi tekrar eklenip $8.000 \times g$ ’de 2 dakika santrifüj edilerek kolon tamamen yıkandı. Yıkama sonrasında spin-kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve filtre üzerine 30–50 µL nükleaz içermeyen su damlatılarak $8.000 \times g$ ’de 1 dakika santrifüj edilip RNA elüe edildi. İzole edilen RNA’nın konsantrasyonu Biotek Gen5 yazılımı kullanılarak spektrofotometrik olarak ng/µL cinsinden belirlendi (Tablo 3.4) Son olarak, elde edilen RNA örnekleri % 1’lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilerek saflıkları doğrulandı (Şekil 3.2).

Tablo 3.4. Doku örneklerinden elde edilen toplam RNA ölçüm değerleri.

Örnek No	Beyin doku toplam RNA (ng/μl)	260/280 Oranı
1	177	2.02
2	217	2.01
3	214	2.05
4	430	2.02
5	228	2.02
6	223	2.02
7	227	2.01
8	383	2.00
9	528	2.02
10	587	2.03
11	421	2.02
12	521	2.01
13	443	2.03
14	464	2.03
15	688	1.96
16	352	2.02
17	715	2.02
18	373	2.01
19	619	2.00
20	384	2.01
21	412	2.03
22	338	2.02
23	548	2.01
24	373	2.00
25	222	2.03
26	196	2.08
27	321	2.03
28	689	2.02

29	339	2.01
30	507	2.02
31	389	1.98
32	722	2.01
33	51	1.95
34	527	2.02
35	461	2.03
36	413	2.02
37	379	2.01
38	493	2.03
39	547	2.02



Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS

Şekil 3.2. Grupların total RNA agaroz jel görüntüsü.

3.5.2. cDNA Sentezi.

Her bir örnek için beyin dokusundan izole edilen toplam RNA'nın 750 ng'ı kullanılarak, cDNA sentezi QIAGEN Quantitect Reverse Transcription Kit (Lot: 175027255) protokolü doğrultusunda yapıldı. Her bir örneğe 2 μ L gDNA Removal Mix eklendikten sonra, belirtilen konsantrasyonlara uygun şekilde RNA ve nükleazsız su eklenerek toplam hacim 15 μ L'ye tamamlandı. Bu karışımlar 45 °C'de 2 dakika inkübe edilerek genomik DNA'nın uzaklaştırılması sağlandı. İnkübasyon sonrasında tüpler buz

üzerine alınarak her reaksiyon karışımına 1 µL Reverse Transcription Enzyme ve 4 µL Reverse Transcription Mix ilave edildi. Sentez aşaması, termal döngü cihazında sırasıyla 25 °C’de 3 dakika, 45 °C’de 10 dakika ve 85 °C’de 5 dakika olacak şekilde yürütüldü. Reaksiyon sonunda elde edilen cDNA örnekleri, analiz aşamasına kadar –80 °C’de muhafaza edildi.

3.5.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-qPZT)

Analizi

CASP3, *CASP9*, *BAX*, *ACTB*, *Cyt c* ve *BCL-2* genlerine ait ifadeler, cDNA örnekleri kullanılarak Roche LightCycler 96 RT-qPCR cihazında QIAGEN QuantiNova® SYBR® Green PCR Mix (katalog no: 77502015) ile analiz edildi. Reaksiyon karışımı; 10 µL 2× QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix, 1 µL primer karışımı, 6 µL nükleazsız su ve 3 µL cDNA olacak şekilde toplam 20 µL hacminde hazırlandı. RT-qPZT protokolü, polimeraz aktivasyonu için 95 °C’de 2 dakika, ardından 95 °C’de 15 saniye ve 60 °C’de 30 saniyelik adımlardan oluşan 45 döngü şeklinde uygulandı. Tüm hedef genlerin relatif gen ekspresyon düzeyleri, *ACTB* geni referans alınarak Livak tarafından tanımlanan $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplandı (84). Analizde kullanılan primer dizileri aşağıdaki tabloda sunuldu (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Primer bilgileri.

Gen Adı	Primer dizileri	Ref. Sekans Numarası	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>ACTB</i>	F: 5’ TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG 3’	NM_0311	139
	R: 5’ CACACAGAGTACTTGCGCTC 3’	44.3	
<i>NF-κB</i>	F: 5’ TTCCTGCTTACGGTGGGATT 3’	NM_0012	103
	R: 5’ CCCCACATCCTCTTCCTTGT 3’	76711.2	
<i>Cyt c</i>	F: 5’ GGCAAGCATAAGACTGGACC 3’	NM_0128	157
	R: 5’ GTCTGCCCTTTCTCCCTTCT 3’	39.2	
<i>CASP3</i>	F: 5’ CATGCACATCCTCACTCGTG 3’	NM_0129	108
	R: 5’ CCCACTCCCAGTCATTCCTT 3’	22.3	
<i>CASP9</i>	F: 5’ AACACGTGAACTTCTGCCC 3’	NM_0316	76
	R: 5’ CCATCTCCATCAAAGCCGTG 3’	32.3	

BCL2	F: 5' CTTCAGGGATGGGGTGAAC 3'	NM_0169	102
	R: 5' ATCAAACAGAGGTCGCATGC 3'	93.2	
BAX	F: 5' TCATGAAGACAGGGGCCTTT 3'	NM_0170	84
	R: 5' CTGCAGCTCCATGTTGTTGT 3'	59.2	

İleri primer (F), geri primer (R)

3.6. Histopatolojik Analizler.

Sıçanlara uygulanan işlemler sonrasında nekropsileri yapıldı ve beyin dokularından elde edilen örnekler, fikse edilmek üzere %10'luk PBS tamponlu formalin içerisine alındı. Artan derecelerdeki alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek dehidre edilen dokular rutin işlemlerin ardından parafine gömülerek bloklandı. Bu parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda histopatolojik değerlendirmeleri yapılmak üzere incelendi. Grupları temsilen ilgili mikroskopik alanlardan fotoğraflar çekildi.

3.7. İstatistiksel Analizler.

Verilerin istatistiksel analizleri MedCalc Versiyon 20.104 ve IBM SPSS Versiyon 27.0 programları kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro–Wilk testi ile, varyans homojenliği ise Levene testi ile değerlendirildi. Dağılım özelliklerine bağlı olarak parametrik koşullar sağlandığında ANOVA ve Tukey HSD post hoc testleri; parametrik olmayan durumlarda ise Kruskal–Wallis testi ve Conover post hoc testleri kullanıldı. Normal dağılım gösteren veriler ortalama ($\bar{x}$) ± standart sapma (ss), normal dağılım göstermeyen veriler ise ortanca (min–maks) olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Serum Biyokimya Sonuçları.

Kontrol ve LPS gruplarında BUN düzeyleri, BA+LPS grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksekti ($P < 0.05$). Total protein düzeyi LPS grubunda, BA ve BA+LPS gruplarına göre anlamlı derecede artmıştı ($P < 0.05$). Albumin değerleri incelendiğinde, Kontrol ve LPS grubunun BA grubuna kıyasla yüksek albumin değerlerine sahip iken, BA+LPS grubu albümin değeri LPS grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($P < 0.05$). Kreatinin düzeyleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P > 0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Serum BUN, Kreatinin, Total protein ve Albumin değerleri.

Gruplar	BUN (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)
Kontrol (n=9)	21 $\pm$ 0.47 ^a	0.3 $\pm$ 0.02	5.8 $\pm$ 0.12 ^{a,b}	2.97 (2.9-3.07) ^{a,b}
LPS (n=10)	20.3 $\pm$ 1.96 ^a	0.3 $\pm$ 0.02	6.0 $\pm$ 0.11 ^a	3.0 (2.9-3.1) ^a
BA (n=10)	19.6 $\pm$ 1.6 ^{a,b}	0.3 $\pm$ 0.04	5.7 $\pm$ 0.15 ^b	2.87 (2.7-3.2) ^c
BA+LPS (n=10)	17.8 $\pm$ 0.8 ^b	0.3 $\pm$ 0.02	5.7 $\pm$ 0.13 ^b	2.90 (2.8-3.0) ^{b,c}

Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Veriler $\bar{x} \pm ss$ ve ortanca (min-maks) olarak gösterildi. (BUN kan üre azotu, kreatinin, total protein seviyeleri için ANOVA, Tukey HSD post hoc testi, albumin seviyeleri Kruskal Wallis, Conover post hoc testi).

Total bilirubin düzeyleri, Kontrol ve LPS gruplarında BA ve BA+LPS gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük saptandı ($P < 0.05$). Direkt bilirubin düzeyleri incelendiğinde, Kontrol ve BA gruplarının LPS ve BA+LPS gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşük değerlere sahip olduğu belirlendi ($P < 0.05$). AST aktivitesi bakımından BA grubunda, Kontrol ve LPS gruplarına göre anlamlı bir azalma tespit edildi

($P < 0.05$). ALT aktivitesi yönünden ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0.05$). ALP enzim aktivitesi, Kontrol, LPS ve BA gruplarında, BA+LPS grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksekti ($P < 0.05$). Ayrıca LPS grubu ALP aktivitesi, Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktü ($P < 0.05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Serum Total Bilirubin, Direkt Bilirubin, AST, ALT ve ALP değerleri.

Gruplar	Total Bilirubin (mg/dL)	Direkt Bilirubin (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
Kontrol (n=9)	0.13 (0.11-0.13) ^a	0.020 (0.01-0.03) ^a	168 (125-258) ^a	61 ± 8.8	315 ± 21 ^a
LPS (n=10)	0.12 (0.10-0.16) ^a	0.035 (0.02-0.06) ^b	166 (120-206) ^a	70 ± 19	272 ± 29 ^b
BA (n=10)	0.15 (0.13-0.19) ^b	0.020 (0.01-0.04) ^a	125 (97-170) ^b	53 ± 5	288 ± 25 ^{a,b}
BA+LPS (n=10)	0.14 (0.13-0.15) ^b	0.040 (0.03-0.05) ^b	131 (113-192) ^{a,b}	54 ± 8	226 ± 21 ^c

Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Veriler $\bar{x} \pm ss$ ve ortanca (min-maks) olarak gösterildi. (Total bilirubin, direkt bilirubin ve AST değerleri Kruskal Wallis, Conover post hoc testi, ALT ve ALP değerleri ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

Sodyum düzeyi, kontrol grubuna göre LPS ve BA gruplarında anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($P < 0.05$). Potasyum düzeyi BA+LPS grubunda LPS grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($P < 0.05$). Klor düzeyi, LPS ve BA+LPS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmisti ($P < 0.05$). Kalsiyum seviyeleri LPS, BA ve BA+LPS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı seviyede düşük bulundu ($P < 0.05$). Magnezyum seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0.05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Serum Sodyum, Potasyum, Klor, Kalsiyum ve Magnezyum değerleri.

Gruplar	Sodyum (mmol/L)	Potasyum (mmol/L)	Klor (mmol/L)	Kalsiyum (mg/dL)	Magnezyum (mg/dL)
Kontrol (n=9)	144 (140-145) ^a	6 (4.8-6.4) ^{a,b}	103.1 ± 1.8 ^a	10.9 ± 0.2 ^a	2.4 ± 0.1
LPS (n=10)	146 (144-147) ^b	5.4 (4.6-6) ^a	105 ± 1 ^b	10.5 ± 0.2 ^b	2.3 ± 0.1
BA (n=10)	145 (142-146) ^c	6 (4.5-6.7) ^{a,b}	104.7 ± 0.9 ^{a,b}	10.3 ± 0.3 ^b	2.4 ± 0.3
BA+LPS (n=10)	144 (142-145) ^{a,c}	6.2 (5.7-6.3) ^b	105.1 ± 1 ^b	10.2 ± 0.2 ^b	2.3 ± 8.8

Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Veriler $\bar{x} \pm ss$ ve ortanca (min-maks) olarak gösterildi. Sodyum ve potasyum seviyeleri (Kruskal Wallis, Conover post hoc testi). Klor, kalsiyum ve magnezyum seviyeleri (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

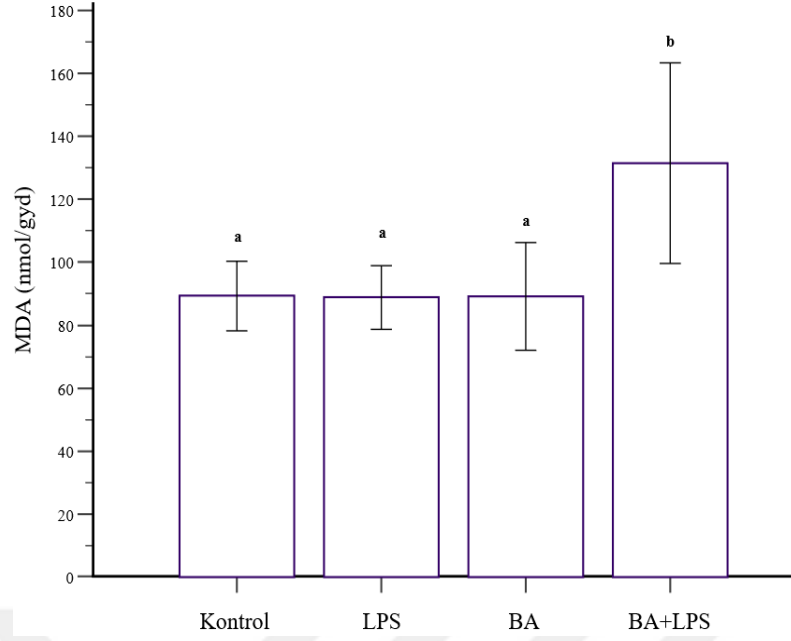
4.2. Beyin Dokusu MDA, GSH Seviyeleri ve SOD Aktivitesi

Beyin doku örneklerinde analiz edilen MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, BA+LPS grubunda Kontrol, LPS ve BA gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($P < 0.05$) (Şekil 4.1). GSH düzeyi ise LPS grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ölçüldü ($P < 0.05$) (Şekil 4.2). Beyin dokusunda SOD aktivitesi incelendiğinde, BA ve BA+LPS gruplarında elde edilen değerlerin LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.3) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Gruplara ait beyin doku MDA, GSH seviyeleri ile SOD aktivite değerleri.

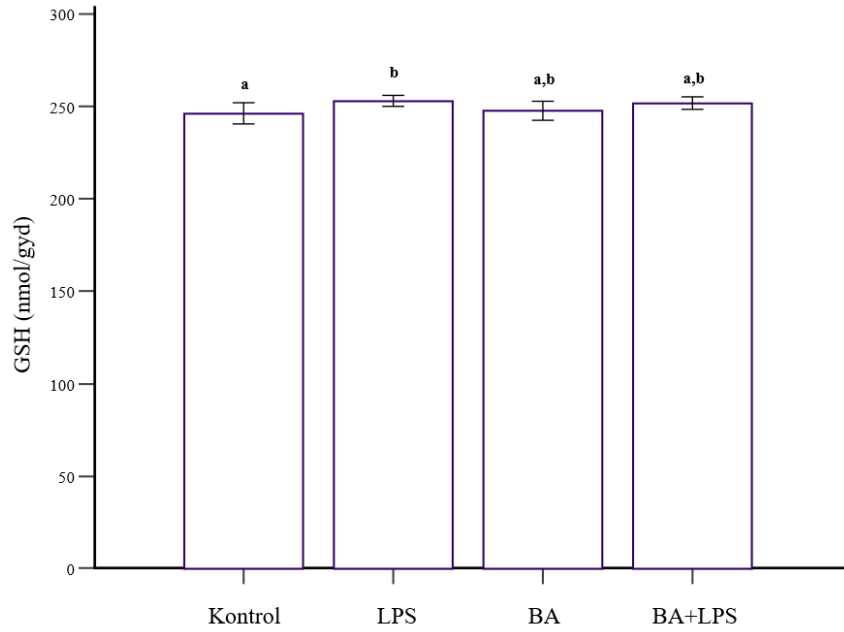
Gruplar	MDA (nmol/gyd)	GSH (nmol/gyd)	SOD (Ü g/protein)
Kontrol (n=9)	88.4 (71-112) ^a	246 ± 5.6 ^a	257 ± 45.7 ^{a,b}
LPS (n=10)	87.9 (73.6-108) ^a	253 ± 3.1 ^b	289 ± 30 ^a
BA (n=10)	87.3 (59.8-112) ^a	248 ± 5.2 ^{a,b}	233 ± 24 ^b
BA+LPS (n=10)	120 (96-209) ^b	252 ± 3.3 ^{a,b}	240 ± 23 ^b

Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır (P < 0.05). Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Veriler $\bar{x} \pm ss$ ve ortanca (min-maks) olarak gösterildi. (İndirgenmiş glutatyon GSH ve süperoksit dismutaz SOD seviyeleri ANOVA, Tukey HSD post hoc testi, malondialdehit MDA seviyeleri Kruskal Wallis, Conover post hoc testi)



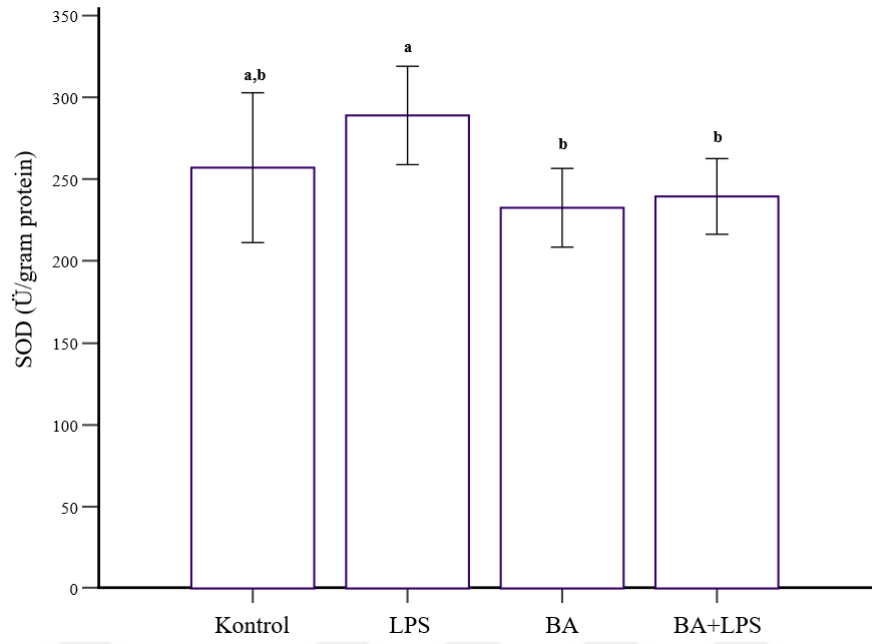
Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (Kruskal Wallis, Conover post hoc testi).

Şekil 4.1. Gruplara ait beyin doku MDA seviyeleri.



Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

Şekil 4.2. Gruplara ait beyin doku GSH seviyeleri.



Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

Şekil 4.3. Gruplara ait beyin doku SOD aktivitesi.

4.3. Doku ve Serum ELISA Analiz Sonuçları

Beyin doku örneklerinde ELISA yöntemi ile ölçülen BAX, BCL-2, Caspase-9 ve NF- κ B protein miktarları gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi ($P > 0.05$). Caspase-3 protein seviyesi BA grubunda Kontrol ve BA+LPS grubuna göre yüksek bulundu ($P < 0.05$). Cyt c protein seviyesi ise BA+LPS grubunda Kontrol grubuna göre artmıştı ($P < 0.05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Doku ELISA analiz sonuçları.

Gruplar	BAX (ng/mL)	BCL-2 (ng/mL)	Caspase-3 (ng/mL)	Caspase-9 (ng/mL)	Cyt c (ng/mL)	NF- κ B (ng/mL)
Kontrol (n=9)	6.2±1.9	5.6±0.6	0.67 (0.61-1.16) ^a	1.0±0.1	5.1±1 ^a	3.6±0.3
LPS (n=10)	7.9±1.6	5.2±0.3	0.81 (0.63-1.26) ^{a,b}	1.1±0.1	6.0±1.1 ^{a,b}	3.7±0.4

BA			0.86			
(n=10)	6.9±2.6	5.2±0.5	(0.53-1.17) ^b	1±0.1	6.1±0.8 ^{a,b}	3.3±0.3
BA+LPS			0.72			
(n=10)	7.3±2.1	5.3±0.5	(0.53-0.87) ^a	1.0±0.1	6.4±0.2 ^b	3.2±0.4

Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır (P < 0.05). (BAX, BCL-2, Caspase-9, Cyt c ve NF-κB ANOVA, Tukey HSD post hoc testi, caspase-3 ise Kruskal Wallis, Conover testi).

Sıçan serum örneklerinde ELISA yöntemi ile ölçülen BAX, Caspase-3, Caspase-9 ve NF-κB protein miktarları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (P > 0.05). BCL-2 protein seviyesi Kontrol ve BA+LPS gruplarında LPS grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (P < 0.05). Cyt c protein seviyesi ise BA+LPS grubunda Kontrol ve LPS grubuna göre yüksek bulundu (P < 0.05) (Tablo 4.6).

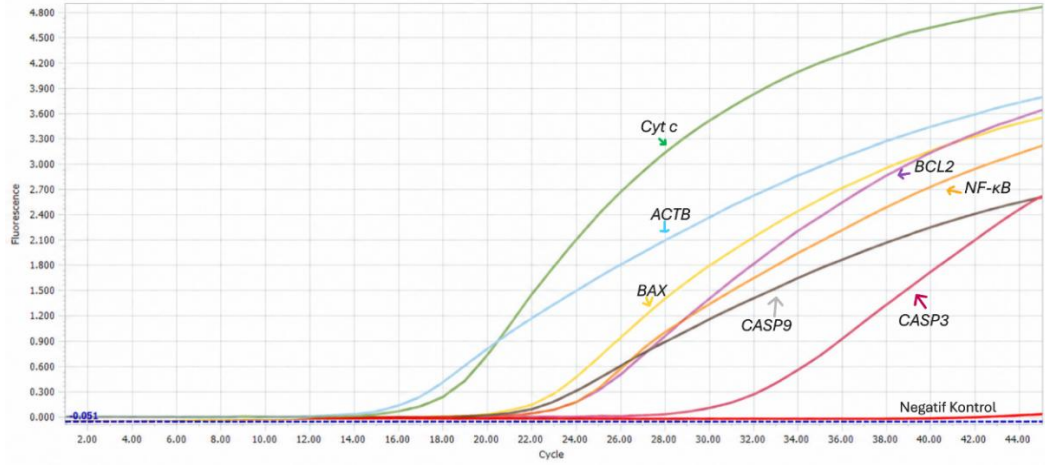
Tablo 4.6. Serum ELISA analiz sonuçları.

Gruplar	BAX (ng/mL)	BCL-2 (ng/mL)	Caspase-3 (ng/mL)	Caspase-9 (ng/mL)	Cyt c (ng/mL)	NF-κB (ng/mL)
Kontrol (n=9)	5.1±1.6	4.4±0.8 ^a	0.4±0.1	0.8±0.1	2.0±0.6 ^a	2.3±0.6
LPS (n=10)	5.4±1.7	5.6±1.0 ^b	0.4±0.1	0.8±0.1	2.0±0.5 ^a	2.2±0.5
BA (n=10)	4.3±1.5	4.7±0.4 ^{a,b}	0.3±0.1	0.8±0.09	2.3±0.7 ^{a,b}	2.6±0.2
BA+LPS (n=10)	4.2±1.9	4.3±1.1 ^a	0.4±0.1	0.8±0.1	3.0±1.0 ^b	2.7±0.7

Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır (P < 0.05). (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

4.4. Gerçek Zamanlı RT-qPZT Sonuçları

Beyin doku örneklerinden elde edilen cDNA'lar RT-qPZT yöntemi ile *ACTB*, *NF-κB*, *Cyt c*, *CASP3*, *CASP9*, *BCL2* ve *BAX* genleri için çoğaltıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Beyin cDNA örneklerinden RT-qPZT ile çoğaltılan *ACTB*, *NF-κB*, *Cyt c*, *CASP3*, *CASP9*, *BCL2* ve *BAX* eğrileri.

Çoğaltılan RT-qPZT ürünlerinin primer özgüllüğünün kontrolü için agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüş ve her bir gene ait tek bant gözlenmiştir (Şekil 4.5).



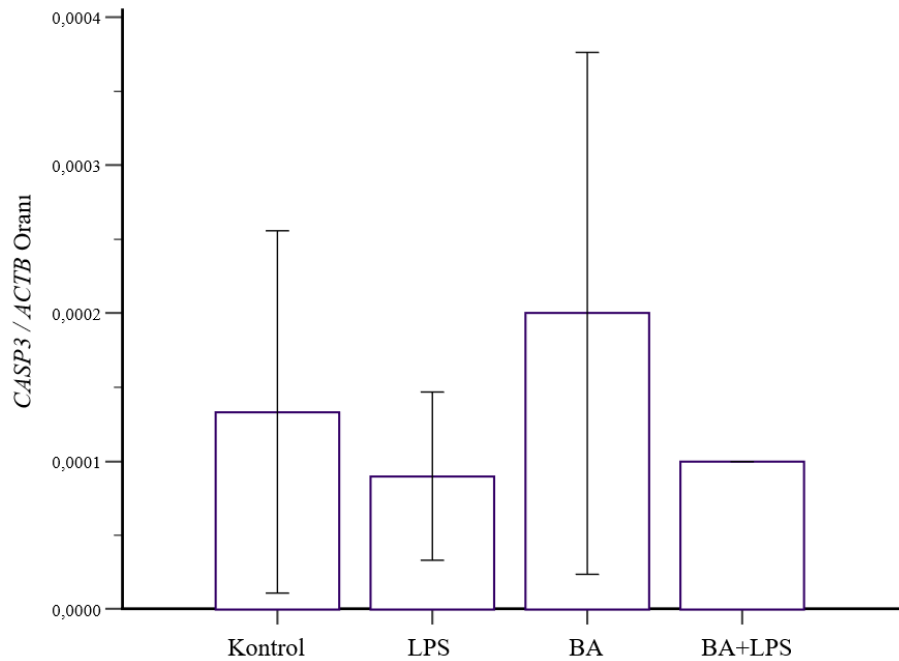
Şekil 4.5. *ACTB*, *NF-κB*, *Cyt c*, *CASP3*, *CASP9*, *BCL2* ve *BAX* genlerine ait çoğaltılan ürünlerin agaroz jel görüntüleri.

Beyin doku örneklerinde *CASP3* gen ifadesi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($P > 0.05$) (Şekil 4.6). *NF-κB* gen ifadesi LPS grubunda BA ve BA+LPS grubuna göre yüksek bulundu ($P < 0.05$) (Şekil 4.7). LPS ve BA+LPS grubu *Cyt c* gen ifadesi, Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($P < 0.05$) (Şekil 4.8) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Beyin dokusu *NF-κB*, *Cyt c* ve *CASP3* gen ifadeleri.

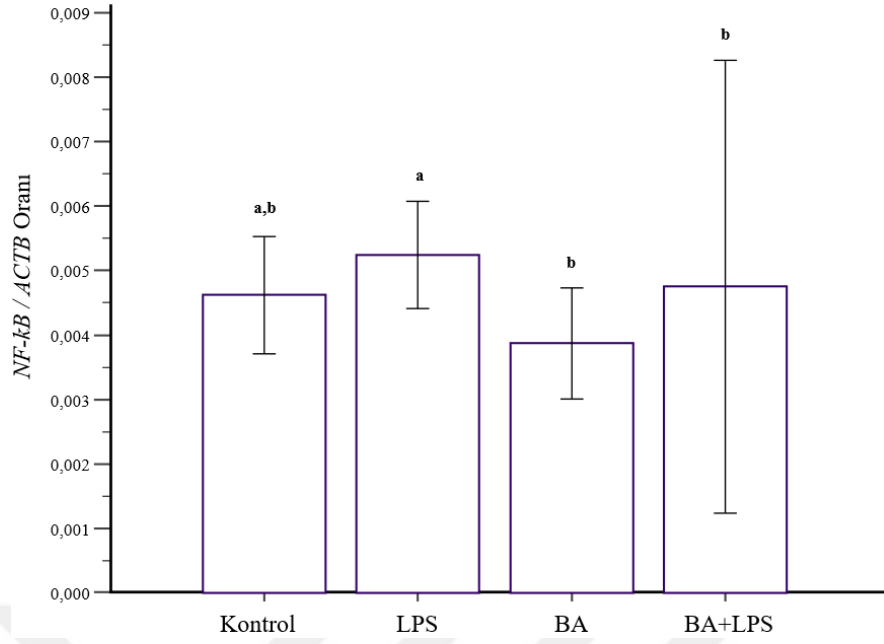
Gruplar	<i>NF-κB</i> / <i>ACTB</i> oranı	<i>Cyt c</i> / <i>ACTB</i> oranı	<i>CASP3</i> / <i>ACTB</i> oranı
Kontrol (n=9)	0.0042 (0.0038-0.0063) ^{a,b}	0.253 (0.204-0.365) ^a	0.000133±0.00001
LPS (n=10)	0.0054 (0.0037-0.0064) ^a	0.197 (0.151-0.261) ^b	0.000090±0.000005
BA (n=10)	0.0039 (0.0024-0.0050) ^b	0.217 (0.153-0.270) ^{a,b}	0.000200±0.00017
BA+LPS (n=10)	0.0036 (0.0026-0.0145) ^b	0.205 ^b (0.150-0.292) ^b	0.000100±0.00001

Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (*NF-κB* ve *Cyt c* Kruskal Wallis, Conover, *CASP3* ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).



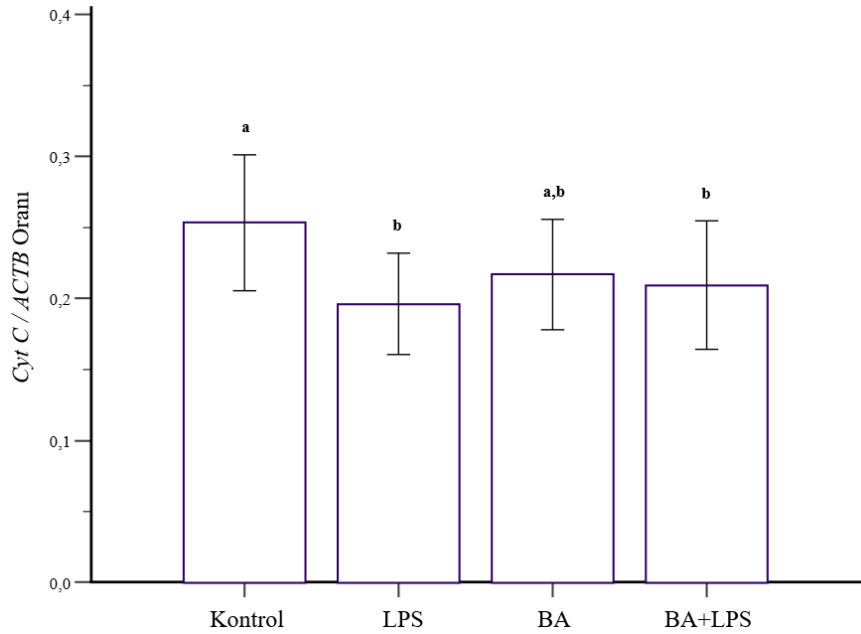
Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi)

Şekil 4.6. Gruplarda beyin dokusuna ait *CASP3* gen ifade seviyeleri.



Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (Kruskal Wallis, Conover testi).

Şekil 4.7 Gruplarda beyin dokusuna ait *NF-κB* gen ifade seviyeleri.



Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (Kruskal Wallis, Conover testi).

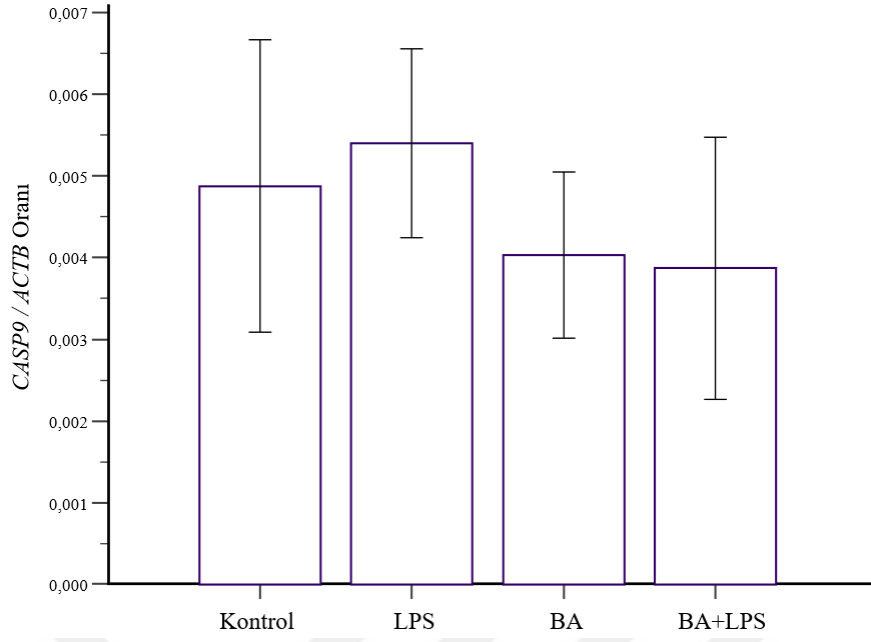
Şekil 4.8. Gruplarda beyin dokusuna ait *Cyt c* gen ifade seviyeleri.

Beyin doku örneklerinde *CASP9* ve *BAX* gen ifadeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($P > 0.05$) (Şekil 4.9 ve 4.10). BA ve BA+LPS grubu *BCL2* gen ifadesinin Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($P < 0.05$) (Şekil 4.11) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Beyin dokusu *CASP9*, *BCL2* ve *BAX* gen ifadeleri.

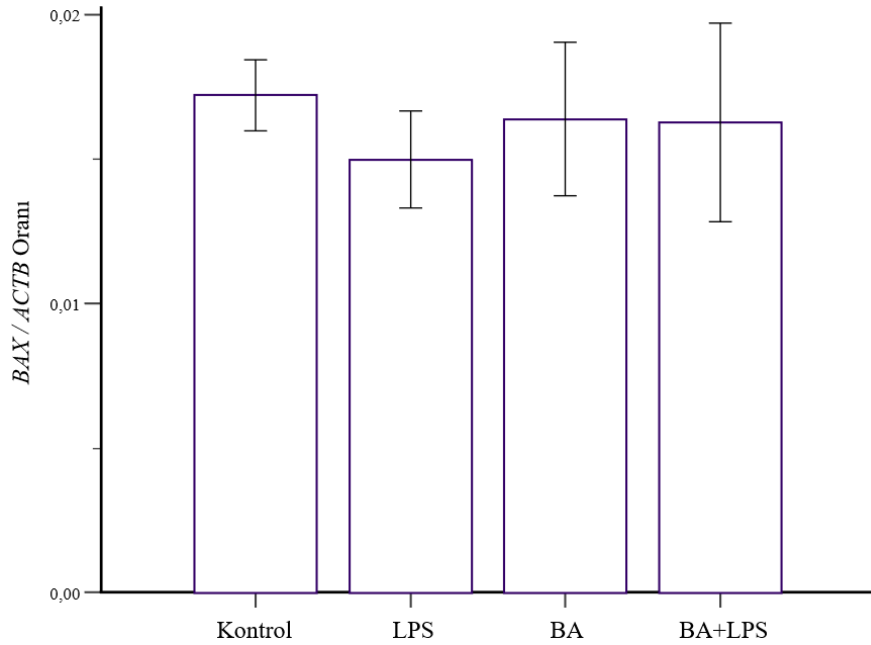
Gruplar	<i>CASP9</i> / <i>ACTB</i> oranı	<i>BCL2</i> / <i>ACTB</i> oranı	<i>BAX</i> / <i>ACTB</i> oranı
Kontrol (n=9)	0.0048 ± 0.0017	0.0042 ± 0.0012 ^a	0.0172 ± 0.0012
LPS (n=10)	0.0054 ± 0.0011	0.0034 ± 0.0006 ^{a,b}	0.0150 ± 0.0016
BA (n=10)	0.0040 ± 0.0010	0.0028 ± 0.0008 ^b	0.0164 ± 0.0026
BA+LPS (n=10)	0.0038 ± 0.0016	0.0029 ± 0.0012 ^b	0.0163 ± 0.0034

Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).



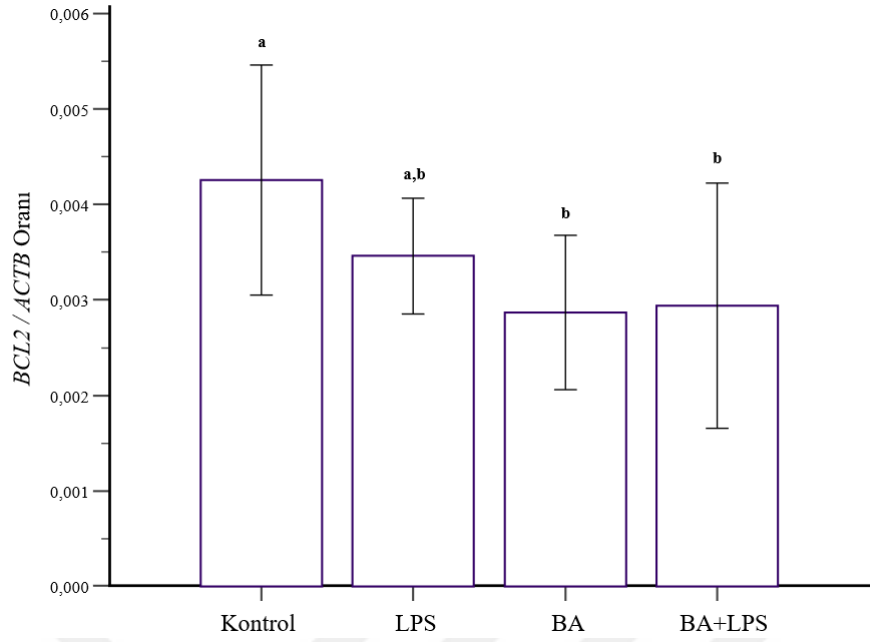
Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

Şekil 4.9 Gruplarda beyin dokusuna ait *CASP9* gen ifade seviyeleri.



Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

Şekil 4.10. Gruplarda beyin dokusuna ait *BAX* gen ifade seviyeleri.

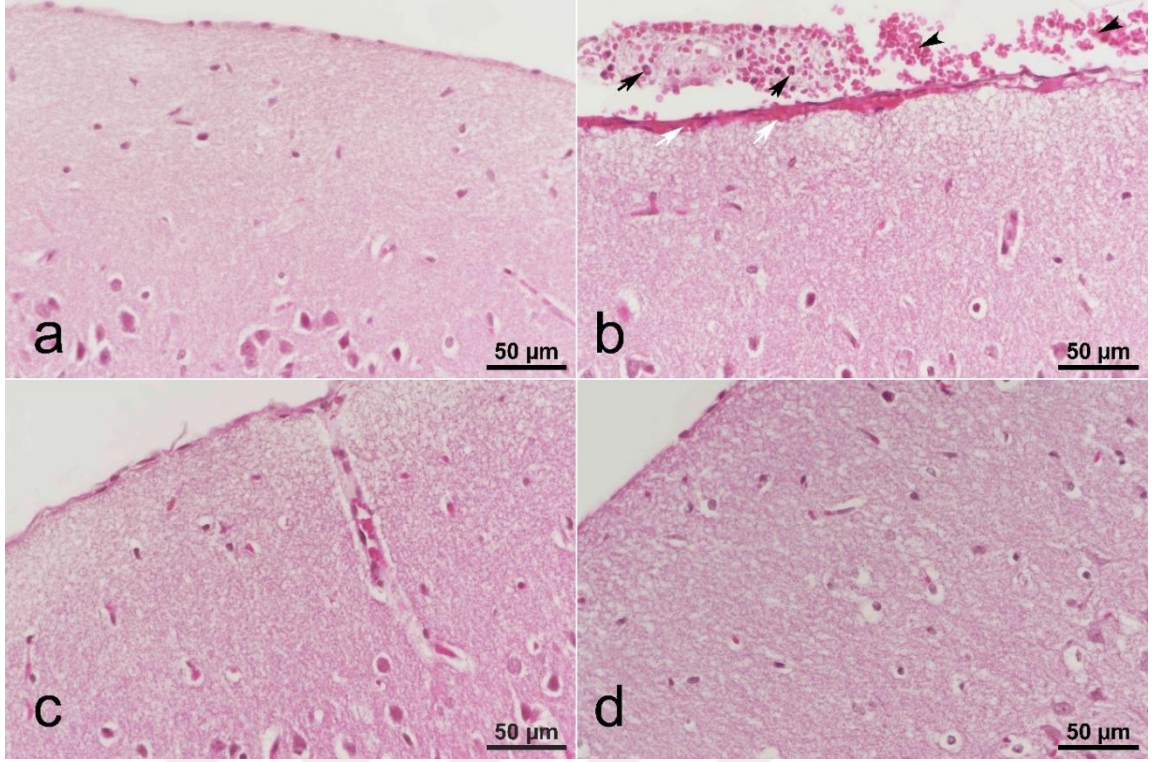


Kontrol grubu (Kontrol), lipopolisakkarit grubu (LPS), betülinik asit grubu (BA) ve BA+LPS. Her bir grupta farklı olan harfler birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$). (ANOVA, Tukey HSD post hoc testi).

Şekil 4.11. Gruplarda beyin dokusuna ait *BCL2* gen ifade seviyeleri.

4.5. Histopatoloji

Mikroskopik muayenede, kontrol grubu deneklerde beyin dokusunun normal histomorfolojik yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12, a). LPS uygulanan deneklerin beyin dokularının incelenmesinde, yangısal reaksiyona ilişkin olarak meninkslerde nötrofil lökositleri de içeren yangısal hücre infiltrasyonu ve meninkslerde genişleme gözlemlendi. Yangısal infiltrasyona eşlik eden ödem, hiperemi ve bazı alanlarda kanama bulguları dikkati çekti. Bazı vakalarda oluşan yangısal infiltrasyonun oldukça şiddetli seviyelere ulaştığı gözlemlendi (Şekil 4.12, b). BA uygulanan deneklerde herhangi bir histopatolojik değişikliğe rastlanmadı (Şekil 4.12, c). BA+LPS grubunda yer alan deneklerin beyin dokularında dikkati çeken histopatolojik değişiklikler gözlemlenmezken bazı vakalarda hafif hiperemi bulgularına rastlandı (Şekil 4.12, d).



a) Kontrol grubu: Beynin normal histomorfolojik görünümü, b) LPS grubu: Meninklerde yangısal hücre infiltrasyonu (siyah oklar), ödem, şiddetli hiperemi (beyaz oklar) ve kanama (siyah ok başları), c) BA grubu: Normal beyin histomorfolojisi ve d) BA+LPS grubu: Yangısal bulgular yok. Normal beyin histomorfolojisi dikkati çekmekte

Şekil 4.12. Beyin dokularına ait H-E boyanmış mikroskopik görüntüler.

5. TARTIŞMA

Bu tezde LPS ile indüklenen sıçan nöroinflamasyon modelinde betülinik asidin intrinsik apoptoz yolağı üzerine olan etkilerinin araştırıldı. Bu amaçla deney gruplarında serum ve beyin dokusundan biyokimyasal, moleküler genetik ve patolojik analizler yapıldı.

Kreatinin, glomerüler filtrasyon hızının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan temel biyobelirteçlerden biri olup, böbrek fonksiyon bozukluğu ve renal hasar durumlarında serum düzeylerinde artış göstermesi beklenmektedir (85). Yapılan araştırmalarda LPS uygulamasının serum kreatininin değerleri üzerinde negatif bir etki oluşturmadığı bildirilmiştir (86). Bu tezde araştırmalara paralel olarak gruplar arasında serum kreatinin seviyesinde herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

BUN, protein metabolizmasının azotlu son ürünü olan ürenin kandaki düzeyini yansıtan ve özellikle renal fonksiyonların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir biyokimyasal parametre olarak bilinmektedir (87). Çalışmamızda LPS uygulaması ile yükselen serum BUN düzeylerinin BA uygulaması sonrası azalması, literatürde bildirilen betülinik asidin inflamasyon ilişkili renal/metabolik bozuklukları baskılayıcı etkileri ile uyumlu bulunmuştur (88). LPS, TLR4/NF- κ B yolaklarını aktive ederek TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırmaktadır. Gelişen oksidatif stres ve renal hasarın glomerüler filtrasyonu azaltabildiği bildirilmektedir. Böbreğin üreyi yeterince filtreleyememesi sonucunda ise BUN düzeylerinde artış meydana gelmektedir (89). Literatürde BA'nın, LPS'nin aktive ettiği NF- κ B aracılı inflamatuvar yanıtı baskılayarak TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe edebildiği bildirilmektedir (90). Çalışmamızda LPS uygulamasıyla yükselen serum BUN düzeylerinin ve değişim gösteren renal biyokimyasal parametrelerin BA uygulaması sonrası normalize edilmesi, literatürde bildirilen betülinik asidin antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri sayesinde böbrek fonksiyonlarını iyileştirici etkileri ile uyumlu bulunmuştur (91).

LPS uygulaması ile artan serum total protein miktarı, kronik LPS maruziyetine yanıt olarak akut faz proteinlerinin sentezinde bir artış nedeni ile ortaya çıkabilmektedir. LPS, dolaşımda TLR4 reseptörleri aracılığıyla karaciğeri uyararak bu proteinlerin üretimini tetiklemektedir (92). Betülinik asit uygulaması sonrasında serum total protein düzeylerinde gözlenen azalmanın, Reiner ve arkadaşlarının fareler üzerinde

gerçekleştirdiği çalışmada bildirilen protein yıkımını artırıcı etkilerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Normal koşullarda ubiquitin ile işaretlenen proteinler proteazom sistemi aracılığıyla parçalanmaya yönlendirilirken, deubiquitinase (DUB) enzimleri bu ubiquitin işaretlerini kaldırarak proteinlerin yıkımını engelleyebilmektedir. Söz konusu çalışmada betülinik asidin DUB aktivitesini inhibe ettiği, buna bağlı olarak çeşitli proteinlerin yıkımını artırdığı ve inflamasyon/proliferasyon ile ilişkili proteinlerin baskılanmasına katkı sağladığı gösterilmiştir (93).

Karaciğer kaynaklı önemli bir plazma proteini olan albümin düzeyinin, kronik inflamatuvar süreçlerde artan globulin seviyelerine bağlı olarak değiştiği ve bu durumun albümin/globulin oranında bozulmaya yol açtığı bildirilmektedir (94). Araştırmamızda LPS grubunda gözlenen yüksek albümin düzeylerinin, BA ve BA+LPS gruplarına kıyasla daha belirgin olmasının; kronik inflamasyon sürecinde gelişebilen dehidratasyona bağlı plazma hacmi azalması ve buna eşlik eden protein konsantrasyonu artışı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim literatürde, kronik inflamatuvar süreçlerde ortaya çıkan sıvı kaybının serum protein konsantrasyonlarında artışlara neden olabileceği bildirilmektedir (95). LPS grubunda yükselen serum ALP enzim aktivitesi, betülinik asit uygulaması ile anlamlı şekilde düşmüştür. LPS'ye bağlı inflamasyon ve oksidatif stresin hepatoselüler hasar ile membran geçirgenliğini artırması sonucu ALP düzeylerinde yükselme meydana gelebilmektedir. BA uygulaması ile düşen ALP aktivitesi, BA'nın NF- κ B ve MAPK ilişkili inflamatuvar yolları baskılayarak bu sistemik stres ve hepatik inflamasyonu azaltması nedeni ile olabileceği bildirilmiştir (7, 96).

Genellikle LPS'nin, eritrosit yıkımını artırması ve karaciğer fonksiyonlarını bozması nedeniyle total bilirubin düzeylerini yükseltme eğiliminde olduğu bilinmektedir (97). Ancak çalışmamızda total bilirubin düzeylerinin BA ve BA+LPS gruplarında, Kontrol ve LPS gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Literatürde, betülinik asidin Nrf2/HO-1 yolağını aktive ederek biliverdinin bilirubine dönüşümünü artırabildiği bildirilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda gözlenen bilirubin artışının, LPS etkisinden çok BA'nın bu yolak üzerindeki düzenleyici etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (7). Direkt bilirubin düzeylerinin, LPS ve BA+LPS gruplarında daha yüksek bulunması, LPS maruziyetinin karaciğerde işlenen (konjuge) bilirubin düzeylerini artırdığını göstermektedir. Bilirubinin karaciğerde konjuge edilerek safra ile atılması normal hepatik fonksiyonların önemli bir parçasıdır. Bu nedenle LPS ve BA+LPS gruplarında direkt bilirubin düzeyinin yüksek saptanması, LPS'nin hepatik konjugasyon mekanizmaları ile safra akışı ve bilirubin atılımı üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceğini

düşündürmektedir. Nitekim literatürde de LPS'nin hepatik homeostazı bozarak bilirubin düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmektedir (98). Araştırmamızda, hepatoselüler hasarın önemli biyobelirteçlerinden biri olan ALT düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Literatürde, inflamasyonun şiddeti ve süresine bağlı olarak deneysel LPS modellerinde serum ALT aktivitesinde her zaman anlamlı bir değişiklik meydana gelmeyebileceği bildirilmiştir (99). Bununla birlikte, değişmeyen ALT düzeylerine rağmen karaciğer dokusunun inflamatuvar süreçlerden etkilenebileceği ve inflamasyona bağlı gelişen olası yapısal veya hücrel değişikliklerin henüz plazmaya ALT enzimi salınımına neden olacak düzeye ulaşmamış olabileceği belirtilmektedir (100). AST, karaciğer, kalp ve kas gibi dokularda bulunan bir enzim olup, yükselişi genel doku hasarının veya metabolik stresin bir belirteci olarak bilinmektedir (101). BA grubunda AST aktivitesinin LPS grubuna göre düşük bulunması, BA'nın genel olarak doku stabilitesini artırarak veya sistemik stresi azaltarak enzim salınımını sınırlamasından kaynaklanabilir (101). ALP genellikle hepatik hücrelerin çalışması, safra işleyişi, kemik metabolizması ve bazı doku onarım süreçlerinin göstergesi olarak kullanılmaktadır. LPS uygulamalarında hepatik ve safra yolu hasarı veya membran stabilitesi bozulması ALP'de artışa neden olabileceği gibi bazı kronik inflamasyon durumlarında azaldığı da raporlanmıştır (102). Çalışmamızda BA+LPS grubunda ALP düzeylerinin LPS ve BA gruplarına göre daha düşük bulunması, BA'nın inflamasyon, metabolik işlev bozukluğu ve toksik stres durumlarında düzenleyici/koruyucu etkiler gösterebildiğini düşündürmektedir. Nitekim literatürde de streptozosin ile indüklenmiş diyabet ve kalp/böbrek disfonksiyon modellerinde BA'nın serum biyokimyasal parametrelerini normalize ettiği ve ALP düzeylerini azalttığı bildirilmektedir (103, 104).

İyon dengesinin bulgularında (sodyum, klor ve potasyum gibi) LPS ile indüklenen kronik inflamasyonun enzimatik aktivite ve iyon dengesi üzerindeki çok yönlü etkilerini görmektedirken BA'nın ise bu etkiler üzerindeki düzenleyici potansiyeli karşımıza çıkmaktadır. Bu iyonların dengesi, nöronal membran yapısı için kritik öneme sahiptir; sistemik bozulmalar MSS'yi dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Literatürde betülinik asidin elektrolit düzeyleri üzerindeki etkilerini doğrudan inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Sodyum, sinir iletimi ve membran potansiyelinin sürdürülmesinde görev alan temel bir elektrolit olarak bilinmektedir. Nöroinflamasyon süreçlerinde ise inflamasyona bağlı sodyum homeostazının bozulabildiği ve bunun nöronal fonksiyonları etkileyebileceği düşünülmektedir (105). Çalışmamızda sodyum düzeylerinin LPS ve BA gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek saptanması; LPS'nin inflamasyon

aracılı sıvı-elektrolit dengesini bozucu etkisi ile BA'nın elektrolit homeostazı üzerindeki spesifik düzenleyici rollerinin bir yansıması olarak değerlendirilmektedir. Nitekim literatürde, ürolitiyazis modeli oluşturulan sıçanlarda BA uygulamasının sodyum düzeylerini arttırdığı bildirilmekle birlikte (106); LPS kaynaklı endotoksemi sürecinde gelişen katabolizma, renal fonksiyonel sapmalar ve nöro-hormonal yanıtların da serum sodyum seviyelerindeki bu yükselişten sorumlu olduğu belirtilmektedir (107). Potasyum, membran potansiyeli ve sinir iletiminin sürdürülmesinde görev alan temel bir elektrolit olarak bilinmekte olup, nöroinflamasyon süreçlerinde LPS'nin potasyum homeostazı ve iyon kanalları üzerinde değişikliklere yol açarak nöronal fonksiyonları etkileyebildiği bildirilmektedir (108). LPS'nin bu etkisine karşın BA'nın ise oksidatif stres koşullarında azalan Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini koruyarak iyon homeostazı üzerinde düzenleyici ve koruyucu etkiler gösterebildiği bildirilmektedir (109). Çalışmamızda BA+LPS grubunda potasyum düzeylerinin LPS grubuna göre daha yüksek bulunması, BA'nın iyon dengesi üzerindeki bu düzenleyici etkisini destekler niteliktedir. Klor, hücre dışı sıvının temel anyonlarından biri olup ozmotik denge, asit-baz düzeni ve nöronal membran potansiyelinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Nöroinflamasyon süreçlerinde ise klor homeostazında meydana gelen değişikliklerin GABA aracılı inhibitör iletimi ve nöronal aktiviteyi etkileyerek nörolojik fonksiyonlarda değişimlere neden olabileceği bildirilmektedir (110). Çalışmamızda saptanan yüksek klor düzeylerinin; LPS ve BA+LPS gruplarında kontrol grubuna kıyasla belirginleşmesi, inflamasyon sürecinin tetiklediği iyon homeostazındaki sapmalarla ilişkilendirilmektedir. Nitekim literatürde, klor dengesindeki bozulmaların nöroinflamatuvar yanıtlar, nöronal ileti mekanizmaları ve hücrel su-elektrolit dengesi üzerinde doğrudan etkili olduğu bildirilmektedir (111). Kalsiyum, hücrel sinyal iletimi, nörotransmitter salınımı, kas kasılması ve membran stabilitesinde görev alan temel bir elektrolit olarak bilinmekte olup, kalsiyum homeostazındaki bozulmaların nöroinflamasyon ve nörodejeneratif süreçlerde hücre içi kalsiyum birikimini artırarak oksidatif stres ve nöronal hasara yol açtığı bildirilmektedir (112). Çalışmamızda LPS, BA ve BA+LPS gruplarında kontrol grubuna kıyasla düşük saptanan serum kalsiyum düzeylerinin; inflamasyon süreci ve bozulan iyon homeostazı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Literatürde, LPS kaynaklı endotoksemide artan inflamatuvar sitokinlerin ve hücre içi kalsiyum geçişinin serum kalsiyum seviyelerinde düşüşe yol açtığı bildirilmektedir (113). Ayrıca BA'nın hücre içi kalsiyum akışını artırıcı etkisi çalışmamızdaki BA ve BA+LPS gruplarında gözlenen serumdaki düşük kalsiyum seviyesinin nedeni olabilir (114). Magnezyum, enzimatik reaksiyonlar, enerji

metabolizması, sinaptik iletim ve nöronal membran stabilitesinde görev almaktadır. Araştırmamızda magnezyum düzeylerinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemesi, hem LPS hem de BA uygulamalarının serum magnezyum seviyelerini belirgin şekilde etkilememesinden kaynaklanabileceği gibi, vücuttaki toplam magnezyumun büyük bölümünün kemik ve hücre içi kompartımanlarda bulunması, ekstrasellüler sıvıda yalnızca yaklaşık % 1'inin ve serumda ise yaklaşık % 0.3'ünün yer alması nedeniyle serum magnezyum düzeylerinin total vücut magnezyumunu yeterince yansıtmamasına bağlı olarak da açıklanabilir (115).

Oksidatif stres parametreleri, inflamasyon ve hücre hasarın saptanmasındaki kritik rolleri nedeniyle bu çalışmanın temel analiz basamaklarından birini oluşturmaktadır. MDA, hücre zarındaki yağ asitlerinin oksidatif hasara uğraması sonucu oluşan reaktif bir son ürün olup, oksidatif stresin önemli biyobelirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Nöroinflamasyon süreçlerinde artan serbest radikal üretimine bağlı olarak MDA düzeylerinin yükseldiği ve bunun nöronal hasara katkı sağlayabildiği bildirilmektedir (116, 117). Çalışmamızda beyin doku örneklerinden analiz edilen MDA düzeylerinin, BA+LPS grubunda Kontrol ve BA gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. LPS uygulamalarının beyin ve periferik dokularda oksidatif stres oluşturduğu ve bunun bir göstergesi olarak MDA düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmektedir. Bu durum, LPS'nin mikroglia aktivasyonunu ve ROT üretimini artırarak nöroinflamasyona bağlı oksidatif hasarı tetikleyebildiğini göstermektedir (118). Ayrıca BA'nın, apoptozu indüklemek amacıyla ROT üretimini artırarak prooksidan bir sinyal molekülü gibi davranabildiği bildirilmektedir (119). BA+LPS grubundaki MDA artışının, LPS'nin yol açtığı oksidatif hasar ve BA'nın ROT üretimini artırıcı etkilerinin bir araya gelmesiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. GSH hücre içi en yaygın ve güçlü antioksidan sistemlerden birisi olarak bilinmektedir. ROT ve RNT gibi oksidatif ajanları enzimatik olarak nötralize ederek (örneğin GPx) hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır. Bu antioksidan savunma mekanizması, yüksek oksidatif stres duyarlılığı nedeniyle özellikle beyin dokusunda büyük önem taşımaktadır (120). Çalışmamızda LPS grubunun beyin GSH seviyesinin diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuş olması organizmanın bu endotoksine karşı oluşan nöroinflamasyon ve hasara karşı yanıtı olarak düşünülmektedir. LPS, NF- κ B gibi moleküller aracılığıyla sitokinleri tetiklerken aynı zamanda hücre içi oksidatif stresi artırmaktadır. Bu durum, beynin hücrelerinde Nrf2 (Nükleer Faktör Eritroid 2-İlişkili Faktör 2) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Nrf2 aktivasyonu, hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için glutatyon sentezinde görev alan

enzimlerin (Gama-Glutamil Sistein Ligaz, GCL gibi) aşırı üretimine neden olmaktadır (121). Literatürde BA uygulamasının, tümör hücrelerinde GSH seviyelerini düşürerek hücrel redoks dengesini bozduğunu ve hücreleri oksidatif hasara karşı savunmasız bırakarak apoptozu tetiklediğini belirtilmektedir (122). SOD, süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit'e dönüştürerek hücrenin temel antioksidan savunmasını oluşturan önemli bir enzim olarak bilinmektedir. SOD aktivitesindeki artış ise hücrenin oksidatif strese karşı savunma yanıtını artırdığını göstermektedir (123). Çalışmamızda LPS grubunda saptanan SOD aktivite artışı; LPS'nin TLR4 reseptörünü aktive ederek NADPH oksidaz gibi enzimleri uyarması ve buna bağlı olarak süperoksit radikali üretimini artırması sonucu gelişen oksidatif stres ile ilişkili olabilir. Artan oksidatif stresin ise hücrel savunma mekanizmalarından biri olan Nrf2 yolağını aktive ederek başta SOD olmak üzere çeşitli antioksidan enzimlerin transkripsiyonel ekspresyonunda artışa yol açtığı düşünülmektedir (124, 125). BA'nın, Nrf2/TXNIP/NLRP3 sinyal yolları üzerinden inflamatuvar yanıtı modüle ederek LPS kaynaklı oksidatif stresini baskılayabildiği bildirilmektedir (90). BA ve BA+LPS gruplarında saptanan düşük SOD düzeyleri, betülinik asidin LPS aracılı oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt üzerindeki düzenleyici etkileri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tezde beyin dokusunda ELISA yöntemiyle gerçekleştirilen analizlerde, LPS ile oluşturulan nöroinflamasyon modelinde BA'nın apoptoz ve inflamasyon süreçlerini post-translasyonel düzeyde nasıl etkilediğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda intrinsik apoptotik yolda görev alan BAX, BCL-2, Caspase-9, Cyt c ve Caspase-3 proteinleri ile temel inflamatuvar düzenleyicilerden biri olan NF- κ B'nin toplam protein düzeyleri incelenmiştir. Yapılan analizlerde gruplarda BAX, BCL-2, Caspase-9 ve NF- κ B protein miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. BAX (proapoptotik) ve BCL-2 (antiapoptotik) proteinlerinin apoptoz sırasında genellikle miktarları değil, aktivasyon durumları ve subselüler yerleşimleri (translokasyonlarını) değişebilmektedir (126). Literatür verileri ışığında, Caspase-9'un fonksiyonel aktivitesinin protein sentez miktarından ziyade apoptozom oluşumu ve kesilme süreçlerine bağlı olduğu, bu nedenle toplam protein miktarının aktivasyon durumu için doğrudan bir gösterge kabul edilmediği düşünülmektedir (127, 128). Araştırmacılar, apoptotik yolağın bileşenlerinin zamana bağlı dinamik değişimler gösterdiğini ve ölçüm zamanının elde edilen protein düzeylerini önemli ölçüde etkileyebileceğini vurgulamışlardır. Bu doğrultuda, çalışmamızda apoptotik protein düzeylerinde belirgin değişiklik saptanmamış olması, benzer deneysel

modellerde bildirilen bulgularla uyumludur (129). Çalışmamızda Caspase-3 düzeylerinin BA grubunda Kontrol ve BA+LPS gruplarına kıyasla daha yüksek bulunması, betülinik asidin bilinen proapoptotik etkileri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (130). Cyt c düzeylerinin BA+LPS grubunda Kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olması, BA ve LPS'nin mitokondriyal yolak üzerindeki ortak/interaktif etkilerinden kaynaklanabilir. Betülinik asidin tek başına mitokondriyal membran bütünlüğünü etkileyerek sitokrom c salınımını uyarabildiği, LPS kaynaklı inflamatuvar sürecin ise mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres aracılığıyla Cyt c kaçışına katkı sağlayabildiği bilinmektedir. BA ve LPS'nin birlikte uygulanmasının, BA+LPS grubunda Cyt c düzeylerinde sinerjistik veya additif bir artış oluşturmuş olabilir (129, 130).

Serum ELISA sonuçlarında da dokuya benzer şekilde bazı protein miktarları açısından fark gözlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada, LPS'nin deneysel modellerde özellikle beyin, karaciğer ve akciğer gibi dokularda belirgin inflamasyon ve apoptotik yanıt oluşturduğu; ancak bu değişimlerin serum protein düzeylerine her zaman doğrudan yansımaya bileceği bildirilmektedir (131). Bu durumun Sitokin ve apoptotik proteinlerin lokal dokuda sınırlı kalması ve birçok proapoptotik proteinin hücre içi lokal düzenleyici olarak rol alıp dolaşıma salınmaması nedeni ile olabileceği bildirilmektedir (5, 132). BA'nın hücrel koşullara bağlı olarak NF- κ B ve kaspaz aktivasyonunu modüle edebildiği, buna bağlı olarak bazı durumlarda proapoptotik süreçleri desteklerken bazı durumlarda ise inflamatuvar yanıtı baskılayıcı etkiler oluşturabildiği belirtilmektedir. Literatürde, betülinik asidin apoptotik mekanizmalar ve inflamatuvar sinyal yolları üzerinde çift yönlü düzenleyici etkilere sahip olduğu ve fizyopatolojik koşullara bağlı olarak farklı biyolojik yanıtlar oluşturabildiği bildirilmektedir (133). Serum BCL-2 düzeylerinin BA+LPS gruplarında LPS grubuna kıyasla daha düşük bulunmasının farklı mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. LPS'nin, TNF- α ve NF- κ B aracılığıyla hem proapoptotik hem de anti-apoptotik sinyal yollarını aktive edebildiği; özellikle erken dönemde artan BCL-2 ekspresyonunun hücrel sağkalımın sürdürülmesine katkı sağladığı bildirilmektedir (134). Buna karşın BA+LPS grubunda gözlenen düşük BCL-2 düzeylerinin, betülinik asidin BCL-2 ekspresyonunu baskılayıcı/proapoptotik etkileri ile ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir. Nitekim literatürde BA'nın çeşitli inflamasyon ve kanser modellerinde BCL-2 inhibitörü olarak görev yapabildiği bildirilmiştir (135). Serum Cyt c düzeylerinin BA+LPS grubunda Kontrol ve LPS gruplarına kıyasla daha yüksek bulunmasının nedeni betülinik asidin mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak sitokrom c salınımını tetiklemesi ve LPS

ile birlikte uygulanmasının mitokondriyal stresi artırmasıyla ilişkisi olabilir. Ayrıca bu kombinasyonun, hücrelerin Cyt c salınımı ile karakterize olan erken mitokondriyal stres/apoptotik faza geçişini hızlandırmış olabileceği değerlendirilmektedir (136, 137).

Bu tezde RT-qPCR bulgularımız, *CASP3*, *CASP9* ve *BAX* gen ifadeleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur. *CASP9*'un apoptosom aracılı dimerizasyonla, *CASP3*'ün proteolitik kesilmeyle (cleavage) ve *BAX*'ın mitokondriyal translokasyon ile aktive olması, apoptotik yanıtın büyük ölçüde post-translasyonel düzeyde düzenlendiğini göstermektedir. Bu nedenle apoptotik süreçlerde meydana gelen fonksiyonel değişiklikler her zaman mRNA düzeylerine yansımayaabilmektedir (138, 139). Nitekim geçici fokal serebral iskemi modelinde gerçekleştirilen bir çalışmada, belirgin doku hasarı ve gelişen inflamatuvar yanıtı rağmen *CASP3* ve *BAX* mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir artış saptanmamış; araştırmacılar bu durumu apoptotik yolların yeni gen ekspresyonundan ziyade mevcut proteinlerin aktivasyonu ile ilerlediğinin bir göstergesi olarak değerlendirmiştir (140). *CASP9* aktivasyonunun, çoğunlukla Cyt c, APAF-1 ve dATP/ATP'nin oluşturduğu apoptosom kompleksi aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir. Bu süreçte procaspase-9'un apoptosom kompleksine katılması, dimerleşmesi ve katalitik aktivite kazanması gerekmektedir. Söz konusu mekanizma; proteinlerin hücre içi yeniden dağılımı ve kompleksleşmesi üzerinden ilerlediğinden, yeni mRNA sentezine ihtiyaç duymamaktadır. Bu nedenle Caspase-9 aktivasyonu, mRNA düzeylerinde belirgin bir artış olmaksızın da gerçekleşebilmektedir (141). *BAX*, normal koşullarda hücre sitoplazmasında bulunan proapoptotik bir protein olarak bilinmektedir. Apoptoz uyarısı oluştuğunda ise *BAX*, mitokondrinin dış zarına taşınarak burada kümelenmekte (oligomerleşme) ve mitokondriyal zar geçirgenliğini artırmaktadır. Bunun sonucunda sitokrom c sitoplazmaya salınmakta ve kaspaz kaskadı aktive edilerek apoptotik süreç başlatılmaktadır. Araştırmacılar, bu mekanizmanın çoğunlukla yeni *BAX* sentezinden ziyade mevcut *BAX* proteinlerinin hücre içindeki yer değiştirmesi (translokasyonu) ile gerçekleştiğini bildirmektedir (142). *BAX* mekanizmasının yeni protein sentezinden çok translokasyon üzerinden ilerlemesi, bu proteinin oksidatif strese karşı hızlı yanıt verebilen bir "erken uyarı sistemi" gibi davranmasını sağlamaktadır. Nitekim bazı çalışmalarda, *BAX*'ın hücrel stres sinyallerine kısa sürede yanıt verebildiği ve apoptotik süreci transkripsiyonel aktivasyondan bağımsız şekilde başlatabildiği bildirilmiştir. Bu durum, oksidatif yük altındaki hücrelerde yeni gen ifadesinin oluşmasını beklemeden mevcut *BAX* proteinlerinin aktivasyonu ile apoptozun tetiklenebileceğini düşündürmektedir

(143). *NF-κB* gen ifadesinin LPS grubunda BA ve BA+LPS grubuna göre yüksek bulunması hipotezimizle tamamen uyumlu bir sonuç içermektedir. LPS, TLR4 reseptörü aracılığıyla güçlü bir şekilde NF-κB yolunu aktive etmektedir. Böylelikle hem *NF-κB* hedef genlerinin transkripsiyonunu hem de NF-κB bileşenlerinin düzenlenmesini tetiklemektedir. MSS’de LPS uyarımıyla *NF-κB* artışı birçok çalışmada gösterilmiştir (144). BA uygulanan gruplarda *NF-κB* gen ifadesinin LPS grubuna kıyasla daha düşük bulunması, betülinik asidin NF-κB sinyal yolağını doğrudan veya dolaylı mekanizmalar aracılığıyla baskılayabildiğini düşündürmektedir. Nitekim literatürde, BA’nın özellikle IKK kompleksini inhibe ederek *NF-κB* aktivasyonunu ve buna bağlı transkripsiyonel süreçleri baskılayabildiği birçok çalışmada bildirilmektedir (13, 28, 145). Çalışmamızda *Cyt c* gen ifadesinin LPS ve BA+LPS gruplarında Kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. LPS grubunda gözlenen *Cyt c* gen ifadesi artışının, sitokrom c’nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasıyla ilişkili intrinsik apoptotik yolağın aktivasyonunu yansıtabileceği düşünülmektedir. Nitekim LPS’nin; mitokondriyal stres, membran potansiyelinde bozulma ve buna bağlı sitokrom c salınımı ile ilişkili olduğu beyin dokusu ve immün hücre modellerinde gösterilmiştir (146). BA+LPS grubunda saptanan *Cyt c* gen ifadesi artışının; LPS kaynaklı mitokondriyal hasarın, betülinik asidin proapoptotik etkileriyle sinerjik olarak güçlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde BA’nın, mitokondriyal membran bütünlüğünü bozarak membran potansiyelinde kayba yol açtığı ve bu yolla *Cyt c* salınımını tetikleyerek intrinsik apoptotik kaskadı doğrudan aktive ettiği bildirilmektedir (147). Araştırmamızda *BCL2* gen ifadesinin BA ve BA+LPS gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlemlendi. BCL-2’nin, hücrel sağkalımı destekleyen anti-apoptotik bir düzenleyici protein olduğu bilinmektedir (127). Betülinik asidin birçok deneysel modelde *BCL2* gen ifadesini baskılayarak BAX/BCL-2 dengesini proapoptotik yönde değiştirdiği ve böylece apoptotik süreçleri desteklediği (135) ve ayrıca BA’nın Nrf2/NF-κB ilişkili sinyal yolları üzerinden *BCL2* transkripsiyonunu azalttığı bildirilmiştir (147).

Çalışmamızın histopatolojik bulguları, kronik LPS uygulamasının meninksler ve beyin dokusunda belirgin inflamatuvar yanıt ve vasküler bozulmaya neden olduğunu göstermektedir. Beyin zar tabakasında gözlenen nötrofil infiltrasyonu, ödem, hiperemi ve kanama bulgularının; LPS’nin KBB’in geçirgenliğini artırması ve lökosit göçünü tetiklemesiyle ilişkili olduğu benzer şekilde başka çalışmalarda da bildirilmiştir (148). LPS uygulamalarının KBB bütünlüğünü bozduğu, tight-junction proteinleri ve basal lamina bileşenlerinin parçalanmasında rol aldığı, endotel yapının bozunumuna sebep

olduğu ve parankimal/zar inflamasyonu ile ilgili olarak  dem ve kanamaya yol açtığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (149). LPS'nin oluşturduğu mikrogial/astroitik aktivasyon ve nitrik oksit sentaz artışı mikroskobik kanamalar meydana getirmektedir. Bu bizim bulgularımızdaki kanama bulgularıyla  rtuşmektedir (150). LPS'nin bu verilerine karşılık, tek başına BA uygulanan hayvanlarda histomorfolojik bir bozulmanın görülmemesi, BA'nın uygulanan doz ve protokol altında nörotoksik olmadığını ve doku düzeyinde iyi tolere edildiğini göstermektedir. Nitekim literatürde de BA'nın çeşitli in vivo modellerde nöroprotektif, anti-inflamatuvar ve antioksidatif etkileri bildirilmiştir (151). Özellikle BA'nın mikrogia fenotipini proinflamatuvar M1 formundan antiinflamatuvar M2 formuna kaydırabildiği, AMPK-bağımlı yollar aracılığıyla inflamasyonu baskılayıp doku hasarını azaltabildiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu mekanizmaların, BA+LPS grubunda gözlenen histolojik inflamasyon azalmasını açıklayabileceği düşünülmektedir (79).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezin;

Serum biyokimyasal bulguları, LPS'nin sistemik inflamatuvar ve metabolik yanıtı artırabileceğini, BA'nın ise bu yanıtı kısmen baskılayarak homeostatik dengenin korunmasına katkı sağlayabileceğini, ayrıca gözlenen elektrolit ve protein düzeylerindeki değişimlerin, doğrudan organ fonksiyon bozukluğundan ziyade inflamasyona bağlı biyokimyasal yanıtları yansıtabileceğini,

Beyin dokusu antioksidan parametre bulguları, LPS kaynaklı nöroinflamasyonun oksidatif stres yanıtını etkileyebileceğini, BA uygulamasının ise oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan savunma mekanizmaları üzerinde düzenleyici etkiler oluşturarak nöroinflamatuvar süreçte hücrel homeostazın sürdürülmesine katkı sağlayabileceğini,

Doku ELISA bulguları, LPS maruziyetinin beyin dokusunda protein miktar düzeyinde belirgin bir apoptotik yanıt oluşturmakta sınırlı kalabileceğini, buna karşın BA'nın Caspase-3 ve Cyt c artışıyla intrinsik yolak üzerinden apoptozu modüle etme kapasitesine sahip olabileceğini,

Serum ELISA bulguları, LPS'nin apoptotik yanıtı sistemik düzeyde belirgin biçimde aktive edemeyebileceğini; buna karşın betülinik asidin apoptotik ve inflamatuvar yolaklar üzerinde hücrel koşullara bağlı modülatör etkiler oluşturabileceğini, BA'nın anti-apoptotik bir belirteç olan BCL-2 düzeylerini baskılayarak, mitokondriyal stres ve sitokrom c salınımı ile ilişkili Cyt c düzeylerini artırması; hücre ölüm süreçlerini daha çok mitokondri odaklı/intrinsik apoptotik mekanizmalar üzerinden etkileyebileceğini,

Gen ifade bulguları, LPS'nin özellikle NF- κ B aracılı inflamatuvar yanıtı ve mitokondriyal stres mekanizmalarını aktive etmiş olabileceğini, betülinik asidin ise NF- κ B sinyal yolağını baskılama, *BCL2* transkripsiyonunu azaltma ve Cyt c yanıtını artırma ile nöroinflamasyon sürecinde hem antiinflamatuvar hem de mitokondri odaklı proapoptotik etkiler oluşturabileceğini,

Histopatolojik bulguları, kronik LPS uygulamasının KBB üzerinde belirgin bozulmalara yol açabileceğini; meninkslerde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, hiperemi ve vasküler hasar oluşturabileceğini, buna karşın BA'nın LPS kaynaklı bu patolojik değişiklikleri azaltıcı etki gösterebileceğini ortaya koyabilmektedir.

Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, betülinik asidin LPS kaynaklı nöroinflamasyonda inflamatuvar yanıtı baskılayabildiği, oksidatif dengeyi düzenleyebildiği ve histopatolojik doku hasarını azaltabildiği söylenebilir. Özellikle NF-

κ B aktivasyonunu inhibe etmesi ve mitokondriyal apoptotik yolak üzerinde düzenleyici etkiler göstermesi, BA'nın nöroinflamatuvar süreçlerde potansiyel nöroprotektif özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, betülinik asidin biyolojik etkilerinin doz, uygulama süresi ve hücresel stres düzeyine bağlı olarak değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalarda farklı doz ve süre protokollerinin değerlendirilmesi, davranışsal ve fonksiyonel analizlerin eklenmesi, ayrıca protein düzeyindeki değişimlerin immünohistokimyasal ve ileri moleküler yöntemlerle desteklenmesi; betülinik asidin nöroinflamatuvar süreçlerdeki terapötik potansiyelinin daha kapsamlı biçimde ortaya konmasına katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

1. Chiurchiù V, Leuti A, Maccarrone M. Bioactive lipids and chronic inflammation: managing the fire within. *Front Immunol.* 2018;9:38.
2. Oronsky B, Caroën S, Reid T. What exactly is inflammation (and what is it not?). *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14905.
3. Liu D, Zhong Z, Karin M. NF- κ B: A double-edged sword controlling inflammation. *Biomedicines.* 2022;10(6):1250.
4. Kaur N, Chugh H, Sakharkar MK, Dhawan U, Chidambaram SB, Chandra R. Neuroinflammation mechanisms and phytotherapeutic intervention: a systematic review. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(22):3707-31.
5. Page MJ, Kell DB, Pretorius E. The role of lipopolysaccharide-induced cell signalling in chronic inflammation. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* 2022;6:1-18.
6. Zhou F, Pichersky E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;55:1-10.
7. Oliveira-Costa JF, Meira CS, Neves MVGD, Dos Reis BPZC, Soares MBP. Anti-inflammatory activities of betulinic acid: a review. *Front Pharmacol.* 2022;13:883857.
8. Jiang W, Li X, Dong S, Zhou W. Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: Application and research progress. *Biomed Pharmacother.* 2021;142:111990.
9. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity.* 2019;50(6):1352-64.
10. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine.* 2016;1(1):1003.
11. Demmings MD, da Silva Chagas L, Traetta ME, Rodrigues RS, Acutain MF, Barykin E, et al. (Re) building the nervous system: A review of neuron–glia interactions from development to disease. *J Neurochem.* 2025;169(1):1-31.

12. Vidal-Itriago A, Radford RA, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, et al. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Front Immunol.* 2022;13:997786.
13. Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:815347.
14. Valles SL, Singh SK, Campos-Campos J, Colmena C, Campo-Palacio I, Alvarez-Gamez K, et al. Functions of astrocytes under normal conditions and after a brain disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):1-27.
15. Zhao Y, Huang Y, Cao Y, Yang J. Astrocyte-mediated neuroinflammation in neurological conditions. *Biomolecules.* 2024;14(10):1204:1-24.
16. Gualerzi A, Lombardi M, Verderio C. Microglia-oligodendrocyte intercellular communication: role of extracellular vesicle lipids in functional signalling. *Neural Regen Res.* 2021;16(6):1194-5.
17. García-Domínguez M. Neuroinflammation: mechanisms, dual roles, and therapeutic strategies in neurological disorders. *Curr Issues Mol Biol.* 2025;47(6):1-29.
18. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein $\text{NF-}\kappa\text{B}$ by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986;47(6):921-8.
19. Serasanambati M, Chilakapati SR. Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases-a review. *South Indian J Biol Sci.* 2016;2:368-87.
20. Liang Y, Chen G, Yang Y, Li Z, Chen T, Sun W, et al. Effect of canonical NF- κ B signaling pathway on the differentiation of rat dental epithelial stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10:1-13.
21. Sivamaruthi BS, Raghani N, Chorawala M, Bhattacharya S, Prajapati BG, Elossaily GM, Chaiyasut C. NF- κ B pathway and its inhibitors: a promising frontier in the management of Alzheimer's disease. *Biomedicines.* 2023;11(9):1-24.
22. Aslan A, Beyaz S, Gok O, Erman O. The effect of ellagic acid on caspase-3/bcl-2/Nrf-2/NF- κ B/TNF- α /COX-2 gene expression product apoptosis pathway: a new approach for muscle damage therapy. *Mol Biol Rep.* 2020;47(4):2573-82.

23. Kim ME, Lee JS. Mechanisms and emerging regulators of neuroinflammation: exploring new therapeutic strategies for neurological disorders. *Curr Issues Mol Biol.* 2024;47(1):1-33.
24. Xu X, Lai Y, Hua Z-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019;39(1):BSR20180992.
25. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(7):395-417.
26. Erekat NS. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clin Anat.* 2022;35(1):65-78.
27. Yuan J, Ofengeim D. A guide to cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(5):379-95.
28. Shen M, Hu Y, Yang Y, Wang L, Yang X, Wang B, Huang M. Betulinic acid induces ros-dependent apoptosis and s-phase arrest by inhibiting the nf-kb pathway in human multiple myeloma. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019(1):5083158.
29. Glover HL, Schreiner A, Dewson G, Tait SW. Mitochondria and cell death. *Nat Cell Biol.* 2024;26(9):1434-46.
30. Hordyjewska A, Ostapiuk A, Horecka A, Kurzepa J. Betulin and betulinic acid: Triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochem Rev.* 2019;18(3):929-51.
31. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017(1):8416763.
32. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front Physiol.* 2020;11:552535.
33. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol.* 2024;98(5):1323-67.

34. Chen TH, Wang HC, Chang CJ, Lee SY. Mitochondrial glutathione in cellular redox homeostasis and disease manifestation. *Int J Mol Sci.* 2024;25:1-19.
35. Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, Panzera C, Gangemi S, Minciullo PL. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update. *Molecules.* 2023;28:1-17.
36. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
37. Bjørklund G, Peana M, Maes M, Dadar M, Severin B. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021;120:470-8.
38. Chidambaram SB, Anand N, Varma SR, Ramamurthy S, Vichitra C, Sharma A, et al. Superoxide dismutase and neurological disorders. *IBRO Neurosci Rep.* 2024;16:373-94.
39. Correia AS, Cardoso A, Vale N. Oxidative stress in depression: the link with the stress response, neuroinflammation, serotonin, neurogenesis and synaptic plasticity. *Antioxidants.* 2023;12:470-83.
40. Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, Landi F, Bernabei R, Marzetti E. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation: Intertwined roads to neurodegeneration. *Antioxidants.* 2020;9:647-56.
41. Patergnani S, Bouhamida E, Leo S, Pinton P, Rimessi A. Mitochondrial oxidative stress and “mito-inflammation”: actors in the diseases. *Biomedicines.* 2021;9(2):216.
42. Puthenparampil M, Tomas-Ojer P, Hornemann T, Lutterotti A, Jelcic I, Ziegler M, et al. Altered csf albumin quotient links peripheral inflammation and brain damage in ms. *N Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(2):e951.
43. Skrzypczak-Wiercioch A, Sałat K. Lipopolysaccharide-induced model of neuroinflammation: mechanisms of action, research application and future directions for its use. *Molecules.* 2022;27(17):5481.
44. Younes-Ibrahim MS, Younes-Ibrahim M. Biomarkers and kidney diseases: a brief narrative review. *J Lab Precis Med.* 2022;7:5-22.

45. Pottel H, Delanaye P, Cavalier E. Exploring renal function assessment: creatinine, cystatin c, and estimated glomerular filtration rate focused on the european kidney function consortium equation. *Ann Lab Med.* 2024;44(2):135-43.
46. He Y, Ding F, Yin M, Zhang H, Hou L, Cui T, et al. High serum ast/alt ratio and low serum ins*pa product are risk factors and can diagnose sarcopenia in middle-aged and older adults. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:843610:1-12.
47. Ghany MG, Feld JJ, Chang K-M, Chan HLY, Lok ASF, Visvanathan K, et al. Serum alanine aminotransferase flares in chronic hepatitis B infection: the good and the bad. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(4):406-17.
48. Huang S-S, Ding Y, Yi X-N, Mao H-Y, Xie Z-Y, Shen X-K, et al. Exploring the inverse relationship between serum total bilirubin and systemic immune-inflammation index: insights from NHANES data (2009–2018). *Eur J Med Res.* 2024;29(1):362.
49. Novák P, Jackson AO, Zhao G-J, Yin K. Bilirubin in metabolic syndrome and associated inflammatory diseases: New perspectives. *Life Sci.* 2020;257:118032.
50. Duvall LE, Shipman AR, Shipman KE. Investigative algorithms for disorders affecting plasma proteins with a focus on albumin and the calculated globulin fraction: a narrative review. *J Lab Precis Med.* 2023;8:1-19.
51. Hooper C, Pinteaux-Jones F, Fry VA, Sevastou IG, Baker D, Heales SJ, Pocock JM. Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *J Neurochem.* 2009;109(3):694-705.
52. Muller AC, Bell AE. Electrolyte update: Potassium, chloride, and magnesium. *Nursing2020 Cri Care.* 2008;3(1):5-7.
53. Taheri M, Bahrami A, Habibi P, Nouri F. A review on the serum electrolytes and trace elements role in the pathophysiology of covid-19. *Biol Trace Elem Res.* 2021;199(7):2475-81.
54. Bertani B, Ruiz N. Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *Ecosal plus.* 2018;8(1):10.1128/ EcoSal Plus. 2018:1-30.
55. Mazgaen L, Gurung P. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):379-97.

56. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):20-6.
57. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol.* 2013;182(2):375-87.
58. Kalyan M, Tousif AH, Sonali S, Vichitra C, Sunanda T, Praveenraj SS, et al. Role of endogenous lipopolysaccharides in neurological disorders. *Cells.* 2022;11(24):4038.
59. Mrak RE, Griffin WST. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging.* 2005;26(3):349-54.
60. Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):1-19.
61. Nazaruk J, Borzym-Kluczyk M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochem Rev.* 2015;14(4):675-90.
62. Laszczyk MN. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta medica.* 2009;75(15):1549-60.
63. Orchel A, Kulczycka A, Chodurek E, Bębenek E, Borkowska P, Boryczka S, et al. Influence of betulin and 28-O-propynoylbetulin on proliferation and apoptosis of human melanoma cells (G-361). *Adv Hyg Exp Med (Online).* 2014;68:191-7.
64. Tsai J-C, Peng W-H, Chiu T-H, Lai S-C, Lee C-Y. Anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. and betulinic acid. *Am J Chin Med.* 2011;39(05):943-56.
65. Nemli E, Saricaoglu B, Kirkin C, Ozkan G, Capanoglu E, Habtemariam S, et al. Chemopreventive and chemotherapeutic potential of betulin and betulinic acid: mechanistic insights from in vitro, in vivo and clinical studies. *Food Sci Nutr.* 2024;12(12):10059-69.
66. Lou H, Li H, Zhang S, Lu H, Chen Q. A review on preparation of betulinic acid and its biological activities. *Molecules.* 2021;26(18):5583.
67. Meira CS, do Espirito Santo RF, Dos Santos TB, Orge ID, Silva DKC, Guimarães ET, et al. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF-kB/calcineurin inhibitor,

- alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. *Eur J Pharmacol.* 2017;815:156-65.
68. Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression. *Mol Med Rep.* 2016;14(5):4489-95.
 69. Udeani GO, Zhao GM, Geun Shin Y, Cooke BP, Graham J, Beecher CW, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos.* 1999;20(8):379-83.
 70. Fernandes S, Vieira M, Prudêncio C, Ferraz R. Betulinic acid for glioblastoma treatment: reality, challenges and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2024;25:1-29.
 71. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;39(2):175-91.
 72. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000410.
 73. Nader MA, Baraka HN. Effect of betulinic acid on neutrophil recruitment and inflammatory mediator expression in lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2012;46(1-2):106-13.
 74. Ranneh Y, Akim AM, Hamid HA, Khazaai H, Fadel A, Mahmoud AM. Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2, NF- κ B and p38 MAPK. *Nutr Metab (Lond).* 2019;16(1):15.
 75. Keymoradzadeh A, Hedayati Ch M, Abedinzade M, Gazor R, Rostampour M, Taleghani BK. Enriched environment effect on lipopolysaccharide-induced spatial learning, memory impairment and hippocampal inflammatory cytokine levels in male rats. *Behav Brain Res.* 2020;394:112814:1-10.
 76. Yegla B, Foster T. Effect of systemic inflammation on rat attentional function and neuroinflammation: possible protective role for food restriction. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:296-9.
 77. Abrishamdar M, Sarkaki A, Farbood Y. The effects of betulinic acid chronic administration on the motor, non-motor behaviors, and globus pallidus local field

- potential power in a rat model of hemiparkinsonism. *Iran J Basic Med Sci.* 2022;25(11):1357-63.
78. Abrishamdar M, Farbood Y, Sarkaki A, Rashno M, Badavi M. Evaluation of betulinic acid effects on pain, memory, anxiety, catalepsy, and oxidative stress in animal model of Parkinson's disease. *Metab Brain Dis.* 2023;38(2):467-82.
 79. Li C, Zhang C, Zhou H, Feng Y, Tang F, Hoi MP, et al. Inhibitory effects of betulinic acid on LPS-induced neuroinflammation involve M2 microglial polarization via CaMKK β -dependent AMPK activation. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:98.
 80. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1):271-8.
 81. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.
 82. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-7.
 83. Hiller A, Greif RL, Beckman WW. Determination of protein in urine by the biuret method. *J Biol Chem.* 1948;176(3):1421-9.
 84. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
 85. Wang X, Mu J, Ma K, Ma Y. Challenges of serum creatinine level in gfr assessment and drug dosing decisions in kidney injury. *Adv Pharm Bull.* 2024;14(4):745-58.
 86. Heemann U, Szabo A, Hamar P, Müller V, Witzke O, Lutz J, Philipp T. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury : possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *Am J Pathol.* 2000;156(1):287-93.
 87. Lopez-Giacoman S, Madero M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J Nephrol.* 2015;4(1):57-73.
 88. Yang Y, Yao H, He J, Ou Z, Huang Y, Ba W, et al. Betulinic acid attenuates lipopolysaccharide-induced kidney inflammatory injury by suppressing panoptosis in weaned piglets. *Vet Sci.* 2026;13(3):213-23.

89. Ragab AS, El-Kelany AS, Sewilam HM, El-Kashef DH. Renoprotective impact of tiron against diclofenac-induced nephrotoxicity: targeting TLR4/NF- κ B/NLRP3/Caspase-1/IL1- β pathway. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2025;26(1):179.
90. Zhu L, Kong L, Huang Y, Ou Z, Huang C, Yang W, et al. Betulinic acid protects against LPS-induced intestinal inflammatory damage via inhibiting Nrf2/TXNIP/NLRP3 signaling pathways in mice. *Food Funct.* 2025;16(20):8048-60.
91. Lingaraju MC, Pathak NN, Begum J, Balaganur V, Ramachandra HD, Bhat RA, et al. Betulinic acid attenuates renal oxidative stress and inflammation in experimental model of murine polymicrobial sepsis. *Eur J Pharm Sci.* 2015;70:12-21.
92. Nakadate K, Saitoh H, Sakaguchi M, Miruno F, Muramatsu N, Ito N, et al. Advances in understanding lipopolysaccharide-mediated hepatitis: mechanisms and pathological features. *Curr Issues Mol Biol.* 2025;47(2):79.
93. Reiner T, Parrondo R, de Las Pozas A, Palenzuela D, Perez-Stable C. Betulinic acid selectively increases protein degradation and enhances prostate cancer-specific apoptosis: possible role for inhibition of deubiquitinase activity. *PLoS One.* 2013;8(2):e56234.
94. Cameron K, Nguyen AL, Gibson DJ, Ward MG, Sparrow MP, Gibson PR. Albumin and its role in inflammatory bowel disease: the old, the new, and the future. *J Gastroenterol Hepatol.* 2025;40(4):808-20.
95. Abedi F, Zarei B, Elyasi S. Albumin: a comprehensive review and practical guideline for clinical use. *Eur J Clin Pharmacol.* 2024;80(8):1151-69.
96. Pan F, Zhao X, Liu F, Luo Z, Chen S, Liu Z, et al. Triterpenoids in jujube: a review of composition, content diversity, pharmacological effects, synthetic pathway, and variation during domestication. *Plants.* 2023;12(7):1501-12.
97. Cardoso FL, Kittel A, Veszelka S, Palmela I, Tóth A, Brites D, et al. Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e35919.
98. Takami Y, Tanaka M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. The effect of lipopolysaccharide on liver homeostasis and diseases based on the mutual

- interaction of macrophages, autophagy, and damage-associated molecular patterns in male F344/DuCrIj rats. *Vet Pathol.* 2023;60(4):461-72.
99. Yang Y, Zhong W, Zhang Y, Cheng Y, Lai H, Yu H, et al. Sustained inflammation induced by lps leads to tolerable anorexia and fat loss via tlr4 in mice. *J Inflamm Res.* 2022;15:5635-48.
 100. Thakur S, Kumar V, Das R, Sharma V, Mehta DK. Biomarkers of hepatic toxicity: an overview. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2024;100:100737.
 101. Ndrepepa G. Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. *J Lab Precis Med.* 2020;6:1-17.
 102. Ray CS, Singh B, Jena I, Behera S, Ray S. Low alkaline phosphatase (ALP) in adult population an indicator of zinc (Zn) and magnesium (Mg) deficiency. *Curr Res Nutr Food Sci J.* 2017;5(3):347-52.
 103. Ahangarpour A, Shabani R, Farbood Y. The effect of betulinic acid on leptin, adiponectin, hepatic enzyme levels and lipid profiles in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic mice. *Res Pharm Sci.* 2018;13(2):142-8.
 104. Hong M-H, Na S-W, Jang Y-J, Yoon J-J, Lee Y-J, Lee H-S, et al. Betulinic acid improves cardiac-renal dysfunction caused by hypertrophy through calcineurin-NFATc3 signaling. *Nutrients.* 2021;13(10):3484.
 105. 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 Barriers CNS.* 2016;13(1):19:1-69.
 106. Mariano LNB, Vequi G, da Silva RdCV, Macarini AF, Dada A, Costa TM, et al. In vitro and in vivo antiurolithic effect of betulinic acid obtained from citharexylum mirianthum. *Plants.* 2024;13(15):2141.
 107. Sivak KV, Stosman KI, Rassokha TA, Aleksandrov AG, Kuzmich NN, Orshanskaya YR, et al. The effect of tlr4 blockade on some indicators of systemic inflammatory response to proteus mirabilis LPS in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(6):795-7.
 108. Ozsoy N, Dallas ML. Dysfunctional K⁺ homeostasis as a driver for brain inflammation. *Encyclopedia.* 2024;4(4):1681-99.

109. Ekşioğlu-Demiralp E, Kardaş ER, Özgül S, Yağci T, Bilgin H, Şehirli O, et al. Betulinic acid protects against ischemia/reperfusion-induced renal damage and inhibits leukocyte apoptosis. *Phytother Res.* 2010;24(3):325-32.
110. Sawant-Pokam PA, Metcalf CS. Getting excited about chloride cotransporters: neuroinflammation and inhibition. *Epilepsy Curr.* 2024;24(3):194-6.
111. Raut Satish K, Singh K, Sanghvi S, Loyo-Celis V, Varghese L, Singh Ekam R, et al. Chloride ions in health and disease. *Biosci Rep.* 2024;44(5):BSR20240029:1-15.
112. Zündorf G, Reiser G. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(7):1275-88.
113. Bakaeva Z, Lizunova N, Tarzhanov I, Boyarkin D, Petrichuk S, Pinelis V, et al. Lipopolysaccharide from *E. coli* increases glutamate-induced disturbances of calcium homeostasis, the functional state of mitochondria, and the death of cultured cortical neurons. *Front Mol Neurosci.* 2022;14:811171:1-17.
114. Chou KJ, Fang HC, Chung HM, Cheng JS, Lee KC, Tseng LL, et al. Effect of betulinic acid on intracellular-free Ca^{2+} levels in madin darby canine kidney cells. *Eur J Pharmacol.* 2000;408(2):99-106.
115. Fiorentini D, Cappadone C, Farruggia G, Prata C. Magnesium: biochemistry, nutrition, detection, and social impact of diseases linked to its deficiency. *Nutrients.* 2021;13(4):1136-43.
116. Sidorova Y, Domanskyi A. Detecting oxidative stress biomarkers in neurodegenerative disease models and patients. *Methods Protoc.* 2020;3(4):66.
117. Cioffi F, Adam RHI, Bansal R, Broersen K. A review of oxidative stress products and related genes in early alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2021;83(3):977-1001.
118. Ahmad S, Choe K, Badshah H, Ahmad R, Ali W, Rehman IU, et al. Physcion mitigates LPS-induced neuroinflammation, oxidative stress, and memory impairments via TLR-4/NF- κ B signaling in adult mice. *Pharma.* 2024;17(9):1199-212.

119. Ling T, Boyd L, Rivas F. Triterpenoids as reactive oxygen species modulators of cell fate. *Chem Res Toxicol*. 2022;35(4):569-84.
120. Aoyama K. Glutathione in the brain. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):5010.
121. Brandes MS, Gray NE. NRF2 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *ASN neuro*. 2020;12:1759091419899782.
122. Bhaumik A, Bhattacharjee A, Prasad SB. Biochemical and mitochondrial membrane potential changes relating to betulinic acid-mediated anticancer activity in murine ascites Dalton's lymphoma. *Phytomed Plus*. 2022;2(1):100211.
123. Islam MN, Rauf A, Fahad FI, Emran TB, Mitra S, Olatunde A, et al. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(26):7282-300.
124. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and oxidative stress: a general overview of mechanisms and implications in human disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(12):2345-55.
125. Simpson DS, Oliver PL. ROS generation in microglia: understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(8):743-63.
126. Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(1):26-34.
127. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011;351(1):41-58.
128. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, et al. Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells*. 2024;13(22):1838.
129. Sharifi AM, Hoda FE, Noor AM. Studying the effect of LPS on cytotoxicity and apoptosis in PC12 neuronal cells: role of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein expression. *Toxicol Mech Methods*. 2010;20(6):316-20.
130. Seo J, Jung J, Jang DS, Kim J, Kim JH. Induction of cell death by betulinic acid through induction of apoptosis and inhibition of autophagic flux in microglia BV-2 cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2017;25(6):618-24.

131. Fang H, Liu A, Chen X, Cheng W, Dirsch O, Dahmen U. The severity of LPS induced inflammatory injury is negatively associated with the functional liver mass after LPS injection in rat model. *J Inflamm (Lond)*. 2018;15:21-33.
132. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
133. Gao Y, Wang D, Zheng Y, Sun H. Betulinic acid and apoptosis-involved pathways: unveiling its bidirectional regulatory role. *Eur J Pharmacol*. 2025;1008:178361:1-19.
134. Vitale I, Pietrocola F, Guilbaud E, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Apoptotic cell death in disease—current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ*. 2023;30(5):1097-154.
135. Rzeski W, Stepulak A, Szymański M, Sifringer M, Kaczor J, Wejksza K, et al. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006;374(1):11-20.
136. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J*. 1998;17(1):37-49.
137. Li Y, He K, Huang Y, Zheng D, Gao C, Cui L, Jin YH. Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. *Mol Carcinog*. 2010;49(7):630-40.
138. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):621-32.
139. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a008656.
140. Schmidt-Kastner R, Truettner J, Zhao W, Belayev L, Krieger C, Busto R, Ginsberg MD. Differential changes of bax, caspase-3 and p21 mRNA expression after transient focal brain ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;79(1-2):88-101.

141. Green DR, Llamhi F. Cell death signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2015;7(12):a006080.
142. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. Cancer cell. 2002;2(3):183-92.
143. Lebeaupin C, Blanc M, Vallée D, Keller H, Bailly-Maitre B. BAX inhibitor-1: between stress and survival. The FEBS journal. 2020;287(9):1722-36.
144. Kang J-B, Park D-J, Shah M-A, Kim M-O, Koh P-O. Lipopolysaccharide induces neuroglia activation and NF- κ B activation in cerebral cortex of adult mice. Lab Anim Res. 2019;35(1):19-27.
145. Gao W, Guo L, Yang Y, Wang Y, Xia S, Gong H, et al. Dissecting the crosstalk between Nrf2 and NF- κ B response pathways in drug-induced toxicity. Front Cell Dev Biol. 2022;9:809952.
146. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, Uspenska K, et al. Molecular mechanisms regulating LPS-induced inflammation in the brain. Front Mol Neurosci. 2016;9:19:1-14.
147. Guo Y, Zhu H, Weng M, Wang C, Sun L. Chemopreventive effect of Betulinic acid via mTOR-Caspases/Bcl2/Bax apoptotic signaling in pancreatic cancer. BMC Complement Med Ther. 2020;20(1):178.
148. Ma X, Lieberman J. Poking holes in the blood-brain barrier. Immunity. 2024;57(6):1192-4.
149. Erickson MA, Shulyatnikova T, Banks WA, Hayden MR. Ultrastructural remodeling of the blood–brain barrier and neurovascular unit by lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. Int J Mol Sci. 2023;24(2):1640.
150. Zeng J, Zhào H, Liu Z, Zhang W, Huang Y. Lipopolysaccharide induces subacute cerebral microhemorrhages with involvement of nitric oxide synthase in rats. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018;27(7):1905-13.
151. Farzan M, Farzan M, Shahrani M, Navabi SP, Vardanjani HR, Amini-Khoei H, Shabani S. Neuroprotective properties of betulin, betulinic acid, and ursolic acid as triterpenoids derivatives: a comprehensive review of mechanistic studies. Nutr Neurosci. 2024;27(3):223-40.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Kararı



3. Cyt c

1 cttgggctag agagcgggac gtctccctaa gagtctgatc cttgttggtg ttgaccagcc
61 cggacceaat taaaatggg tgatgttgaa aaaggcaaga agattttgt taaaaagtgt
121 gccagtgcc acactgtgga aaaaggaggc aagcataaga ctggaccaaa ctcctatggt
 >>>>>>>>>>
181 ctgtttgggc ggaagcacagg ccaggctgct ggattctctt acacagatgc caacaagaac
241 aaaggtatca cttggggaga ggataacctg atggagtatt tggaaaatcc caaaaagtac
301 atccccggaa caaaaatgat ctctcgctgga attaagaaga agggagaaag ggcagaccta
 <<<<<<<<<<<<<<<<

4. CASP3

1 gatgcagtgt tgggtttggt gggatcaaaag cttagtgtcc tgagggtgcgg agcttggaac
61 gcgaagaaaa gtgaccatgg acaacaacga aacctcctg gattcaaaat ccattaataa
121 ttttgaacaa aagactatcc atggaagcaa gtcgatggac tctggaatat atctggacag
181 cagttacaaa atggattacc ctgaaatggg cttgtgtata ataattaata ataagaactt
241 ccataaaaagc actggaatgt cagctcgcaa tggtagcgat gtcgatgcag ctaacctcag
301 agagacattc atggccctga aatacgaagt caggaataaa aatgacctta ctctggaaga
361 aattatggaa ttgatggata gtgtttctaa ggaagatcac agcaaaaagga gcagttttgt
421 gtgtgtgatt ctaagtcatg gagatgaagg agtaattttt ggaacgaacg gacctgtgga
481 cctgaaaaaa ctaactagt ttttcagagg cgactactgc cggagtctga ctgaaaagcc
541 gaaactcttc atcattcagg cctgccgagg tacagagctg gactgcggta ttgagacaga
601 cagtggaaact gacgatgata tggcatgcc aagaatacca gtggaggccg acttctctga
661 tgcttactct accgcaccg gttactattc ctggagaaat tcaagggacg ggtcatggtt
721 catccagtca ctttgcgcca tgctgaaact gtacgcgcac aagctggaat tcatgcacat

5. CASP9

75

