T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN SIÇAN NÖROİNFLAMASYON MODELİNDE HİDROJEN SÜLFÜR TEDAVİSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. AYŞE KÜBRA KİBAR GÜZİN

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. GÖKÇE SEVİM ÖZTÜRK FİNCAN
DOÇ. DR. ERGİN DİLEKÖZ

EYLÜL 2024
ANKARA

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENEN SIÇAN NÖROİNFLAMASYON MODELİNDE HİDROJEN SÜLFÜR TEDAVİSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. AYŞE KÜBRA KİBAR GÜZİN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. GÖKÇE SEVİM ÖZTÜRK FİNCAN

DOÇ. DR. ERGİN DİLEKÖZ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-2023-8592 proje numarası ile desteklenmiştir.

EYLÜL 2024

ANKARA

TEŞEKKÜR

Her daim bana örnek olan etik ve deontolojik ilkeleri, derin bilgi birikimi, akademik yaklaşımı ve nezaketi ile önce öğrencisi sonra asistanı olmaktan gurur duyduğum, öğrenciliğimin, asistanlığımın ve tezimin her aşamasında bana destek olan saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN'a; Farklı bilimsel bakış açısını kendime örnek aldığım, tez sürecimde destek olan, hep nezaketiyle hatırlayacağım saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Ergin DİLEKÖZ'e; asistanlığım süresince bir tıbbi farmakolog olarak yetişmemde büyük katkıları olan saygıdeğer Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi tüm hocalarıma;

Bu tez çalışmasını TTU-2023-8592 nolu proje kapsamında destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne; tezimdeki verilerin analizinde sağladıkları imkanlardan ötürü Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne;

Tez sürecime destek olan, bilgisini ve tekniğini cömertçe paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a; tez çalışmalarımda bana tekniğini öğreterek destek olan değerli Dr. Öğr. Üyesi Duygu Deniz USTA SALİMİ'ye;

Asistanlık sürecimin başından sonuna kadar tüm inişlerde ve çıkışlarda bu yolu beraber yürüdüğümüz sevgili Uzm. Dr. Celil İlker AŞKIN'a; tez çalışmalarım süresince bana özenle destek olan sevgili Dr. Tilbenur AKYEL'e; hep mutlulukla hatırlayacağım asistanlık yıllarımda beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarıma;

Zaman zaman klavyemin üzerinde uyuyarak bana olan sessiz destekleri ve sadece sevimli oldukları için bir tanecik kedilerim Kestane ve Zeytin'e; sevgisi, özverisi, nezaketi ve anlayışı ile her zaman yanımda olan, varlığı sayesinde zorlu tez sürecini mutlulukla geçirdiğim kıymetli eşim Bilgehan GÜZİN'e; bu tez çalışmasını ithaf ettiğim, beni yetiştiren, iyi bir hekim olmanın yanında iyi bir insan olma yolunda bana örnek olan, bu günlere gelmemde benden emeklerini, özverilerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen en kıymetlim canım aileme;

Teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Dr. Ayşe Kübra KİBAR GÜZİN
ANKARA, 2024

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **II**
ŞEKİL VE GRAFİK DİZİNİ ..... **IV**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **V**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Nöroinflamasyon **3**
2.1.1. Tanım 3
2.1.2. Nöroinflamasyon Aracılı Nörodejenerasyon 3
2.1.3. Nörodejenerasyonun Endotoksin Hipotezi 5
2.1.4. Nörodejeneratif Hastalıkların Etiyolojisi, Epidemiyolojisi 6
2.1.5. Alzheimer Hastalığı Benzeri Semptomlar Oluşturmak için Kullanılan 8
Deneysel Nöroinflamasyon Modelleri 8
2.1.6. Anksiyete Bozukluğu ve Araştırılmasında Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri 9
2.1.7. Hafıza ve Anksiyetenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Davranış Testleri 11
2.2. Lipopolisakkarit **13**
2.2.1. Lipopolisakkarit ile Nöroinflamasyon İndüksiyonu 14
2.3. Hidrojen Sülfür **14**
2.3.1. Santral Sinir Sisteminde Hidrojen Sülfür'ün Koruyucu Etkisi 15
2.3.2. Hidrojen Sülfür'ün Nöroinflamasyon Üzerine Etkileri 17
2.3.3. Hidrojen Sülfür'ün Öğrenme ve Hafıza ile İlişkisi 18
3. GEREÇ VE YÖNTEM **20**
3.1. Deney Hayvanları **20**
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler **21**
3.3. Deney Grupları **21**
3.4. Deney Protokolü **23**
3.4.1. Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Nöroinflamasyon Modeli ve H_2S Uygulaması 23
3.4.2. Davranış Testleri 24
3.4.2.1. Morris Su Labirenti Testi 24
3.4.2.1.1. Kaçış Gecikmesi Testi 25
3.4.2.1.2. Probe Testi 26
3.4.2.2. Açık Alan Testi 27

3.4.2.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi 27
3.4.2.4. Video Kayıt Analizleri 28
3.4.3. Doku Analizi 28
3.4.3.1. Western Blot Yöntemi 28
3.4.3.1.2. Sıçan Hipokampüs Doku Örneklerinden Protein Ekstraksiyonu 30
3.4.3.1.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid (SDS-PAGE) Jelin Hazırlanması 31
3.4.3.1.4. Proteinlerin SDS-PAGE'e Yüklenme Öncesi Hazırlığı 31
3.4.3.1.5. Proteinlerin SDS-PAGE'e Yüklenmesi ve Elektroforez 31
3.4.3.1.6. Protein Örneklerinin Poliviniliden Florür (PVDF) Membrana Aktarılması . 32
3.4.3.1.7. Bloklama 32
3.4.3.1.8. Membran Üzerindeki Proteinlerin İmmunolojik Gösterilmesi 32
3.4.3.1.9. Görüntüleme 33
3.5. İstatistiksel Analiz 34
4. BULGULAR 35
4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değişimi Bulguları 35
4.2. Morris Su Labirenti Testi Bulguları 36
4.3. Açık Alan Testi Bulguları 40
4.4. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları 51
4.5. Western Blot Analizi Bulguları 58
5. TARTIŞMA 60
6. SONUÇLAR 73
7. KAYNAKLAR 74
8. ÖZET 89
9. SUMMARY 91

ŞEKİL VE GRAFİK DİZİNİ

Tablo 1. Deney Grupları 22
Tablo 2. Deney Gruplarına Ait Hayvanların 0., 7., 10. ve 14. Gün Ağırlık Ölçümleri 35

Şekil 1. Deney Protokolü 23
Şekil 2. Açık Alan Testi 2.Hafta Grup Ortalamalarına Göre Çizilmiş Sıcaklık Haritaları. 50
Şekil 3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi 2. Hafta Grup Ortalamalarına Göre Çizilmiş Sıcaklık Haritaları 57
Şekil 4. Hipokampüs dokularında CBS, CSE, IL-6, IL-17, IL-23 ve TNF-α Protein İfadelenme Düzeylerinin Temsili Western Blot Görüntüleri 59

Grafik 1. Morris Su Labirenti Testi 1. Hafta Alıştırma Günlerinde Platformu Bulma Süresinin Değişimi 36
Grafik 2. Morris Su Labirenti Testi 2. Hafta Alıştırma Günlerinde Platformu Bulma Süresinin Değişimi 37
Grafik 3. Morris Su Labirenti Testi 2. Hafta Probe Testi Hedef Kadranda Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi 38
Grafik 4. Morris Su Labirenti Testi 2. Hafta Probe Testi Hedef Kadranda Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi 39
Grafik 5. Açık Alan Testinde Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi 41
Grafik 6. Açık Alan Testinde Ortalama Hızın Gruplara Göre Değişimi 43
Grafik 7. Açık Alan Testinde Toplam Hareketli Zamanın Gruplara Göre Değişimi 45
Grafik 8. Açık Alan Testinde Merkez Kadranda Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi 47
Grafik 9. Açık Alan Testinde Merkez Kadranda Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi 49
Grafik 10. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Açık Kolda Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi 52
Grafik 11. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Açık Kolda Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi 54
Grafik 12. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Aşırı Uç Kısma Giriş Sayısının Gruplara Göre Değişimi 55
Grafik 13. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Aşırı Uçta Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi 56
Grafik 14. Hipokampüs Dokularındaki Göreceli Protein İfade Düzeyleri 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
3-MST	3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz
ACTB	Beta-aktin
AMP	Adenozin 5′-monofosfat
AMPK	Aktive edilmiş protein kinaz
APS	Amonyum Persülfat
Aβ	Amiloid beta
BSA	Bovine Serum Albumin
CBS	Sistatyonin-β-sentaz
CO	Karbonmonoksit
CSE	Sistatyonin-γ-liyaz
cm	Santimetre
g	Gram
GSH	Glutatyon
H_2S	Hidrojen Sülfür
IL	İnterlökin
IRAK-M	IL-1 reseptör ilişkili kinaz-M
i.c.v.	İntraserebroventriküler
i.p.	İntraperitoneal
kg	Kilogram
K_{ATP}	ATP-bağımlı K^+ Kanalı

LBP	LPS bağlayıcı protein
LPS	Lipopolisakkarit
m	metre
mg	miligram
MAPK	Mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar
MD2	Miyeloid farklılaşma faktörü 2
mitoKATP	Mitokondriyal ATP'ye bağımlı Potasyum
Kanalı	
MyD88	Miyeloid farklılaşma faktörü 88
NO	Nitrik oksit
NOD	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı
içeren protein	
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
PolyI:C	Poliriboinosinik-poliribositidilik asit
PVDF	Poliviniliden Florür
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNA	Ribonükleik asit
NaHS	Sodium Hydrosulfide Hydrate
s	Saniye
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid
SEM	Standart Error of the Mean
TBS-T	Tris Buffer Saline-Tween 20

TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-α
TRAF6	TNF-reseptör ilişkili faktör-6

1. GİRİŞ

Nöroinflamasyon, beyin ve omurilik dahil olmak üzere merkezi sinir sistemindeki inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır (1). Başlangıçta doku onarımı sağlamak için ortaya çıkan nöroinflamasyon, kronikleştiğinde proinflamatuvar sitokinlerin mikroglia aracılı sürekli salıverilmesiyle nöronlara zarar vermeye başlamaktadır (2). Nörodejeneratif hastalıkların başlatıcı nedenleri ve semptomları farklıdır. Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ortak olan ve bu hastalıklara ilerleyici özellik katan mekanizmanın nöroinflamasyon olduğu düşünülmektedir. İnflamasyon aracılı nörodejenerasyona neden olan hücreler içerisinde en dikkat çekeni ve önemlisi mikrogliadır (3). Beyindeki değişikliklere yanıt veren mikroglia nöroprotektif durumda; inflamasyonu azaltmak, nöronları korumak ve nöronal onarımı sağlamak için anti-inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesini sağlar. Nörotoksik durumlarda ise IL-1β, TNF-α, iNOS ve kemokinler gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine aracılık ederek nöroinflamasyonu güçlendirir, nöronal ölümü indükler, nörodejenerasyona neden olur ve hastalığın ilerlemesini şiddetlendirir (4, 5). IL-6, IL-23, IL-1β, IFNγ ve TNF nöroinflamasyon sürecinde yer alan başlıca sitokinlerdir (6). Nöroinflamasyonda rolü olan interlökinlerden IL-1β, IL-6, IL-17, IL-23 ve IL-36 pro-inflamatuvar; IL-2, IL-4, IL-10, IL-27 ve IL-35 anti-inflamatuvar özelliğe sahiptir (7).

Lipopolisakkarit gram-negatif bakterilerin dış zarının bir bileşenidir. Lipid A, çekirdek şekerler ve O-antijenden oluşur. Lipid A, Lipopolisakkarit'e nörotoksin özelliğini veren yapısıdır (8). Alzheimer hastalığı gibi nöroinflamasyonla ilerleyen hastalıkları ve anksiyete benzeri semptomları araştırmak için nöroinflamasyon modeli oluşturmak amacıyla yaygın olarak tercih edilen, hem periferden (intraperitoneal) hem santralden (intraserebroventriküler) uygulanabilen bir moleküldür (8-10). Lipopolisakkarit kaynaklı nöroinflamasyon, nöroinflamasyonu incelemek için standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir (11). Lipopolisakkarit, TLR4 aracılığı ile nöroinflamasyona neden olur (12). Bu model literatürde "TLR ligand ile indüklenen inflamasyon modelleri" olarak da bahsedilen modeller içerisinden sıklıkla tercih edilenidir (1). TLR ve gama interferon sinyal yolu; IL-1, IL-6, IL-1β, TNF-α ve kemokinler gibi çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi ile karakterize olan inflamatuvar mikroglia alt tipinin üretimini indükler (13).

Hidrojen Sülfür memeli vücut sistemleri üzerindeki önemli fizyolojik etkileri birçok çalışma ile gösterilmiş, endojen gaz modülatör olarak kabul edilen bir moleküldür. Hücre sinyalizasyonunda rol oynar ve nöroprotektif molekül olarak literatürde geçmektedir. Hidrojen Sülfür'ün anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri, nöroprotektif etkisinin oluşmasına katkı sağlamaktadır (14, 15). Hidrojen Sülfür'ün TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-23 ve NO dahil pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesini azaltabileceği ayrıca bu mekanizma ile nöroinflamatuvar süreçlerin başlamasını ve ilerlemesini önleyerek bilişsel işlevde iyileşme sağlayabileceği öne sürülmüştür (16).

Bu bilgiler ışığında Hidrojen Sülfür tedavisinin Lipopolisakkarit ile indüklenmiş nöroinflamasyon modelinde tedavi edici etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroinflamasyon

2.1.1. Tanım

İnflamasyon hücreler arasındaki karmaşık etkileşimler dizisidir. Bir onarım sürecini ifade eder ve travmatik, enfeksiyöz, post-iskemik, toksik veya otoimmün hasara yanıt olarak herhangi bir dokuda ortaya çıkabilir. Normal bir inflamatuvar süreç, onarım sürecinin tamamlanmasının ardından dokuda iyileşmeyle sonuçlanır. Ancak hedeflenen yıkım ve onarım uygun şekilde aşamalandırılamaz ise inflamasyon kalıcı doku hasarına yol açabilir (17, 18). Beyin, nöronal bağlantı ve nöronal sinyal iletimi aracılığı ile insan vücudundaki diğer tüm organların işlevlerini kontrol eden önemli bir organdır. Santral sinir sistemindeki nöronal bağlantılar ve işlevleri nöroinflamatuvar hastalıklarda bozulur (19). Nöroinflamasyon, beyin ve omurilik dahil olmak üzere merkezi sinir sistemindeki inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde çok önemli rolü olan ortak mekanizma nöroinflamasyondur (1). Beyindeki bağışıklık hücrelerinin özellikle de mikrogliaların aktivasyonunu içerir (2).

2.1.2. Nöroinflamasyon Aracılı Nörodejenerasyon

İnflamasyon eskiden sadece nöronal hasara pasif bir yanıt olarak kabul edilmekteydi. Günümüzde ise inflamasyonun aktif olarak nöronal ölüme ve hasara

neden olabileceği literatürde artan bilgilerle birlikte kabul görmektedir. Farklı nörodejeneratif hastalıkların tetikleyicileri farklıdır ancak nörodejeneratif hastalıklara ilerleyici özellik katan temel mekanizmanın inflamasyon olduğu düşünülmektedir (3).

Enfeksiyonlar, yaralanmalar veya travma gibi akut olaylara karşı doğal bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkan inflamasyon, başlangıçta hasarı kontrol altına almaya ve iyileşme sürecini başlatmaya yardımcı olmaktadır (20, 21). Kontrolsüz akut inflamasyon kronikleşerek çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklara neden olabilmektedir (22). Kronik nöroinflamasyonun, nöronal hasar ve dejenerasyon döngüsünün devam etmesine neden olarak, nöronlar için zararlı olabileceği literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Birçok nörodejeneratif hastalıkta ilk inflamatuvar yanıt, etkilenen beyin dokusunu korur ve onarır. Ancak inflamatuvar yanıt devam ederse ya da inflamasyon azalmazsa, kronik inflamatuvar durum ortaya çıkar ve bu kronik inflamasyon nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesine neden olan kritik noktadır. Kronik inflamasyon, mikroglianın uzun süre devam eden aktivasyonu ile karakterizedir; inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesini sürdürerek mitokondriyal disfonksiyonda artışa, reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa ve oksidatif stresin artmasına neden olur. Bu duruma ‘‘inflamatuvar döngü’’ adı verilir (23, 24). Alzheimer hastalığı, Parkinson Hastalığı, Huntington hastalığı gibi hastalıklarda görülen; nöronlarda ilerleyici bozulmaya neden olarak nöronal hasarı kötüleştiren inflamatuvar döngüdür (25).

İnflamasyon aracılı nörodejenerasyona neden olan hücreler içerisinde en dikkat çekeni ve önemlisi mikroglialardır (3). Beyindeki değişikliklere yanıt veren mikroglia nöroprotektif durumda; inflamasyonu azaltmak, nöronları korumak ve nöronal onarımı sağlamak için anti-inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesini sağlar. Nörotoksik durumlarda ise IL-1β, TNF-α, iNOS ve kemokinler gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine aracılık ederek nöroinflamasyonu güçlendirir, nöronal ölümü indükler, nörodejenerasyona neden olur ve hastalığın ilerlemesini şiddetlendirir (4, 5). IL-6, IL-23, IL-1β, IFNγ ve TNF nöroinflamasyon sürecinde yer alan başlıca sitokinlerdir (6). Nöroinflamasyonda rolü olan interlökinlerden IL-1β, IL-6, IL-17, IL-23 ve IL-36 pro-inflamatuvar; IL-2, IL-4, IL-10, IL-27 ve IL-35 anti-inflamatuvar özelliğe sahiptir (7). IL-6, JAK-STAT sinyal yolağı aracılığı ile nöroinflamasyonu artırır ve kan-beyin bariyerini bozar (26). IL-17; nöroinflamasyonu indükler, pro-inflamatuvar sinyal yollarını aktive ederek ve nötrofillerin toplanmasını sağlayarak doku hasarına neden olur (27). IL-23; nöroinflamasyonu indükler, Th17 hücrelerinin farklılaşmasını ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini sağlayarak doku hasarına neden olur (28).

Nöroinflamasyon için yüksek sitokin salıverilmesi, mikroglial hücre aktivasyonu, periferik bağışıklık hücrelerinin göçü ve lokalize doku hasarının tanımlayıcı olduğu varsayılmaktadır (29).

2.1.3. Nörodejenerasyonun Endotoksin Hipotezi

Endotoksinler, memeliler için toksik olan bakteri bileşenleridir. Lipopolisakkarit (LPS) ana endotoksinlerden biridir ve “endotoksin” terimi

genellikle LPS ile eşanlamlı olarak kullanılmaktadır (30). Endotoksinin nörodejenerasyon gelişimine zemin hazırlayan genetik olmayan tetikleyicilerden biri olduğuna dair literatürde pek çok kanıt vardır. Endotoksin insanların dolaşımında mevcuttur fakat kandaki seviyeleri kişiden kişiye çok değişkendir. Dolaşımdaki artmış endotoksin nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir ve nörodejenerasyon oluşumuna neden olduğu veya katkıda bulunduğu öne sürülmektedir. Ancak nörodejeneratif hastalıkların artmış endotoksinden seviyesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle endotoksin seviyeleri veya endotoksin etkileri azaltılarak nörodejeneratif hastalıkların gelişiminin azaltılıp azaltılamadığının belirlenmesi, potansiyel tedavi hedeflerinin araştırılması için önemlidir (31). Endotoksinin kandaki seviyesinin artışına neden olan kaynaklar incelediğinde ilk olarak aktif bakteriyel enfeksiyonlar dikkat çekmektedir. LPS; bağırsak, diş etleri, akciğerler ve idrar yolunun gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlarında yüksek kan endotoksin seviyelerinin kaynağı olabilmektedir (32-34). Aktif bakteriyel enfeksiyon yokluğunda ise endotoksin; bağırsak, diş etleri ve akciğerlerin doğal florasında bulunan mikroorganizmalar aracılığıyla kandaki seviyesini artırabilmektedir. Ana kaynak ise bağırsak geçirgenliğidir (35, 36).

2.1.4. Nörodejeneratif Hastalıkların Etiyolojisi, Epidemiyolojisi

Nörodejeneratif bozukluk, nöronların kademeli olarak ilerleyici bozulmasıyla karakterize bir durumdur (37). Nöron ölümünün kademeli olarak artması ve zaman içinde hastalık şiddetinin artması, nörodejeneratif hastalıkların ortak noktasıdır (3). Nörodejeneratif hastalıklar görülme sıklığı giderek artan;

demans, motor ve diğer fonksiyonel bozukluklara neden olarak hem hastaların hem de hasta yakınlarının yaşam kalitesini maddi ve manevi olarak zorlaştıran küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir (37). Kronik ve ilerleyici nörodejeneratif bozukluklar; motor, duyu veya bilişsel sistemlerdeki seçici nöron kaybıyla karakterizedir. Belirgin özelliği nörodejenerasyon olan hastalıklar toplu olarak 'Nörodejeneratif Hastalıklar' olarak adlandırılır (38).

Nörodejeneratif hastalıklar son otuz yılda giderek yaygın hale gelmiştir. Dünya nüfusunun yaklaşık %15'i fiziksel ve bilişsel sakatlığa neden olan nörodejeneratif hastalıkların bir çeşidinden etkilenmektedir. En yaygın nörodejeneratif hastalıklar arasında Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz ve Huntington hastalığı bulunmaktadır (18, 39).

Nörodejeneratif hastalıkların farklı ortaya çıkma yolları, gelişme yolları, her birinin kendine özgü semptomları ve ilerleyişi vardır, ancak patofizyolojilerinde kilit rol oynayan nöroinflamasyon zemini hepsinde ortaktır (40). Bazıları bilişsel bozulmaya yol açarken bazıları hareketleri, konuşmayı ve nefes almayı etkiler. Bu hastalıkların bazılarında genlerle bağlantılı ailesel vakalar vardır, ancak çoğu vaka sporadiktir ve etiyolojik olarak bilinmemektedir (41).

Nörodejeneratif hastalıkların gelişimlerinin ana nedenleri arasında ilk olarak nöronlardaki yaşlanma, normal hücre ölümü süreçlerini sürdürme yeteneği kaybı ve yaşlanma ile ilişkili anormal proteinlerin kullanımı vardır; bu özelliğe sahip hastalıkların en karakteristik olanları Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığıdır. İkinci olarak çoğunlukla trinükleotid tekrarlarının genişlemesi (Huntington hastalığı ve spinoserebellar ataksi tip 1, 2, 3, 6, 7 ve 17) ile oluşan

mutasyonlar vardır. Üçüncü sebep olarak sinir sistemindeki inflamatuvar süreçler yer alır. Son olarak da olumsuz çevresel faktörlerin neden olduğu etkiler bu hastalıkların başlıca gelişim nedenleridir (41).

2.1.5. Alzheimer Hastalığı Benzeri Semptomlar Oluşturmak için Kullanılan Deneysel Nöroinflamasyon Modelleri

Alzheimer hastalığını araştırmak için kullanılan deneysel nöroinflamasyon modelleri arasında genetik olarak manipüle edilen ve edilmeyen nöroinflamasyon modelleri mevcuttur. Bu kısımda genetik olarak manipüle edilmeyen modellerden bahsedilecektir.

Periferik enfeksiyonların beyindeki inflamatuvar durumu etkilediği literatürde gösterilmiştir (42). Santral sinir sistemi mikroglia aktivasyonuyla sistemik inflamasyona tepki verir ve bunun nörodejeneratif süreç için potansiyel bir tetikleyici olduğu düşünülmektedir (43, 44). Periferik immün yanıt oluşturarak kronik nöroinflamasyon modeli oluşturmak için intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon yoluyla LPS ve Poliriboinosinik-poliribositidilik asit (polyI:C) uygulaması en sık tercih edilen yöntemlerdir. Poly I:C sentetik çift sarmallı ribonükleik asit (RNA)'tir ve uygulandığı hayvanda akut viral enfeksiyonlara benzer şekilde doğuştan gelen immün yanıtı indükler. Bu bağışıklık yanıtı santral sinir sisteminde mikroglianın TLR3 aracılı aktivasyonuna neden olur (45). Nöroinflamasyon modeli oluşturmak için tercih edilen en yaygın yöntem LPS ile oluşturulan modeldir (46). LPS, TLR4 aracılığı ile nöroinflamasyona neden olur (12). Bu modellerden literatürde "TLR ligand ile indüklenen inflamasyon modelleri" olarak da bahsedilmektedir (1). TLR ve gama interferon sinyal yolu; IL-1, IL-6,

IL-1β, TNF-α ve kemokinler gibi çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi ile karakterize olan inflamatuvar mikroglia alt tipinin üretimini indükler (13).

İntraserebroventriküler (i.c.v.) enjeksiyon uygulama yolu kullanılarak lokal nöroinflamasyon oluşturmak için tercih edilen yöntemler arasında okadaik asit enjeksiyonu, streptozotosin enjeksiyonu ve kolşisin enjeksiyonu vardır (47). Icv uygulama yolunun periferik uygulama yoluna kıyasla bazı dezavantajları vardır. Icv uygulama daha zor bir tekniktir, anestezi gerektirir ve anestezi esnasında, cerrahi sırasında ya da cerrahi sonrasında hayvan kayıpları yaşanabilmektedir.

LPS kaynaklı nöroinflamasyon, nöroinflamasyonu incelemek için standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir (11). Sıçanlarda, 7 günden fazla süren bir nöroinflamatuvar süreç kronik nöroinflamasyon olarak kabul edilmektedir (48, 49).

2.1.6. Anksiyete Bozukluğu ve Araştırılmasında Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri

Dünya nüfusunun %4.05'inde anksiyete bozukluğu olduğu literatürde bildirilmiştir. Anksiyete bozuklukları tüm psikiyatrik hastalıklar içerisinde en yaygın görülenlerden biri olarak yer almaktadır. Anksiyete bozukluğundan etkilenen kişi sayısı 1990'dan 2019'a kadar %55'ten fazla artmıştır (50, 51). Günümüzde anksiyetenin kesin patogenezi hala tam olarak belirlenememiştir. Literatürde anksiyetenin ortaya çıkışının nörotransmitter disfonksiyonu,

nöroendokrin disfonksiyon ve immün-inflamatuvar aktivasyon ile ilişkili olduğu üzerinde durulmaktadır (52).

Yeni ilaç tedavilerini araştırmak ve anksiyete patogenezini anlamak için yapılan araştırmalarda hayvan modellerinin yeri önemlidir. Deney hayvanlarında anksiyete benzeri semptom modelleri koşulsuz, koşullu, ilaçla oluşturulan ve genetik modeller olmak üzere dört ayrı sınıftan oluşmaktadır (52). Bu kısımda ilaçla oluşturulan anksiyete benzeri semptom modellerinden bahsedilmiştir. İlaç uygulanması hayvanlarda nörotransmitter düzeylerini değiştirerek fizyolojik mekanizmayı bozar ve anksiyeteye neden olur. İlaçla oluşturulan yaygın modeller arasında kafein ve LPS ile oluşturulan deneysel anksiyete benzeri semptom modelleri yer almaktadır.

Kafein kaynaklı anksiyete benzeri semptom modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada, L-tipi kalsiyum kanal antagonisti olan lasidipin anksiyolitik özellik göstermiştir. L-tipi kalsiyum kanalı üzerinden etki gösterebilecek anksiyete önleyici yeni ajanların araştırılmasında, kafein ile oluşturulan anksiyete benzeri semptom modeli tercih edilebilir (53).

Nöroinflamasyon ve anksiyete bozuklukları arasında bir ilişki olduğu literatürdeki çalışmalarda öne sürülmektedir. LPS uygulanması, proinflamatuvar sitokinlerin artan üretimi nedeniyle sistemik inflamasyonu indükleyerek hayvanlarda anksiyete ve depresyon benzeri davranışlara yol açabilmektedir. Anksiyetenin nörobiyolojik mekanizmalarını araştırmak için i.p. LPS ile oluşturulan anksiyete benzeri semptom modeli yaygın olarak tercih edilmektedir (9, 54-57).

2.1.7. Hafıza ve Anksiyetenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Davranış Testleri

Hayvan araştırmalarında davranışsal bir test, davranışsal bir yapı ile ilgili olarak belirli bir türün tipik davranışının değerlendirilmesini içerir (58). Deneysel bir hayvan modeli, organizmada belirli davranışları veya semptomları harekete geçirmek için biyolojik veya çevresel faktörlerin manipüle edilmesiyle oluşturulur. Davranış testleri ise modelin çıktılarını gözlemlemek için tasarlanmıştır (59). Bir hayvan modelinde insan fizyolojisindeki bozuklukların tüm yönlerini yakalamak mümkün olmadığı için semptomlar için oluşturulan modeller hastalıkların yalnızca belirli yönlerini yansıtmaktadır. Davranış deneylerinden elde edilen hayvan verilerini değerlendirirken hayvanlarda birçok fizyolojik ve biyokimyasal sürecin insanlara göre farklı olduğunu hatırlamanın öneminden literatürde bahsedilmektedir. Bu nedenle hayvan verilerini değerlendirirken, hayvan modelindeki etiyoloji ve patogenezin insanlardaki hastalığa ne kadar yakın olduğunu ve semptomların ölçümlerinin insanlardakilere benzeyecek kadar güvenilir olup olmadığını bilmek gerekmektedir. Bu nokta özellikle ölçüm için nörodavranışsal araçlar kullanıldığında önemlidir (60).

Hipokampüs uzamsal bellekle ilgili olan beyin kısmıdır (61, 62). Morris su labirenti testi özellikle uzamsal belleği test etmek için kemirgenlerde en yaygın kullanılan uzamsal öğrenme ve hafıza testlerinden biridir (63). Morris su labirenti testi uzamsal hafıza ve yer öğrenimini değerlendirmek için Richard Morris tarafından tasarlanmış bir yöntemdir (64). Richard Morris 1984'te temel prosedürleri tanımlamıştır (65). Morris su labirenti uzamsal hafızayı ve öğrenmeyi incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve davranışsal nörobilimin altın

standartlarından biri olarak kabul edilmektedir (66). Morris su labirenti aslında bir labirent değildir, su ile doldurulmuş açık dairesel bir havuzdur. Deney hayvanının, su yüzeyinin altında sabit bir yere yerleştirilmiş gizli bir kaçış platformunu bulmak için araması gerektiği anlamında bir "labirent" olarak isim almıştır. Toksik olmayan bir gıda boyası suya eklenerek havuzun suyu opaklaştırılır ve kaçış platformu kamufle edilir (67). Opak suda oldukları için hayvanlar kaçış platformunu göremezler ve platforma çıkış yolunu bulmak için labirentin etrafına yerleştirilmiş olan ipuçlarını takip etmeleri gerekir (66). Gıda boyası olarak deney hayvanının kürk rengine zıt bir renk seçilerek suyun rengi ile deney hayvanının rengi arasında kontrast yaratılır. Bu kontrast sayesinde deney esnasında ve analizlerde deney hayvanı gözlem için belirgin hale getirilmiş olur.

Açık alan testi ilk olarak 1934'te Hall tarafından geliştirilmiştir (68). Açık alan testi, anksiyete ile ilişkili davranışların ve lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (69-71). Test sırasında hayvanın açık alanda bırakılma süresi değişmekle birlikte genellikle 5 dakikadır (71-73). Literatürde genellikle deney hayvanı aparatın ortasına yerleştirilerek deney başlatılmıştır (71, 73). Açık alan düzeneğindeki deney hayvanının periferde mi yoksa merkezde mi daha fazla vakit geçirdiği incelenir. Açık ve geniş ortam kemirgenlerde anksiyeteye neden olduğu için kapalı ve dar ortamlara girme yönünde istekleri vardır. Kemirgenlerde artan anksiyetenin ölçüsü azalan lokomotor aktivite ve periferde kalma tercihidir (73). Merkez kadranda harcanan zamandaki artış, periferik kadranda harcanan zamandaki artıştan fazlaysa, uygulanan maddenin veya ilacın anksiyeteyi azalttığı kabul edilir (71). Periferik

kadranda geçirilen süre ve periferik kadranda kat edilen mesafe anksiyete göstergesi olarak değerlendirilir. Toplam kat edilen mesafe, toplam hareketli zaman ve ortalama hız ise lokomotor aktivite göstergesi olarak değerlendirilmektedir (69).

Yükseltilmiş artı labirent testi kemirgenlerde anksiyete bozukluğu ile ilgili davranışı değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan davranış testlerinden biridir (71, 74). Kemirgenler normalde karanlık yerlerde yaşamayı ve aydınlık yerlerden kaçınmayı tercih ederler. Bu davranışlarından yola çıkarak açık ve kapalı kollarda geçirilen süre, maddelerin ve ilaçların anksiyete benzeri davranış üzerine olan etkisini değerlendirmek için kullanılmaktadır (71). Kapalı kollara kıyasla açık kollarda daha az zaman harcanması anksiyete benzeri davranış olarak değerlendirilmektedir (75).

2.2. Lipopolisakkarit

LPS gram-negatif bakterilerin dış zarının bir bileşenidir. Lipid A, çekirdek şekerler ve O-antijenden oluşur. Lipid A, LPS'ye nörotoksin özelliğini veren yapısıdır (8). Güçlü bir endotoksindir ve memeli enzimlerine karşı oldukça dirençlidir. Bu sayede kalıcı bir inflamatuvar yanıta neden olur ve sonucunda pro-inflamatuvar sitokinler üretilir (10).

LPS deney hayvanında uygulandığında "hastalık davranışları (sickness behaviors)" olarak adlandırılan çeşitli spesifik olmayan davranışların oluşmasına neden olur. Bu davranışlar aktivitede azalma, keşifte azalma, sosyal etkileşimde azalma, ateş, aşırı uyku hali, yiyecek ve içecek tüketiminde azalma olarak kendini belli eder (76).

LPS literatürde TLR4 agonisti olarak geçmektedir (77). LPS, TLR4 için potansiyel ligand olarak bilinmektedir ve nörotoksisiteye ardından da nörodejenerasyona yol açabilmektedir (78, 79).

2.2.1. Lipopolisakkarit ile Nöroinflamasyon İndüksiyonu

LPS santral sinir sisiteminde TLR4'e ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein (NOD) benzeri reseptörlere bağlanır. LPS'nin TLR4'e bağlanması LPS bağlayıcı protein (LBP) tarafından kolaylaştırılır. LBP, LPS'yi bakteriden çıkarır ve bir kompleks oluşturmak için CD14'e taşır. CD14-LPS kompleksi, miyeloid farklılaşma faktörü 2 (MD2)-TLR4 kompleksine bağlanır ve oluşan üçlü TLR4–MD2–LPS kompleksi birçok pro-inflamatuvar sitokin ve kemokin üretimi için kritik transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B (NF-κB) aktivasyonunu sağlar. Bu kompleksin oluşumu ve sinyal kaskadının ilerleyişi Miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88)-bağımlı yolak aracılığıyla olur. Ayrıca LPS, MyD88'den bağımsız NF-κB aracılı interferon-1 salıverilmesine de neden olur. Aktifleşen sinyal yolakları sinaptik kayıp ve nöroinflamasyona, en nihayetinde nörodejenerasyona neden olan pro-inflamatuvar sitokinlerin, serbest radikallerin ve kemokinlerin üretiminin artmasına neden olur (12, 80-84).

2.3. Hidrojen Sülfür

Hidrojen Sülfür (H_2S), memeli vücut sistemleri üzerindeki önemli fizyolojik ve patolojik etkileri birçok çalışma ile kanıtlanmış, Nitrik oksit (NO) ve Karbonmonoksit (CO) ile birlikte üçüncü bir endojen gaz modülatör olarak kabul edilen bir moleküldür (15). H_2S memeli dokularında, endojen üretimi için temel

substratlar olarak kabul edilen amino asit sistein ve homosisteinden; sistatyonin-β-sentaz (CBS), sistatyonin-γ-liyaz (CSE) ve 3-merkaptopirüvat sülfürtransferaz (3-MST) olmak üzere üç farklı enzim tarafından sentezlenir (85). H_2S, hücre sinyalizasyonunda rol oynar ve nöroprotektif bir molekül olarak kabul edilmiştir. H_2S sentezleyen enzimlerden CBS beyinde yoğun olarak ifade edilir ve H_2S'nin beyindeki üretimini sağlayan ana enzimdir. CBS'nin hipokampüs ve serebellumda yüksek ifadelenme düzeyine sahip olduğu literatürde gösterilmiştir (14).

2.3.1. Santral Sinir Sisteminde Hidrojen Sülfür'ün Koruyucu Etkisi

H_2S, NF-κB ve mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK) sinyal yolağını inhibe ederek santral sinir sisteminde anti-inflamatuvar özellik göstermektedir (15). Yapılan bir çalışmada; mikroglianın pro-inflamatuvar mediyatörlerin belirgin üretimi ile karakterize olan polarizasyonundan, anti-inflamatuvar özellikte olan fenotip polarizasyonuna H_2S'nin aracılık ettiğini tespit etmişlerdir. H_2S'in adenozin 5′-monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) aktivasyonu yoluyla mikrogliayı anti-inflamatuvar fenotipine polarize ettiği ve bu sayede mikroglia aracılı nöroinflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (86).

Beyin, memeli vücudundaki diğer organlara göre oksidatif strese oldukça yatkındır (87). ROS'un aşırı üretilmesinin neden olduğu oksidatif stres zararlıdır ve birçok nörodejeneratif hastalığın etyolojik faktörlerinden biridir. Yapılan bir çalışmada H_2S'nin primer nöronları, glutamatın neden olduğu oksidatif glutamat toksisitesinden koruduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına göre H_2S, gama-glutamil sistein sentetaz aktivitesini artırarak ve sistin taşınmasını up-regüle

ederek antioksidan glutatyon (GSH) seviyelerini yükseltmiştir. Gama-glutamil sistein sentetaz aktivitesinin düzenlenmesi, GSH'nin mitokondriye yeniden dağıtılmasını kolaylaştırarak hücreleri oksidatif stres hasarına karşı korur (88). Başka bir çalışmada, H_2S'nin hücrelerdeki ana antioksidan olan GSH'nin hücre içi konsantrasyonlarını artırarak primer kortikal nöronları oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir. ATP-bağımlı K^+ (K_{ATP}) ve Cl^- kanallarını aktive ederek fare hipokampal hücre hattını oksidatif glutamat toksisitesinden koruduğu aynı çalışmada gösterilmiştir (89). H_2S'nin, glutamat taşıyıcısı-1'in glutamat alım fonksiyonunu artırarak ve GSH üretimini artırarak astrositleri koruduğu da literatürde gösterilmiştir. Böylece H_2S'nin sinaptik yarıklarda aşırı glutamat birikimini önleyerek nöronları eksitotoksisiteden koruduğu gösterilmiştir (90).

Antioksidan etkilerinin yanı sıra, H_2S'nin nöroprotektif anti-apoptotik özelliklere sahip olduğu da literatürde bildirilmiştir. H_2S'nin insan nöroblastom hücre hattında rotenon (Parkinson hastalığı modelini oluşturmak için kullanılan bir toksin) tarafından indüklenen apoptozu, mitokondriyal fonksiyonları koruyarak inhibe ettiği gösterilmiştir. H_2S'nin Mitokondriyal ATP'ye bağımlı Potasyum Kanalı (mitoKATP) kanalını düzenleyerek mitokondriyal membran potansiyeli dağılımını, sitokrom c salıverilmesini ve kaspaz-9/3 aktivasyonunu önleyerek apoptozu engellediği gösterilmiştir (91). Bu bulgular oksidatif stresle ilişkili nörodejeneratif hastalıklara terapötik yaklaşımlarda H_2S'nin etkisi olabileceğine dikkat çekmektedir (92).

2.3.2. Hidrojen Sülfür'ün Nöroinflamasyon Üzerine Etkileri

H_2S'nin anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri, nöroprotektif özelliğinin oluşmasına katkı sağlamaktadır (15). H_2S'nin nöroinflamasyon gelişimini azaltarak bilişsel semptomları iyileştirebileceği öne sürülmüştür. Hızlı salımlı bir H_2S donörü olan NaHS'nin uygulanmasının, TNF-α düzeylerini ve TNF reseptörlerinin ekspresyonunu azaltarak LPS'nin neden olduğu bilişsel işlevdeki bozulmayı iyileştirdiği gösterilmiştir (93). Bir başka çalışmada, mikroglia ve astrositlerden LPS ile indüklenen TNF-α, IL-6 ve NO dahil olmak üzere proinflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesinin, H_2S salıveren non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların ön tedavisi ile önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (94). Literatürde yer alan bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, H_2S'nin TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-23 ve NO dahil pro-inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesini azaltabileceği ayrıca bu mekanizma ile nöroinflamatuvar süreçlerin başlamasını ve ilerlemesini önleyerek bilişsel işlevde iyileşme sağlayabileceği öne sürülmüştür (16). Alzheimer hastalığı modeli oluşturulmuş farelerden izole edilen primer nöronların, mitokondriyal olarak hedeflenmiş H_2S donörü olan AP39 ile tedavisi, mitokondride spesifik olarak artan H_2S seviyeleri ve azalan ROS ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu farelere 6 hafta boyunca AP39'un in vivo uygulanmasının uzamsal belleği önemli ölçüde iyileştirildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar bilişsel fonksiyon iyileşmesinde mitokondriyal H_2S seviyelerindeki artışın anahtar rolünü göstermektedir (95).

NaHS'nin, oksidatif stres gelişimini önleyerek bilişsel fonksiyon bozukluğunu düzeltebileceğini gösteren çalışmalara ek olarak LPS kaynaklı

anksiyete benzeri davranışı düzeltebileceğini gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (73, 96). Oksidatif stres ve inflamasyon yolaklarının patolojik anksiyetenin sürdürülmesinden sorumlu olduğundan literatürde bahsedilmektedir. Patolojik anksiyete için anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri bilinen H_2S'in etkili olabileceği düşünülmektedir ve yapılan çalışmalar bunu destekler niteliktedir (97, 98).

2.3.3. Hidrojen Sülfür'ün Öğrenme ve Hafıza ile İlişkisi

H_2S, öğrenme ve hafıza işlevleriyle ilişkili önemli bir bölge olan hipokampüs dahil olmak üzere beyinde endojen olarak üretilir. Yapılan bir çalışmada, CBS aktivatörü olan S-adenozil metiyoninin hücre içi konsantrasyonlarının, Alzheimer hastalarının beyinlerinde normal beyinlerdekilere göre azaldığı bulunmuştur (99). Başka bir çalışmada ise H_2S seviyesinin, yaşları uyumlu normal bireylerin beyinlerine kıyasla Alzheimer hastalarının beyinlerinde büyük ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (100). Alzheimer ve vasküler demans hastalarında yürütülen kapsamlı bir klinik çalışmada, plazma H_2S seviyelerinin normal kontrollerden önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir. Plazma H_2S konsantrasyonunun Alzheimer hastalığının şiddeti ile negatif korelasyon gösterdiği de aynı çalışmada tespit edilmiştir (101).

Yapılan çalışmalarda H_2S donörlerinin ekzojen uygulanmasının LPS ile indüklenmiş bilişsel bozukluğu iyileştirdiği Morris su labirenti testinde gösterilmiştir (93, 102). Alzheimer hastalığının hayvan modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada ise çift transgenik APP/PS1 farelerinde H_2S uygulanmasının uzamsal öğrenmeyi iyileştirdiği gösterilmiştir (103).

Literatürdeki bilgiler göz önüne alındığında, kronik nöroinflamasyonun sonucu olarak hasara uğrayan beyin dokusu ileride ortaya çıkan nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Anksiyete bozukluğu ve Alzheimer hastalığı başta olmak üzere nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıklar, hastaların hafıza ve günlük yaşam aktivitelerini sürdürme yetilerini kademeli olarak kaybetmelerine neden olarak yaşam kalitelerini ciddi şekilde düşürürken hasta yakınlarının da sürekli bakım ve artan sorumluluklar ile hayatlarını zorlaştıran küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bahsedilen hastalıkların mevcut tedavi yöntemleri hastalık semptomlarını hafifletmeye yardımcı olmaktadır ancak bu hastalıkların ilerleyişini durduran ya da geri çeviren etkin bir tedavi seçeneği halen tam olarak bulunmamaktadır. Bu çalışmada Lipopolisakkarit aracılığıyla nöroinflamasyon indüklenerek uzamsal hafıza ve anksiyete benzeri semptomlar üzerindeki meydana gelebilecek değişimleri, potansiyel tedavi edici ajan olarak araştırılan Hidrojen Sülfür'ün önleyebileceği ya da düzeltebileceği hipotezini test etmek amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın etik kurul onayı 28.10.2022 tarih ve **G.Ü.ET-22.106** kod numarasıyla Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Tıpta Uzmanlık Tez Projesi kapsamında, **TTU-2023-8592** proje koduyla onaylanmış ve maddi destek sağlanmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma için Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)'nden temin edilen 60 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan deney hayvanı sayısı, örneklem büyüklüğünün belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen güç analizi sonucunda her grup için 10 hayvan olarak belirlenmiştir. Çalışma öncesinde deney hayvanlarının 14 gün boyunca yeni ortamlarına alışmaları sağlanmıştır. Sıçanlar 21 ± 2˚C sıcaklıkta, %40-60 nem oranında, 12 saat aydınlık ve karanlık döngüsünün sağlandığı odalarda, ad libitum beslenme ile standart sıçan kafesinde üçerli gruplar halinde veteriner gözetiminde barındırılmıştır. Deney protokolünün 1.,7.,11. ve 14. günlerinde deney hayvanlarının ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Deney hayvanlarına tüm enjeksiyonlar gündüz 09:30-10:00 aralığında uygulanmıştır, davranış deneyleri ise gündüz saat 11:30-16:00 aralığında yapılmıştır. Deney hayvanlarına uygulanan i.p. enjeksiyonlar ve gerçekleştirilen davranış deneyleri GÜDAM'da yapılmıştır. Morris su labirenti testinin her denemesinin ardından deney hayvanlarının ıslak kalmamasına dikkat edilmiş;

deney hayvanlarının her biri tam olarak kurulandıktan sonra kafesine yerleştirilmiştir.

3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan Lipopolisakkarit (LPS) (Escherichia coli O55: B5 ve Hidrojen Sülfür (H_2S) donörü Sodium Hydrosulfide Hydrate (NaHS) Sigma-Aldrich'ten (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) temin edilmiştir. LPS ve NaHS için çözücü olarak salin (%0,9 İzotonik Sodyum Klorür) kullanılmıştır (104). NaHS dozu 5 mg/kg ve LPS dozu 250 µg/kg olarak belirlenmiştir (93, 105). Maddeler steril koşullar altında hazırlanmış ve sıçanlara i.p. olarak uygulanmıştır.

3.3. Deney Grupları

Çalışmada 60 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar randomize 6 gruba ayrılmıştır. 4. gruptan 1 hayvanın kafesinde öldüğü tespit edilmiştir bu nedenle bu grupta hayvan sayısı 9'a inmiştir. 5. Gruptan 1 hayvan boyun dengesini sağlayamadığı için Morris su labirenti testi esnasında yüzememiştir, bu nedenle çalışmadan çıkartılmıştır. Çalışmadaki deney grupları ve özellikleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Deney Grupları

Grup No	Grup Adı	Uygulanan Madde	Uygulama Süresi	n
1	**KONTROL**	salin	14 gün	10
2	**LPS**	salin ve LPS	İlk 7 gün salin, sonraki 7 gün LPS	10
3	**NaHS(14)**	NaHS	14 gün	10
4	**NaHS(7)**	NaHS	İlk 7 gün salin, sonraki 7 gün NaHS	9
5	**LPS+NaHS(14)**	LPS ve NaHS	14 gün NaHS, son 7 gün LPS	9
6	**LPS+NaHS(7)**	salin, LPS ve NaHS	İlk 7 gün salin, sonraki 7 gün LPS ve NaHS	10

LPS: 250 µg/kg, NaHS: 5 mg/kg uygulanmıştır. Tüm enjeksiyonlar günde 1 kez ve intraperitoneal uygulama ile yapılmıştır. Salin: %0,9 İzotonik Sodyum Klorür. n: hayvan sayısı.

Enjeksiyon stresi nedeniyle gruplar arasında farklılık oluşmasını engellemek için enjeksiyon stresini her grupta eşit gün boyunca oluşturmak hedeflenmiştir ve bu doğrultuda;

Kontrol grubuna 14 gün boyunca salin uygulanmıştır.

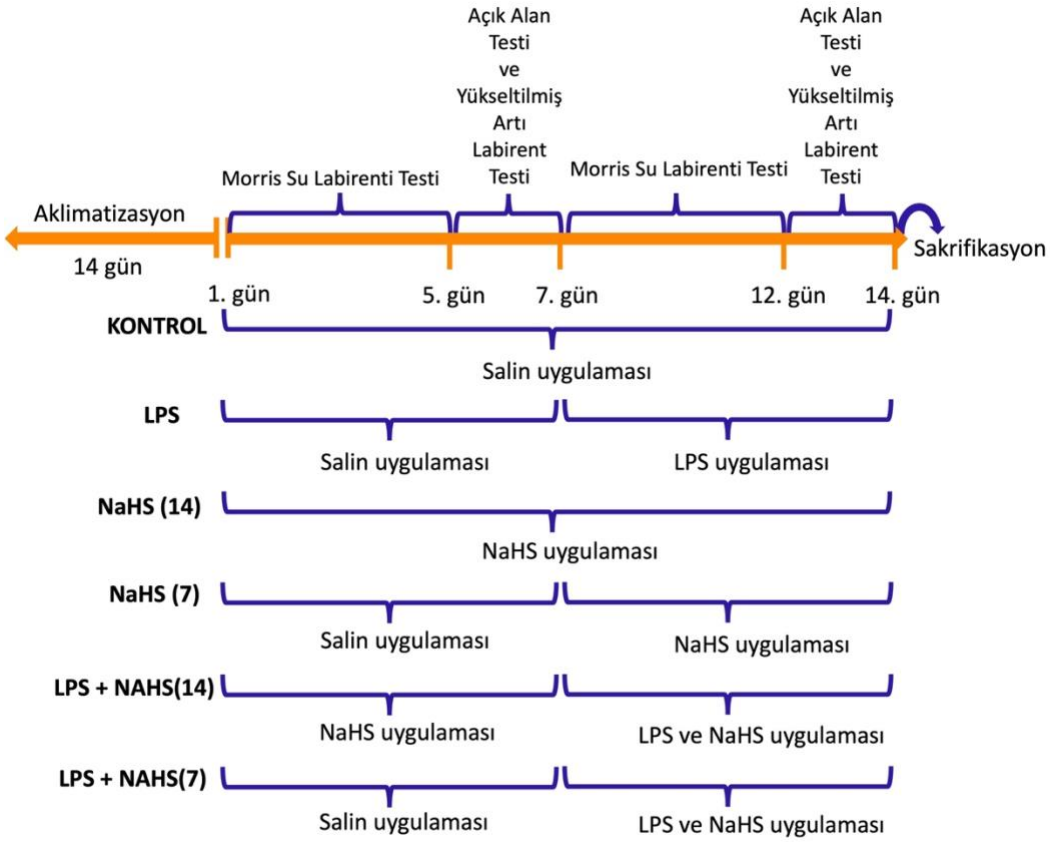
LPS grubunun ilk 7 gününde salin uygulanmıştır.

NaHS(7) ve LPS+NaHS(7) gruplarının ilk 7 gününde salin uygulanmıştır.

LPS+NaHS(14) grubunda NaHS'nin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. LPS+NaHS(7) grubunda NaHS'nin tedavi edici etkisi değerlendirilmiştir.

3.4. Deney Protokolü

Deney protokolü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Deney Protokolü

3.4.1. Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Nöroinflamasyon Modeli ve H_2S Uygulaması

Tez çalışması kapsamında H_2S'nin, sıçanlarda LPS ile oluşturulan nöroinflamasyon modeli üzerindeki etkilerinin davranışsal ve moleküler açıdan değerlendirilmesi amaçlandığı için öncelikle LPS ile nöroinflamasyon modeli oluşturulmuştur. Literatür araştırmaları sonucunda LPS ve H_2S enjeksiyonu davranış deneylerinden 2 saat önce uygulanmıştır (1, 11, 106-111). Tüm sıçanların

enjeksiyonları gündüz 09.30-10.00 aralığında steril koşullar altında yapılmıştır. Enjeksiyonlar tamamlandıktan sonra deney hayvanları davranış deneylerinin gerçekleştirildiği odaya alınarak iki saat ortama alışmaları sağlanmıştır.

3.4.2. Davranış Testleri

Çalışma boyunca kullanılan davranışsal deney yöntemleri şu şekildedir;

1. Morris Su Labirenti Testi
2. Açık Alan Testi
3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yukarıda sunulan her davranış deneyi yürütülürken video kaydı alınmıştır. Davranış deneyleri nedeniyle oluşan stresin diğer testi etkilememesi için deney hayvanları bir günde yalnızca bir davranış testine alınmıştır. Davranış deneylerinin tamamı her gün aynı saatler arasında, 11:30-16:00, sessiz bir ortamda yapılmıştır. Deneyin gerçekleştirileceği ortama alıştırmak amacıyla deney hayvanları, tüm deneylerden iki saat önce testin yapılacağı odaya yerleştirilmiştir. Deney protokolünün 14. günü, son davranış deneyinin bitişini takiben deney hayvanları anestezi ile sakrifiye edilerek hipokampüs dokuları çıkartılmış ve ileri analiz için saklanmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.4.2.1. Morris Su Labirenti Testi

Çalışmada 150 cm genişliğinde ve 65 cm derinliğindeki pleksiglas havuz yaklaşık 50 cm'ye kadar su ile doldurulmuştur. Suyun sıcaklığı 25°C'ye ayarlanarak deney hayvanlarının hipotermi yaşaması engellenmiştir. Wistar albino sıçanların kürkü beyaz olduğu için su toksik olmayan siyah renkli gıda boyası ile siyaha boyanmıştır. Deneyin gerçekleştirildiği odadaki farklı uyaranların deney

hayvanlarını etkilemesini engellemek ve her deney günü için standart ortamı sağlayabilmek için havuzun dört tarafı siyah perdelerle kapatılmıştır ve deneyi yürüten araştırmacı perdelerle aynı renk olması için siyah kıyafet giymiştir. Havuz birbirini dik kesen hayali iki çizgi ile dört kadrana ayrılmıştır. Her çizginin ucuna denk gelen perdelere birer adet görsel ipucu simgeleri (yuvarlak, kare, üçgen ve yıldız) konulmuştur. Deney hayvanları deney öncesi ortama alıştırmak için odaya alınırken, görsel ipuçlarını ve havuzu göremeyecekleri şekilde yerleştirilmişlerdir.

Çalışmada ilki 1.-5.günler ve ikincisi 8.-12.günler arasında olmak üzere iki kez Morris su labirenti testi yapılmıştır. Morris su labirenti testi ilk 4 günü kaçış gecikmelerinin değerlendirildiği dönem:kaçış gecikmesi testi ve 5. gün hedef kadranda geçirilen sürenin değerlendirildiği dönem:probe testi olmak üzere toplamda 5 gün sürmüştür.

3.4.2.1.1. Kaçış Gecikmesi Testi

Kaçış gecikmesi testi, havuza bırakılan deney hayvanlarının gizli platformu bulması ve havuzun etrafına yerleştirilen görsel ipuçlarını kullanarak platformun yerini öğrenmesine dayalı bir testtir. Sağlıklı bir deney hayvanının denemelerle beraber platformun yerini öğrenmesi beklenir. Eğer deney hayvanında uzaysal bellek ile ilgili bir problem var ise platformu bulmak için geçen süre denemelerle beraber değişmez veya artar.

Deney hayvanlarının havuza bir kez bırakılması bir deneme olarak kabul edilir. Çalışmada deney hayvanlarına bir günde iki deneme yaptırılmıştır (112, 113). Tüm hayvanların ilk denemesi bittikten sonra ikinci denemelere başlanmıştır. Deney hayvanları her denemede farklı bir kadrandan havuza

bırakılmıştır. İlk gün bırakılan ilk kadran olarak platformun bulunduğu kadrana en uzak kadran seçilmiştir ve bu kadrana 1. kadran adı verilmiştir. Saat yönünün tersi takip edilerek sırayla 2. kadran, 3. kadran ve 4. kadran olarak isimlendirilmiştir. Deney hayvanları havuza bırakıldıkları anda kronometre çalıştırılarak 90 saniye havuzu keşfetmeleri ve platformu bulmaları için süre verilmiştir (112). Eğer deney hayvanı 90 saniyeden önce platformu bulursa kronometre durdurulup yeniden başlatılarak platformun üzerinde etraftaki görsel ipuçlarını öğrenmeleri için 30 saniye süre verilmiştir. Aksine eğer deney hayvanı 90 saniyede platformu bulamadıysa araştırmacı tarafından platformun üzerine yerleştirilerek görsel ipuçları aracılığı ile platformun yerini öğrenmesi için 30 saniye izin verilmiştir. Her gün yapılan denemelerde deney hayvanlarının **platformu bulmak için harcadıkları süre** değerlendirilmiştir.

3.4.2.1.2. Probe Testi

Beşinci gün gerçekleştirilen probe testinde platform havuzdan çıkartılır ve platformun bulunduğu kadran hedef kadran olarak adlandırılır. Deney hayvanı hedef kadrana en uzak kadrandan havuza bırakılır ve 90 saniye süre verilerek **hedef kadranda geçirdiği süre ve hedef kadranda katettiği toplam mesafe** hesaplanır. Sağlıklı bir öğrenme süreci olan deney hayvanından en fazla süreyi hedef kadranda geçirmesi, en fazla mesafeyi bu kadranda kat etmesi beklenir ve referans bellek işlevinin kazanıldığını gösterir. Bu test aşamasında elde edilen veriye **‘hedef kadranda geçirilen süre’** adı verilir ve probe testi süresi olarak ifade edilmiştir.

3.4.2.2. Açık Alan Testi

Çalışmada LPS ve H_2S'nin anksiyete ve lokomotor aktivite üzerine etkilerini incelemek amacıyla 6. ve 13. günlerde olmak üzere iki kez açık alan testi uygulanmıştır. Bu test için, 40 cm duvar yüksekliği olan 50x50 cm taban ölçülerine sahip kare şeklinde bir aparat kullanılmıştır. Test aparatı siyah renkte olup tabanı beyaz renkli çizgilerle 10x10 cm'lik eşit karelerle bölmelere ayrılmıştır. Çalışmamızda her deney hayvanı 5 dakika süre ile teste alınmıştır. Her deney hayvanı aparatın ortasına yerleştirilmiştir (71, 73). Sonraki deney hayvanının testi öncesinde ortam havalandırılmış ve düzenek %70'lik alkol ile silinmiştir böylece önceki deney hayvanına ait kokulardan ortam arındırılmıştır.

Açık alan testi'de zaman ölçütleri olarak; **toplam katedilen mesafe, ortalama hız, toplam hareketli zaman, merkez kadranda geçirilen süre ve merkez kadranda katedilen toplam mesafe** değerlendirilmiştir. **Toplam katedilen mesafe, ortalama hız ve toplam hareketli zaman lokomotor aktivite göstergesi** olarak değerlendirilmiştir **Merkez kadranda geçirilen süre ve merkez kadranda katedilen mesafe azalmış anksiyete göstergesi** olarak değerlendirilmiştir (69).

3.4.2.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Çalışmada artı şeklinde birbirine dik olarak düzenlenmiş, 70x70 cm ebatlarında, iki tanesi açık iki tanesi kapalı olmak üzere toplamda dört kolu olan bir platform kullanılmıştır. Kolların arasındaki merkezi kadran olarak adlandırılan merkezi kare 9x9 cm ölçüsündedir ve deney hayvanı düzeneğe ilk buradan yerleştirilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testi deney hayvanlarına 7. ve 14.

günlerde olmak üzere iki kez uygulanmıştır. Çalışmada deney hayvanları merkez kadrana yüzleri açık kola bakacak şekilde yerleştirilmiştir ve 5 dakika boyunca labirenti keşfetmeleri için süre verilmiştir. Açık kolların en uçtaki 10 cm'lik kısımları "aşırı uç" olarak tanımlanmıştır ve sıçanların bu bölgede geçirdikleri süreler takip edilmiştir (114). Deney hayvanlarının **açık kolda geçirdikleri süre, açık kolda katettikleri toplam mesafe, aşırı uç kısma giriş sayıları ve aşırı uçta geçirdikleri süre** hesaplanmıştır. **Anksiyete benzeri davranış, bu parametrelerin azalışının değerlendirilmesi** ile tanımlanmıştır (75).

3.4.2.4. Video Kayıt Analizleri

Davranış deneyleri esnasında deney hayvanlarının sabitlenmiş kameralar aracılığı ile alınan video kayıtlarının kantitatif hesaplamaları ve analizleri ANY-maze version 7 tracking engine kullanılarak Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezi (NÖROM) davranış deneyi laboratuvarında yapılmıştır.

3.4.3. Doku Analizi

Hipokampüs dokusundan protein ifade düzeyi için çalışmalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

3.4.3.1. Western Blot Yöntemi

TNF-alfa, CBS, CSE, IL-6, IL-17 ve IL-23 proteinlerinin ifadelerinin varlığı Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir. Housekeeping protein olarak beta-aktin (ACTB) proteini kullanılmıştır.

3.4.3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

- 0,5 M Tris-HCl Çözeltisi (pH 6.8): 12,1 g Tris baz 50 ml ultra saf su içinde çözdürülmüştür. pH metre ile takip edilerek çözeltiye HCl eklenmiştir. pH 6.8'e ayarlandıktan sonra ultra saf su eklenmiş ve çözelti 200 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
- 1,5 M Tris-HCl Çözeltisi (pH 8.8): 36,3 g Tris baz 150 ml ultra saf su içinde çözdürülmüştür. pH metre ile takip edilerek çözeltiye HCl eklenmiştir. pH 8.8'e ayarlandıktan sonra ultra saf su eklenmiş ve çözelti 200 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
- Akrilamid – Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29 g Akrilamid ve 1 g Bisakrilamid 100 ml ultra saf su ile çözdürülmüştür ve +4 °C'de koyu renkli cam şişede ışıktan korunarak muhafaza edilmiştir.
- Amonyum Persülfat Çözeltisi (%10): 0,1 g Amonyum Persülfat (APS) 1 ml ultra saf su içinde çözdürülmüştür ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
- Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi: 1 g Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) 10 ml ultra saf su ile çözdürülmüştür ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
- 1X Jel Transfer Tamponu: 10X'lik transfer tamponu stoğundan 100 ml alınmıştır ve üzerine 200 ml metanol eklenerek 700 ml ultra saf su içerisinde çözdürülmüştür. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
- 1X Jel Yürütme Tamponu (Running Buffer): 10X'lik yürütme tamponu stoğundan 100 ml alınarak 900 ml ultra saf suda çözdürülmüştür ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- 1X Tris Buffer Saline-Tween 20 (TBS-T) Çözeltisi: 10X'lik TBS stoğundan 100 ml alınmıştır ve üzerine 1 ml Tween 20 eklenerek 900 ml ultra saf su içinde çözdürülmüştür. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- 1X BSA Bloklama Çözeltisi: 10X'lik Bovine Serum Albumin (BSA) Bloklama solüsyonu stoğundan 1 ml alınarak 9 ml TBS-T içinde çözdürülmüştür. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- Primer Antikor Hazırlığı: 1 ml BSA 9 ml TBS-T içinde çözdürülmüştür ve kullanılan primer antikor dilüsyon faktörüne dikkat edilerek çözeltiye eklenmiştir. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

- Sekonder Antikor Hazırlığı: 1,5 ml BSA 13,5 ml TBS-T içinde çözdürülmüştür ve kullanılan sekonder antikor dilüsyon faktörüne dikkat edilerek çözeltiye eklenmiştir. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.3.1.2. Sıçan Hipokampüs Doku Örneklerinden Protein Ekstraksiyonu

Tüm deney gruplarından alındıktan sonra -80 °C'de muhafaza edilen hipokampüs örneklerinden 100 mg doku örneği alınarak, buz üzerinde steril bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren RIPA tamponu eklenmiştir. Doku örnekleri homojenizatör buz üzerinde parçalandıktan sonra +4 °C'de 20 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilerek doku örneklerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yükleme esnasında kuyucuklara eşit miktarda protein yüklenmesini sağlamak amacıyla BCA Protein Assay Kiti ile elde edilen örneklere ait protein miktarı belirlenmiştir.

3.4.3.1.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid (SDS-PAGE) Jelin Hazırlanması

Araştırılan tüm proteinler için ayırma jeli %10 ve %12'lik, yığınlama jeli (stacking gel) %5'lik oran hazır edilmiştir. Jelin döküleceği camlar jel kasetine yerleştirildikten sonra önce ayırma jeli (resolving gel) tarak için belirlenen hizanın bir miktar alt kısmına kadar dökülmüştür. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra yığınlama jeli hazırlanarak ayırma jelinin üzerine dökülmüş ve taraklar yerleştirilerek polimerleşmeye bırakılmıştır.

3.4.3.1.4. Proteinlerin SDS-PAGE'e Yüklenme Öncesi Hazırlığı

İçerdikleri toplam protein miktarları belirlenmiş olan protein lizatlarının her birinden 30 µg/ml olacak şekilde protein karışımı alınmış ve 4X Laemmli yükleme tamponu ile (%10 SDS, 20% Gliserol, %0.01 Bromofenol mavisi, 0.3125 M Tris HCl pH:6.8) 3:1 oranında karıştırılmıştır. -20 °C'de muhafaza edilen örnekler önce +4 °C'ye indirilerek bekletilmiştir. Ardından kuru ısıtıcı blokta 5 dakika süre ile 95°C'de bekletilerek proteinleri denatüre edildikten sonra SDS-PAGE'e yüklenene kadar +4 °C'de bekletilmiştir.

3.4.3.1.5. Proteinlerin SDS-PAGE'e Yüklenmesi ve Elektroforez

Jel polimerleştikten sonra jel kaseti dikey elektroforez sisteminin (Biorad), tankına yerleştirilmiştir. Hazırlanan yürütme tamponu anot-katot boşluklarından jel tankına dökülmüştür. Yürütme tamponu döküldükten sonra tarak dikkatlice çıkartılmıştır. İlk kuyucuğa boyalı peroksidaz işaretli protein moleküler ağırlık belirteci ve diğer kuyucuklara sırasıyla denatüre edilmiş protein örnekleri yüklenerek 120 V'da 1.5 saat +4 °C'de yürütme işlemi ile elektroforez gerçekleştirilmiştir. Yükleme boyası jelin en alt kısmına gelince yürütme işlemi

sonlandırılmıştır. Bu işlem ile proteinlerin yürütme tamponu aracılığıyla moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlanmıştır.

3.4.3.1.6. Protein Örneklerinin Poliviniliden Florür (PVDF) Membrana Aktarılması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, camlardan ayrılarak transfer tamponuna alınmıştır. Boyu 8 cm, eni 6 cm olacak şekilde kesilen poliviniliden diflorür (PVDF) membran %100 metanol içerisinde 15 saniye bekletilmiş ve aktivasyonu sağlanmıştır. Yarı-ıslak transfer sistemi tepsisi içine en alta sünger ped, ped üzerine membran, membranların üzerine arada boşluk kalmayacak şekilde jeller yerleştirilmiştir. Jelden sonra üste transfer solüsyonu ile ıslanmış sünger ped konularak transfer sistemi hazırlanmıştır. Yarı-ıslak transfer sistemi kullanılarak (Biorad) 30 dakikada transfer gerçekleştirilmiştir.

3.4.3.1.7. Bloklama

Birincil antikorların özgül olmayan bağlanmasını engellemek amacıyla membranlar TBS-T içerisinde hazırlanmış %3 BSA çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında otomatik yatay çalkalayıcı üzerinde bloklama işlemine tabi tutulmuştur.

3.4.3.1.8. Membran Üzerindeki Proteinlerin İmmunolojik Gösterilmesi

Bloklama işleminden sonra membranlar %3 BSA içeren TBS-T içerisinde her bir primer antikor 1:1000 oranında seyreltilerek +4 °C'de bir gece yatay çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Ertesi gün inkübasyonun ardından membranlar, 5 dakika boyunca 3 kez TBS-T çözeltisi kullanılarak yıkanmış ve spesifik olmayan bağlanmalar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi sonunda

membranlar, %3 BSA içeren TBS-T içerisinde 1:2000 seyreltilmiş anti-tavşan IgG, HRP konjuge sekonder antikoru ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.

3.4.3.1.9. Görüntüleme

Sekonder antikor ile inkübasyonun ardından membranlar, 5 dakika boyunca 3'er defa TBS-T çözeltisinde yıkandıktan sonra kemilüminesans ışıma veren kromojen substrat (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, Almanya) ile muamele edilmiştir. Elde edilen kemiluminesans ışıma Kodak Gel Logic 2200 Carestream (ABD) görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekilerek bant görüntüleri kaydedilmiştir. Western blot analizi her bir antikor için en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (115).

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerinin analizinde SPSS (IBM Corp. Version 29.0.2.0. New York, ABD), grafikleştirilmesinde GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, ABD) programları kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata (Standart Error of the Mean, SEM) olarak belirtilmiştir. $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Grupların 1. hafta ve 2. hafta verileri değerlendirilmiştir. 1. hafta kendi içinde Kontrol grubuna göre tüm gruplar değerlendirilmiştir. 2. hafta kendi içinde Kontrol grubuna göre tüm gruplar değerlendirilmiştir. Ayrıca 2. hafta Kontrol, NaHS(14) ve NaHS(7) grupları birlikte; LPS, LPS+NaHS(14) ve LPS+NaHS(7) grupları birlikte; NaHS(14) ve LPS+NaHS(14) grupları birlikte; NaHS(7) ve LPS+NaHS(7) grupları birlikte değerlendirilmiştir. Tüm deney grupları analiz yapılmadan önce normallik dağılımı açısından incelenmiştir. Gruplardan en az birinin normal dağılmadığı durumlarda non-parametrik testler seçilmiştir. İki farklı grubun sayısal ölçümlerinin analizinde **'Mann-Whitney U testi'** yapılmıştır. 2'den fazla grubun sayısal ölçümlerinin analizinde **'Kruskal-Wallis testi'** yapılmıştır. Bu çalışmada gerçekleştirilen Kruskal-Wallis testi sonuçları, **Bonferroni düzeltmesi** uygulanarak değerlendirilmiştir. Aynı grupların 1. hafta ve 2. hafta kıyaslanmasında ise **'Wilcoxon testi'** yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değişimi Bulguları

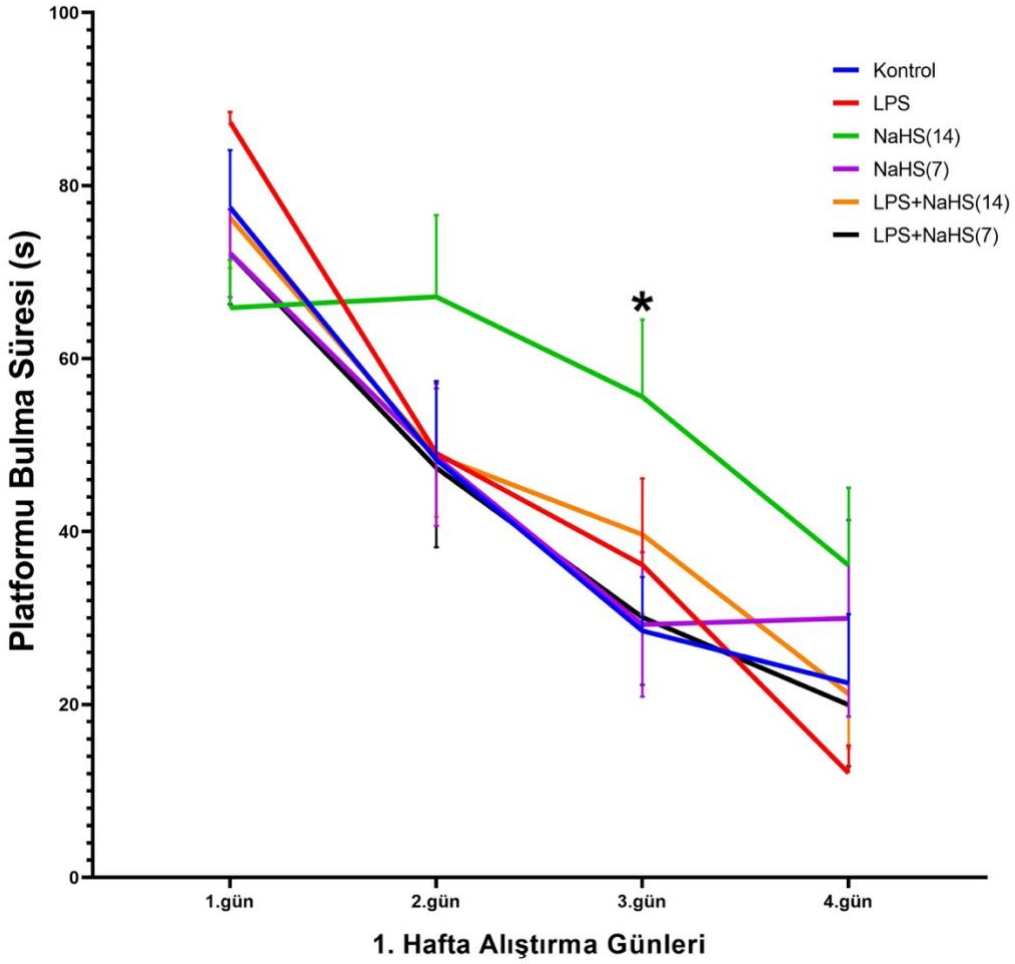
Deney gruplarındaki hayvanların ağırlık ölçümleri 0., 7., 10. ve 14. günlerde yapılmıştır. Tüm gruplara ait deney hayvanlarının ağırlık değerlerinde 2 haftalık deney süresi boyunca anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Deney gruplarına ait ağırlık ölçümlerinin günlere göre değişimi Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Deney Gruplarına Ait Hayvanların 0., 7., 10. ve 14. Gün Ağırlık Ölçümleri

Deney Grubu	0.Gün Ağırlık Ölçümü	7.Gün Ağırlık Ölçümü	10.gün Ağırlık Ölçümü	14.Gün Ağırlık Ölçümü
KONTROL	234 ± 11,5	239,90 ± 10,53	242,70 ± 11,71	249,30 ± 11,15
LPS	242,6 ± 9,34	250,3 ± 8,22	238,1 ± 7,19	243,2 ± 7,04
NaHS(14)	232 ± 9,86	245,4 ± 8,83	249,5 ± 9,25	253,1 ± 8,29
NaHS(7)	234,11 ± 9,53	241,44 ± 8,73	245,56 ± 8,64	249,33 ± 9,08
LPS+NaHS(14)	238,78 ± 9,69	249,78 ± 10,88	234,89 ± 9,64	241,11 ± 10,13
LPS+NaHS(7)	235,5 ± 9,69	247,3 ± 11,18	228,9 ± 9,09	237,2 ± 9,89

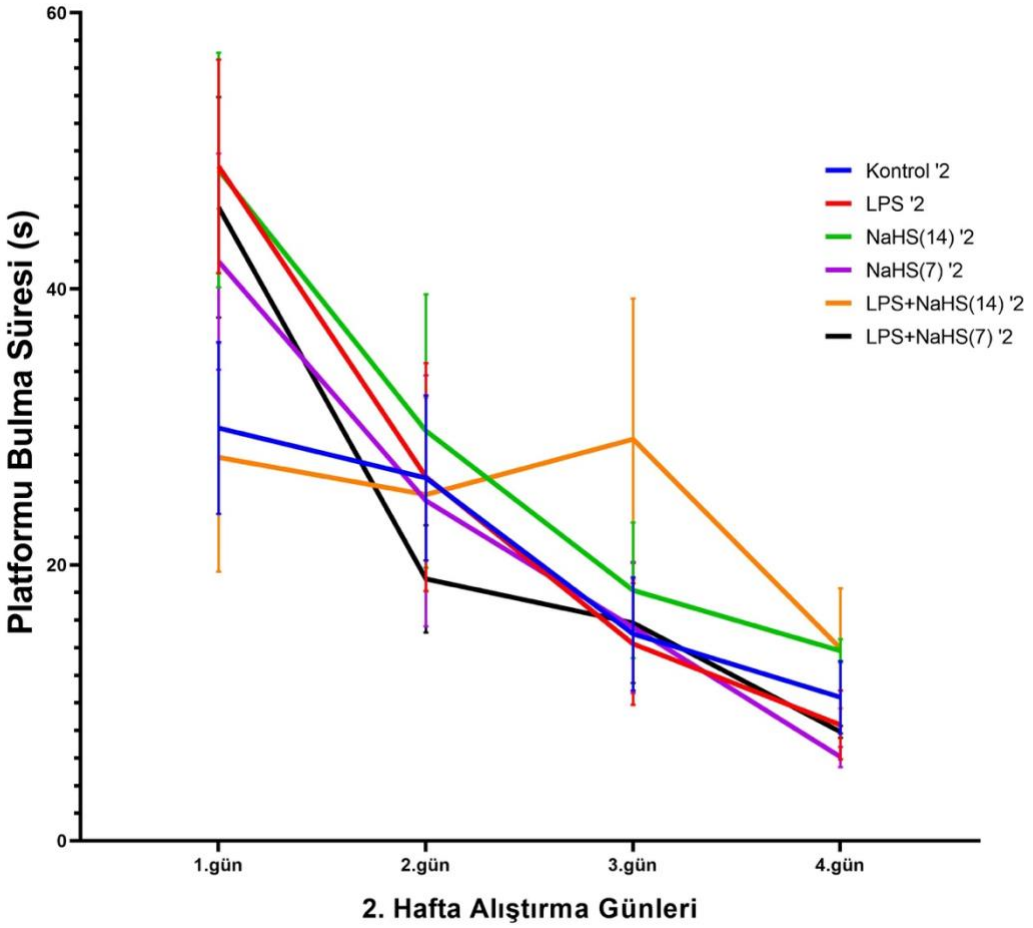
4.2. Morris Su Labirenti Testi Bulguları

Morris su labirenti testinin alıştırma günlerinde platformu bulma süresinin 1. haftada, gruplara göre değişimi Grafik 1'de verilmiştir. NaHS(14) grubunun (55,6±8,92 s) 3. günde platformu bulma süresinde Kontrol grubuna (28,53±6,24 s) göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p<0,05$, Grafik 1).



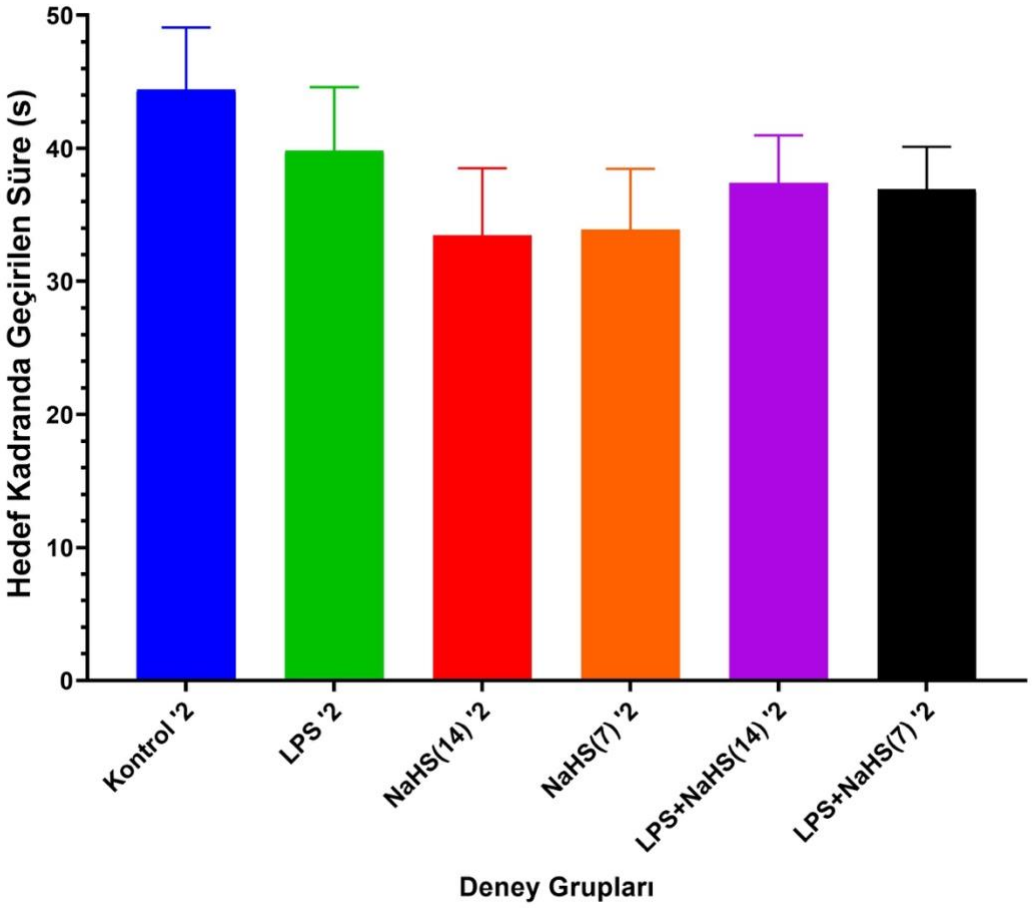
Grafik 1. Morris Su Labirenti Testi 1. Hafta Alıştırma Günlerinde Platformu Bulma Süresinin Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. *:Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). n=9-10/grup.

Morris su labirenti testinin alıştırma günlerinde platformu bulma süresinin 2. haftada, gruplara göre değişimi Grafik 2'de verilmiştir. Morris su labirenti testinin alıştırma günlerinde platformu bulma süresinin 2. haftada değişiminde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Grafik 2).



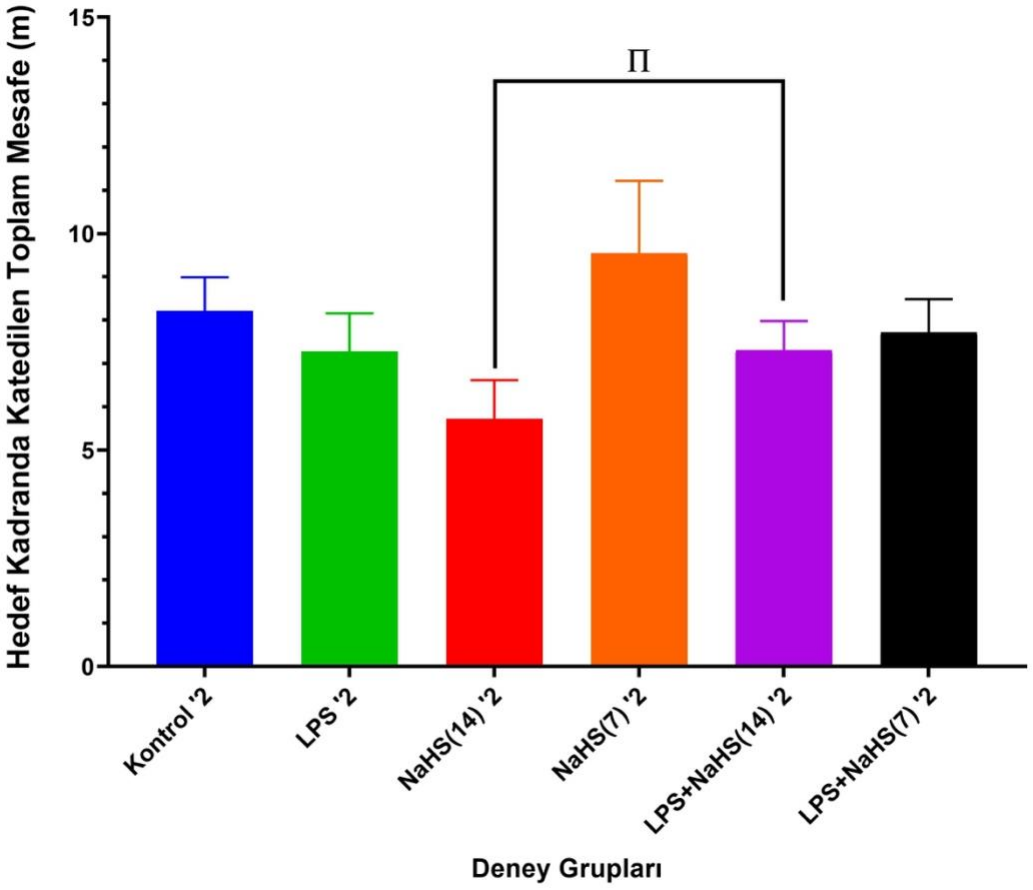
Grafik 2. Morris Su Labirenti Testi 2. Hafta Alıştırma Günlerinde Platformu Bulma Süresinin Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=9-10/grup.

Morris su labirenti testinin 2. haftasında probe testinde, hedef kadranda geçirilen sürenin gruplara göre değişimi Grafik 3'te verilmiştir. Morris su labirenti testinin probe testinde 2. haftada, hedef kadranda geçirilen sürenin değişiminde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Grafik 3).



Grafik 3. Morris Su Labirenti Testi 2. Hafta Probe Testi Hedef Kadranda Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=9-10/grup.

Morris su labirenti testinin probe testinde 2. haftada, hedef kadranda katedilen toplam mesafenin gruplara göre değişimi Grafik 4'te verilmiştir. Morris su labirenti testinin probe testinde 2. haftada, hedef kadranda katedilen toplam mesafe LPS+NaHS(14) grubunda (7,3±0,68 m) NaHS(14) grubuna (5,72±0,9 m) göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır, ($p<0,05$, Grafik 4). Morris su labirenti testinin probe testinde 2. haftada, hedef kadranda katedilen toplam mesafede diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Grafik 4).



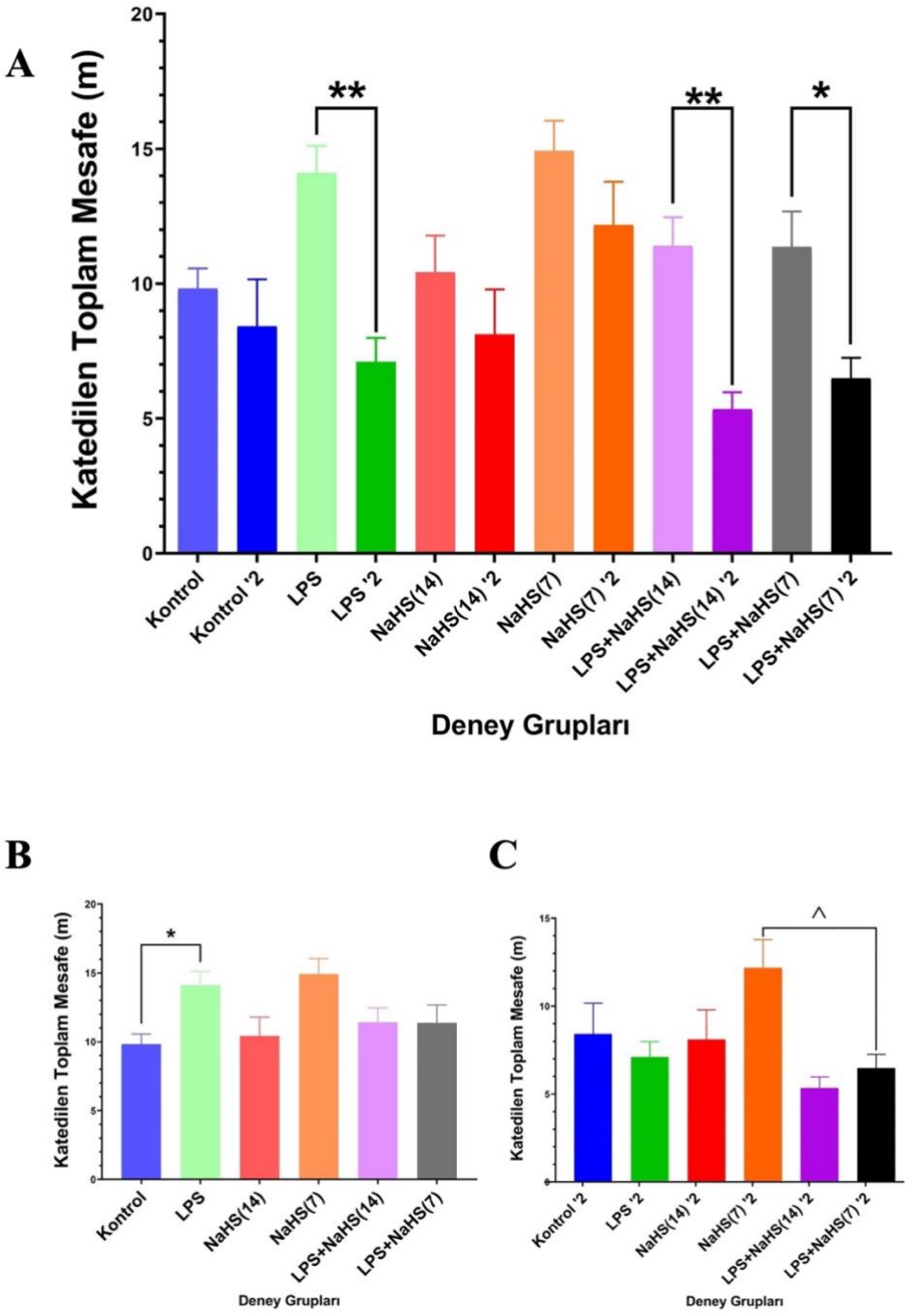
Grafik 4. Morris Su Labirenti Testi 2. Hafta Probe Testi Hedef Kadranda Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. ∏:p<0,05, NaHS(14) grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. n=9-10/grup.

4.3. Açık Alan Testi Bulguları

Açık alan testinde katedilen toplam mesafenin 1. hafta ve 2. haftaya göre gruplarda değişimi Grafik 5-A'da verilmiştir. LPS grubunda katedilen toplam mesafe 2. hafta (7,1±0,89 m) 1. haftaya (14,1±1,01 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 5-A). LPS+NaHS(14) grubunda katedilen toplam mesafe 2. hafta (5,34±0,63 m) 1. haftaya (11,41±1,05 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 5-A). LPS+NaHS(7) grubunda katedilen toplam mesafe 2. hafta (6,49±0,77 m) 1. haftaya (11,37±1,31 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 5-A).

Açık alan testinde katedilen toplam mesafenin 1. haftasının gruplara göre değişimi Grafik 5-B'de verilmiştir. Açık alan testinin 1. haftasında katedilen toplam mesafe LPS grubunda (14,1±1,01 m) kontrol grubuna (9,82±0,75 m) göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,01$, Grafik 5-B).

Açık alan testinde katedilen toplam mesafenin 2. haftasının, gruplara göre değişimi Grafik 5-C'de verilmiştir. Açık alan testinin 2. haftasında, LPS+NaHS(7) grubunda (6,49±0,77 m) katedilen toplam mesafe NaHS(7) grubundakine (12,17±1,61 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 5-C).

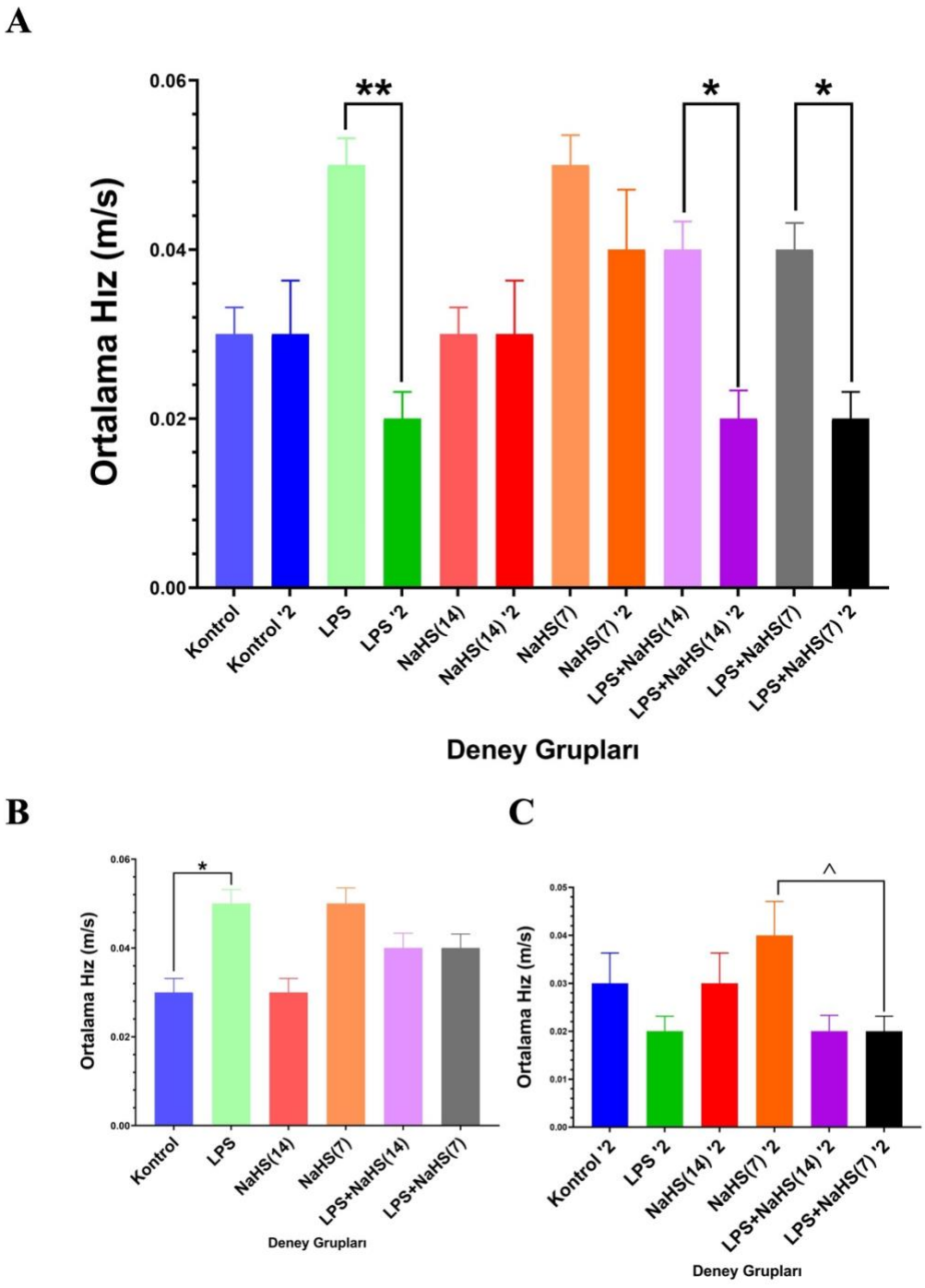


Grafik 5. Açık Alan Testinde Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Açık alan testi 1. hafta ve 2. hafta katedilen toplam mesafenin haftalara göre değişimi. *:p<0,05, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder.: p<0,01, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder. B) Açık alan testi 1. hafta katedilen toplam mesafenin gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. C) Açık alan testi 2. hafta katedilen toplam mesafenin gruplara göre değişimi. ^:p<0,05, NaHS(7) grubuna göre anlamlılığı ifade eder. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=8-10/grup.**

Açık alan testinde ortalama hızın, 1. hafta ve 2. hafta gruplara göre değişimi Grafik 6-A'da verilmiştir. LPS grubunda ortalama hız 2. hafta (0,02±0 m/s) 1. haftaya (0,05±0 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 6-A). LPS+NaHS(14) grubunda ortalama hız 2. hafta (0,02±0 m/s) 1. haftaya (0,04±0 m/s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 6-A). LPS+NaHS(7) grubunda ortalama hız 2. hafta (0,02±0 m/s) 1. haftaya (0,04±0 m/s) istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 6-A).

Açık alan testinde ortalama hızın 1. haftasının gruplara göre değişimi Grafik 6-B'de verilmiştir. Açık alan testinin 1. haftasında ortalama hız LPS grubunda (0,05±0 m/s) Kontrol grubuna (0,03±0 m/s) göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,05$, Grafik 6-B).

Açık alan testinde ortalama hızın 2. haftada gruplara göre değişimi Grafik 6-C'de verilmiştir. Açık alan testinin 2. haftasında, LPS+NaHS(7) grubunun (0,02±0 m/s) ortalama hızı NaHS(7) grubunun (0,04±0,01 m/s) ortalama hızına göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 6-C).

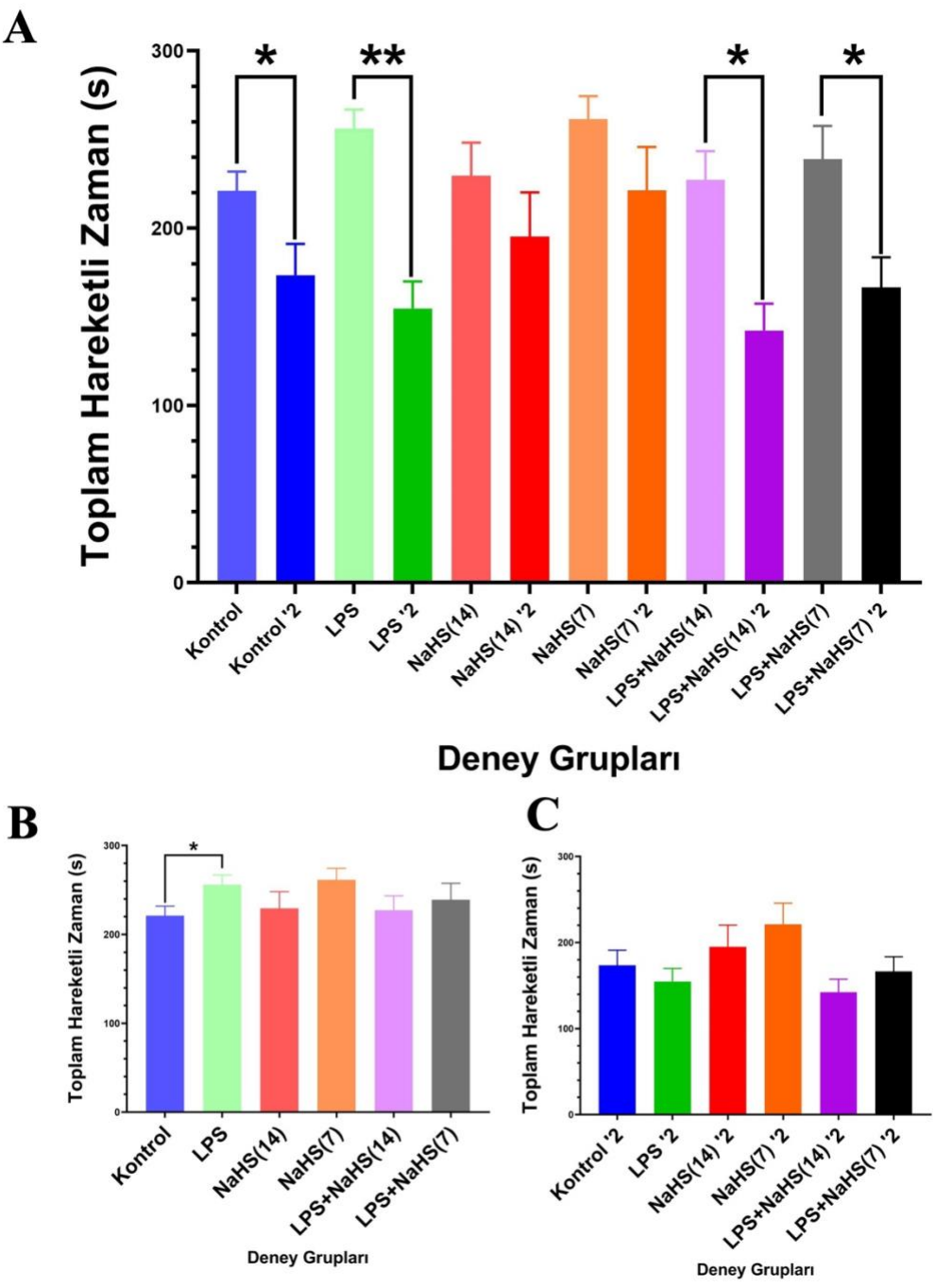


Grafik 6. Açık Alan Testinde Ortalama Hızın Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Açık alan testi 1. hafta ve 2. hafta ortalama hızın haftalara göre değişimi. *:p<0,05, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder.: p<0,01, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder. B) Açık alan testi 1. hafta ortalama hızın gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. C) Açık alan testi 2. hafta ortalama hızın gruplara göre değişimi. ^:p<0,05, NaHS(7) grubuna göre anlamlılığı ifade eder. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=8-10/grup.**

Açık alan testinde toplam hareketli zamanın, 1. hafta ve 2. hafta gruplara göre değişimi Grafik 7-A'da verilmiştir. Kontrol grubunda toplam hareketli zaman 1. hafta (221,09±10,92 s) 2. haftaya (173,52±17,6 s) göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. LPS grubunda 2. hafta (154,66±13,71 s) 1. haftaya (256,03±10,95 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 7-A). LPS+NaHS(14) grubunda toplam hareketli zaman 2. hafta (142,26±15,16 s) 1. haftaya (227,23±16,27 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 7-A). LPS+NaHS(7) grubunda ortalama hız 2. hafta (166,55±17,06 s) 1. haftaya (239,03±18,61 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 7-A).

Açık alan testinde toplam hareketli zamanın 1. haftada gruplara göre değişimi Grafik 7-B'de verilmiştir. Açık alan testinin 1. haftasında, LPS grubunun (256,03±10,95 s) toplam hareketli zamanı Kontrol grubuna (221,09±10,92 s) göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p<0,05$, Grafik 7-B).

Açık alan testinde toplam hareketli zamanın 2. haftada gruplara göre değişimi Grafik 7-C'de verilmiştir. Açık alan testinde toplam hareketli zamanda 2. haftada gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (Grafik 7-C).

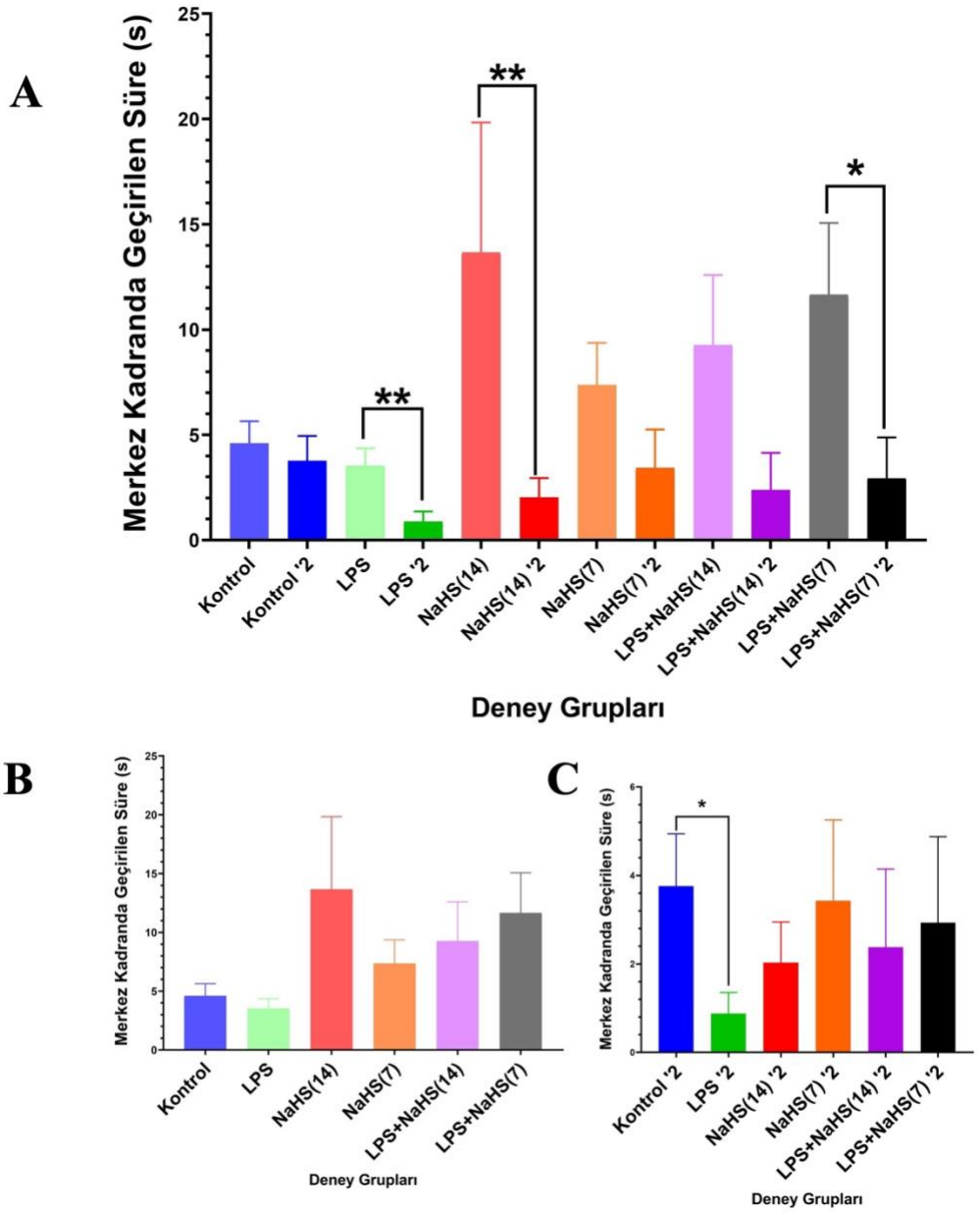


Grafik 7. Açık Alan Testinde Toplam Hareketli Zamanın Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Açık alan testi 1. hafta ve 2. hafta toplam hareketli zamanın haftalara göre değişimi. *:p<0,05, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder.: p<0,01, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder. B) Açık alan testi 1. hafta toplam hareketli zamanın gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. C) Açık alan testi 2. hafta toplam hareketli zamanın gruplara göre değişimi. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=8-10/grup.**

Açık alan testinde merkez kadranda geçirilen sürenin, 1. hafta ve 2. hafta gruplara göre değişimi Grafik 8-A'da verilmiştir. LPS grubunda merkez kadranda geçirilen süre 2. hafta (0,88±0,48 s) 1. haftaya (3,53±0,84 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 8-A). NaHS(14) grubunda merkez kadranda geçirilen süre 2. hafta (2,03±0,92 s) 1. haftaya (13,66±6,19 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 8-A). LPS+NaHS(7) grubunda merkez kadranda geçirilen süre 2. hafta (2,93±1,95 s) 1. haftaya (11,66±3,41 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 8-A).

Açık alan testinin 1. haftasında, merkez kadranda geçirilen sürenin gruplara göre değişimi Grafik 8-B'de verilmiştir. Açık alan testinde, merkez kadranda geçirilen sürede 1. haftada gruplar arasında fark görülmemiştir (Grafik 8-B).

Açık alan testinde merkez kadranda geçirilen sürenin 2. haftada, gruplara göre değişimi Grafik 8-C'de verilmiştir. Açık alan testinin 2. haftasında, merkez kadranda geçirilen süre, LPS grubunda (0,88±0,48 s) Kontrol grubuna (3,76±1,19 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 8-C).

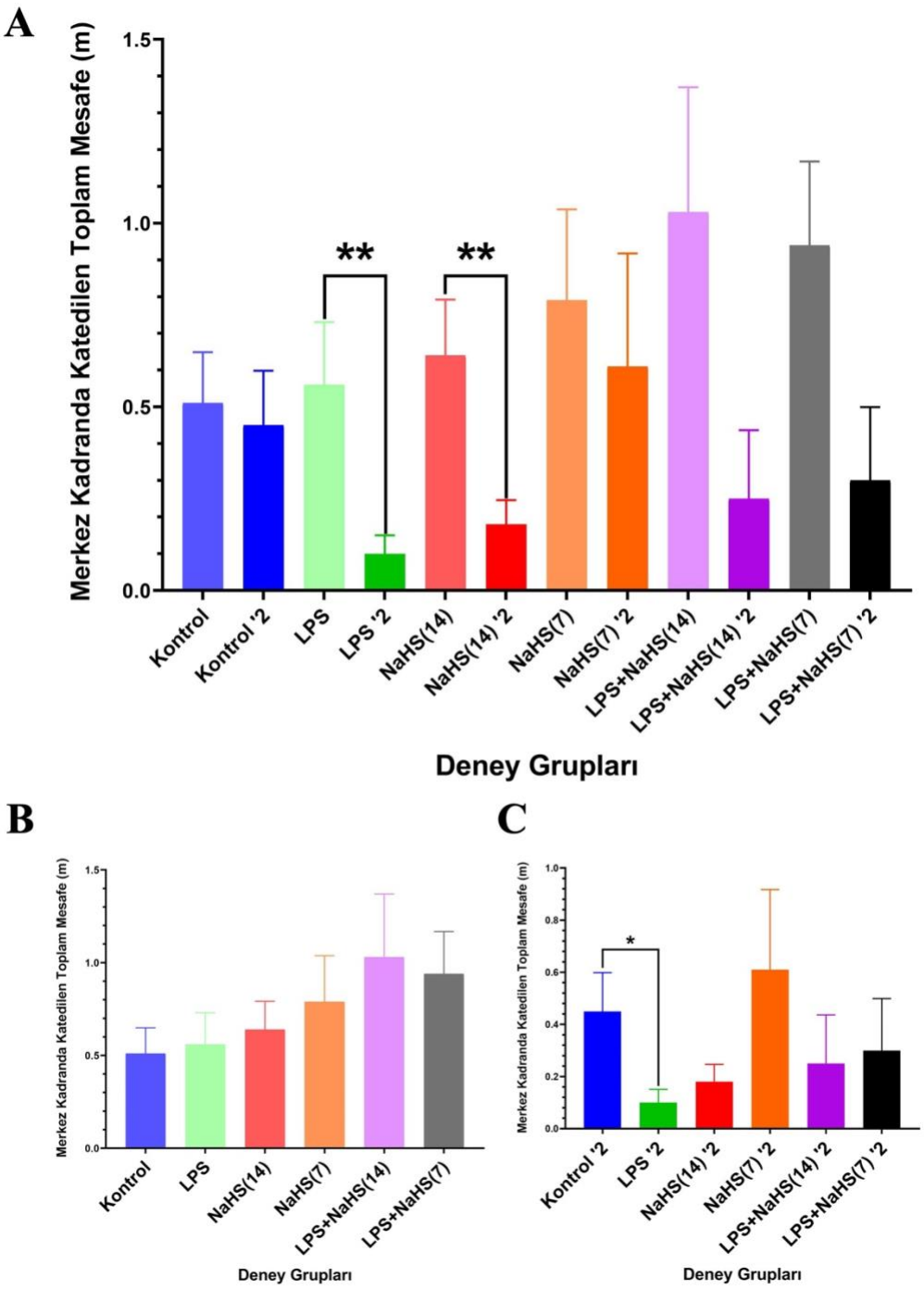


Grafik 8. Açık Alan Testinde Merkez Kadranda Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Açık alan testi 1. hafta ve 2. hafta merkez kadranda geçirilen sürenin haftalara göre değişimi. *:p<0,05, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder.: p<0,01, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder. B) Açık alan testi 1. hafta merkez kadranda geçirilen sürenin gruplara göre değişimi. C) Açık alan testi 2. hafta merkez kadranda geçirilen sürenin gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=8-10/grup.**

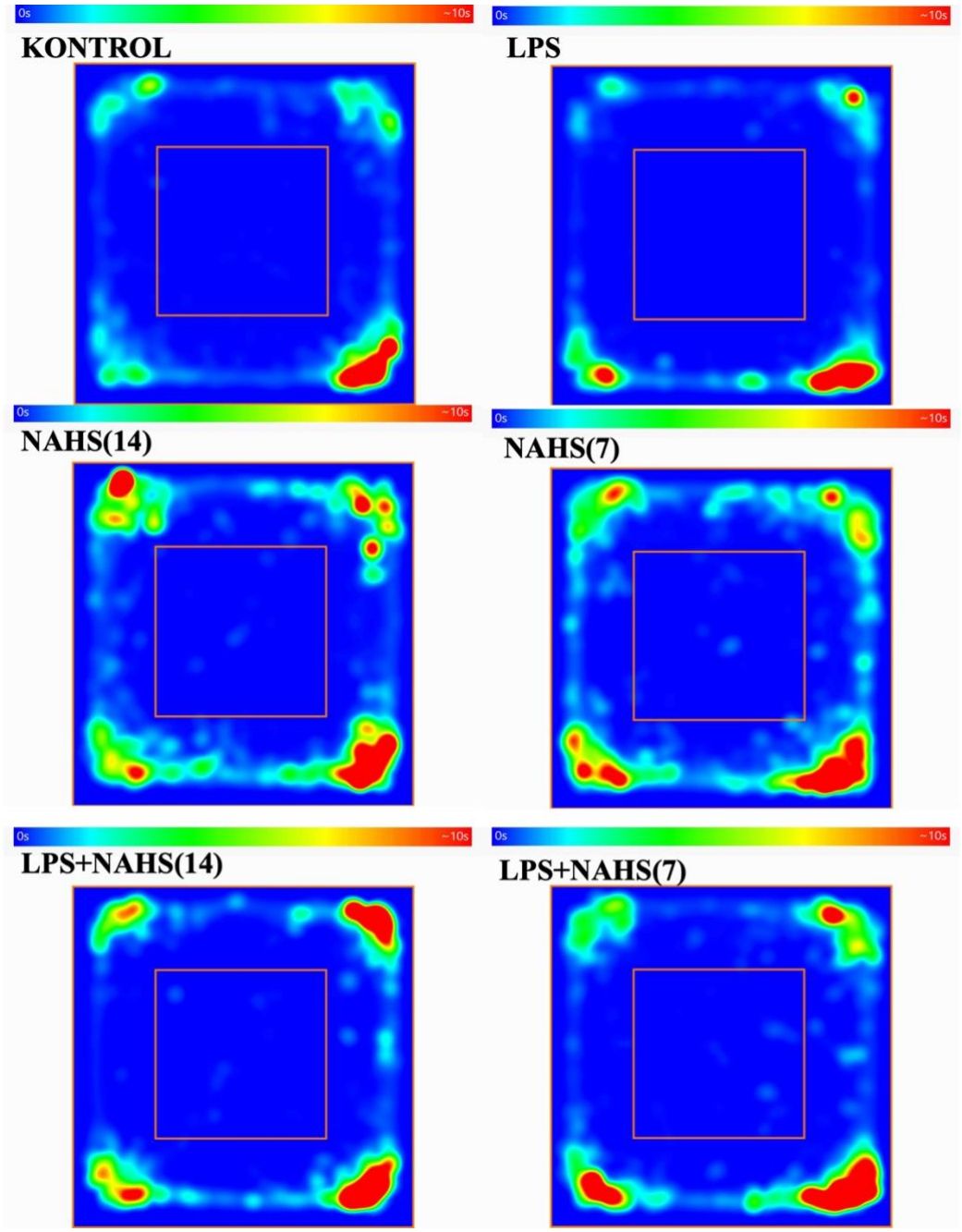
Açık alan testinde merkez kadranda katedilen toplam mesafenin, 1. hafta ve 2. hafta gruplara göre değişimi Grafik 9-A'da verilmiştir. LPS grubunda merkez kadranda katedilen toplam mesafe 2. hafta (0,1±0,05 m) 1. haftaya (0,56±0,17 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 9-A). NaHS(14) grubunda merkez kadranda katedilen toplam mesafe 2. hafta (0,18±0,07 m) 1. haftaya (0,64±0,15 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,01$, Grafik 9-A).

Açık alan testinde merkez kadranda katedilen toplam mesafenin 1. haftada gruplara göre değişimi Grafik 9-B'de verilmiştir. Açık alan testinin 1. haftasında, merkez kadranda katedilen toplam mesafede gruplar arası fark görülmemiştir.

Açık alan testinde merkez kadranda katedilen toplam mesafenin 2. haftada gruplara göre değişimi Grafik 9-C'de verilmiştir. Açık alan testinin 2. haftasında merkez kadranda katedilen toplam mesafe, LPS grubunda (0,1±0,05 m) Kontrol grubuna (0,45±0,15 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 9-C).



Grafik 9. Açık Alan Testinde Merkez Kadranda Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Açık alan testi 1. hafta ve 2. hafta merkez kadranda katedilen toplam mesafenin haftalara göre değişimi. **: p<0,01, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder. B) Açık alan testi 1. hafta merkez kadranda katedilen toplam mesafenin gruplara göre değişimi. C) Açık alan testi 2. hafta merkez kadranda katedilen toplam mesafenin gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=8-10/grup.



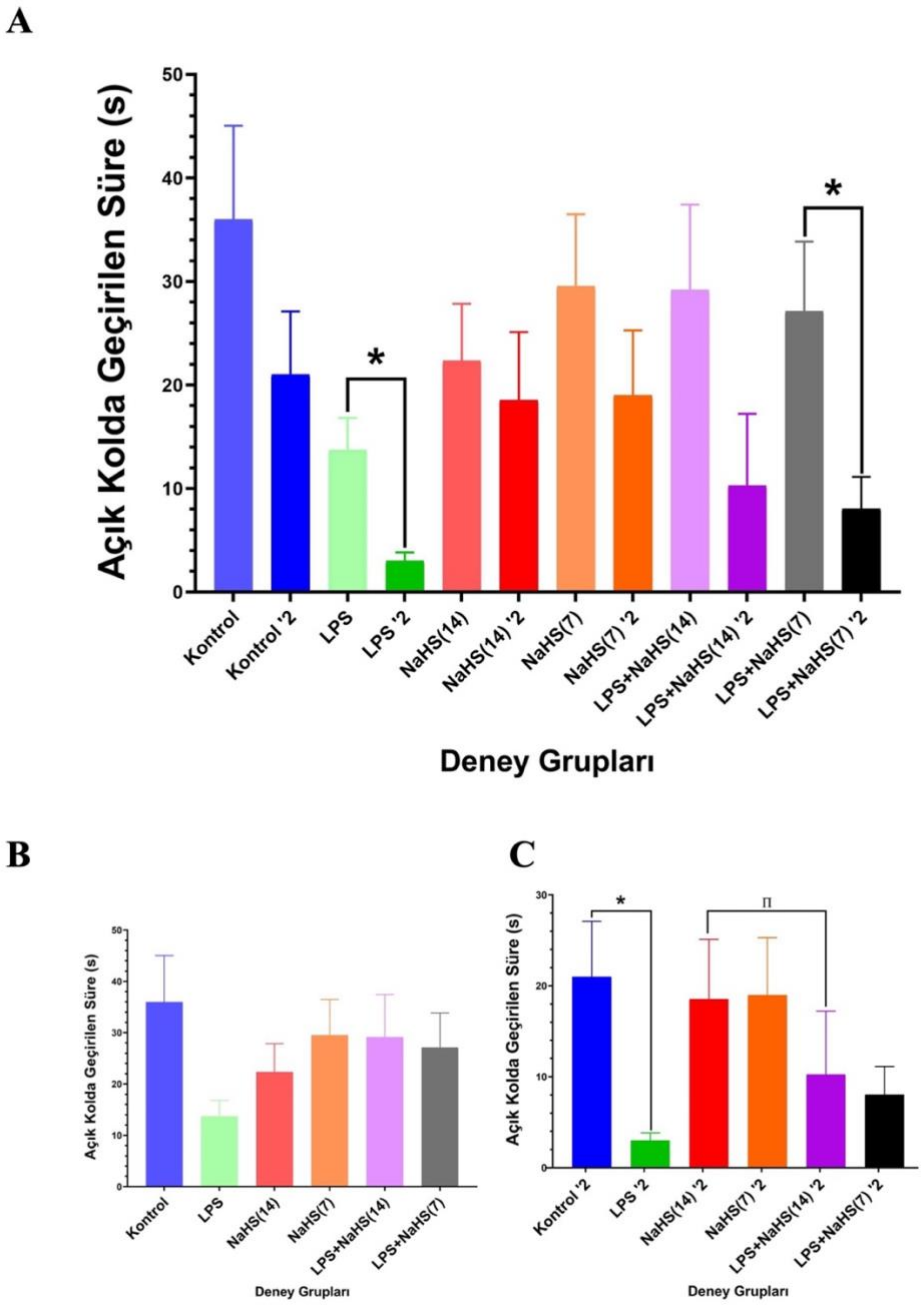
Şekil 2. Açık Alan Testi 2.Hafta Grup Ortalamalarına Göre Çizilmiş Sıcaklık Haritaları.

4.4. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları

Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürenin, 1. hafta ve 2. hafta gruplara göre değişimi Grafik 10-A'da verilmiştir. LPS grubunda açık kolda geçirilen süre 2. hafta (3,01±0,81 s) 1. haftaya (13,71±3,11 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 10-A). LPS+NaHS(7) grubunda açık kolda geçirilen süre 2. hafta (8,04±3,09 s) 1. haftaya (27,11±6,74 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$, Grafik 10-A).

Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürenin 1. haftada gruplara göre değişimi Grafik 10-B'de verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinin 1. haftasında açık kolda geçirilen sürede gruplar arasında fark görülmemiştir (Grafik 10-B).

Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürenin 2. haftada gruplara göre değişimi Grafik 10-C'de verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinin 2. haftasında, LPS grubunun (3,01±0,81 s) açık kolda geçirdiği süre Kontrol grubuna (21,01±6,09 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$ Grafik 10-C). Yükseltilmiş artı labirent testinin 2. haftasında, LPS+NaHS(14) grubunun (10,26±6,95 s) açık kolda geçirdiği süre NaHS(14) grubuna (18,54±6,58 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$ Grafik 10-C).

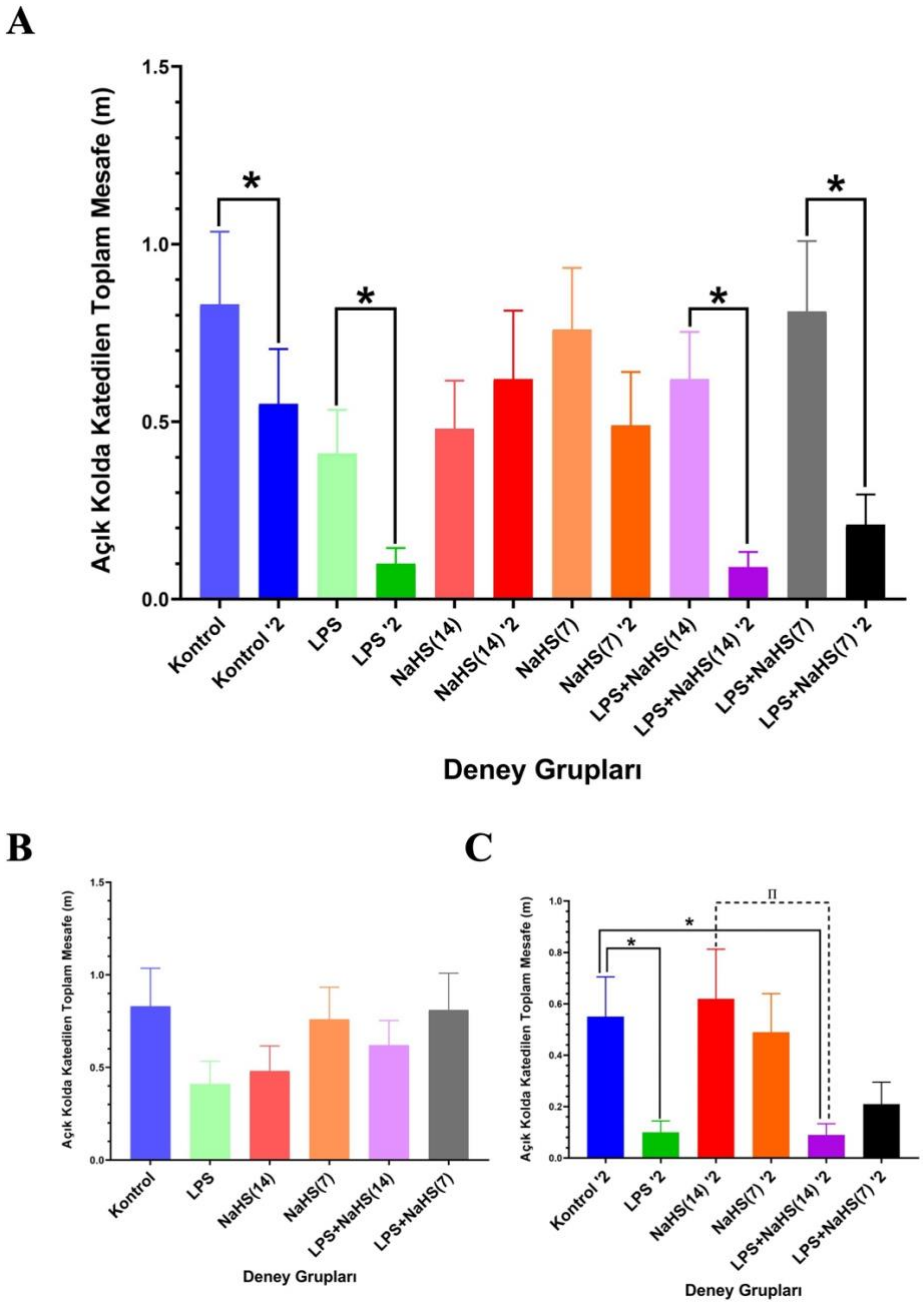


Grafik 10. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Açık Kolda Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Yükseltilmiş artı labirent testi 1. hafta ve 2. hafta açık kolda geçirilen sürenin haftalara göre değişimi. *: p<0,05, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder. B) Yükseltilmiş artı labirent testi 1. hafta açık kolda geçirilen sürenin gruplara göre değişimi. C) Yükseltilmiş artı labirent testi 2. hafta açık kolda geçirilen sürenin gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. ∏:p<0,05, NaHS(14) grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=9-10/grup.

Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda katedilen toplam mesafenin, 1. hafta ve 2. hafta gruplara göre değişimi Grafik 11-A'da verilmiştir. Kontrol grubunda açık kolda katedilen toplam mesafe 2. hafta (0,55±0,16 m) 1. haftaya (0,83±0,21 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (*p<0,05, Grafik 11-A). LPS grubunda açık kolda katedilen toplam mesafe 2. hafta (0,1±0,04 m) 1. haftaya (0,41±0,12 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (*:p<0,05, Grafik 11-A). LPS+NaHS(14) grubunda açık kolda katedilen toplam mesafe 2. hafta (0,09±0,04 m) 1. haftaya (0,62±0,13 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (*:p<0,05, Grafik 11-A). LPS+NaHS(7) grubunda açık kolda katedilen toplam mesafe 2. hafta (0,21±0,08 m) 1. haftaya (0,81±0,2 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (*:p<0,05, Grafik 11-A).

Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda katedilen toplam mesafenin 1. haftada gruplara göre değişimi Grafik 11-B'de verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinin 1. haftasında açık kolda katedilen toplam mesafede gruplar arası fark bulunmamaktadır.

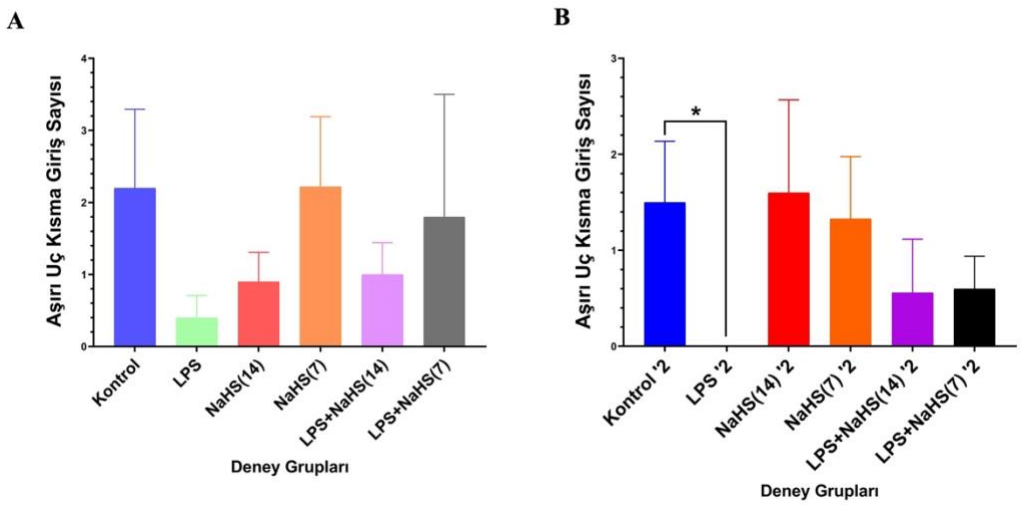
Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda katedilen toplam mesafenin 2. haftada gruplara göre değişimi Grafik 11-C'de verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinin 2. haftasında, LPS grubunda (0,1±0,04 m) ve LPS+NaHS(14) grubunda (0,09±0,04 m) açık kolda katedilen toplam mesafe Kontrol grubuna (0,55±0,16 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (p<0,05 Grafik 11-C). Yükseltilmiş artı labirent testinin 2. haftasında, LPS+NaHS(14) grubunda (0,09±0,04 m) açık kolda katedilen toplam mesafe NaHS(14) grubuna (0,62±0,19 m) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (p<0,05 Grafik 11-C).



Grafik 11. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Açık Kolda Katedilen Toplam Mesafenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Yükseltilmiş artı labirent testi 1. hafta ve 2. hafta açık kolda katedilen toplam mesafenin haftalara göre değişimi. *: p<0,05, 1. haftaya göre anlamlılığı ifade eder. B) Yükseltilmiş artı labirent testi 1. hafta açık kolda katedilen toplam mesafenin gruplara göre değişimi. C) Yükseltilmiş artı labirent testi 2. hafta açık kolda katedilen toplam mesafenin gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. ∏:p<0,05, NaHS(14) grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=9-10/grup.

Yükseltilmiş artı labirent testinin 1. haftasında, aşırı uç kısma giriş sayısının gruplara göre değişimi Grafik 12-A'da verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinin 1. haftasında aşırı uç kısma giriş sayısında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

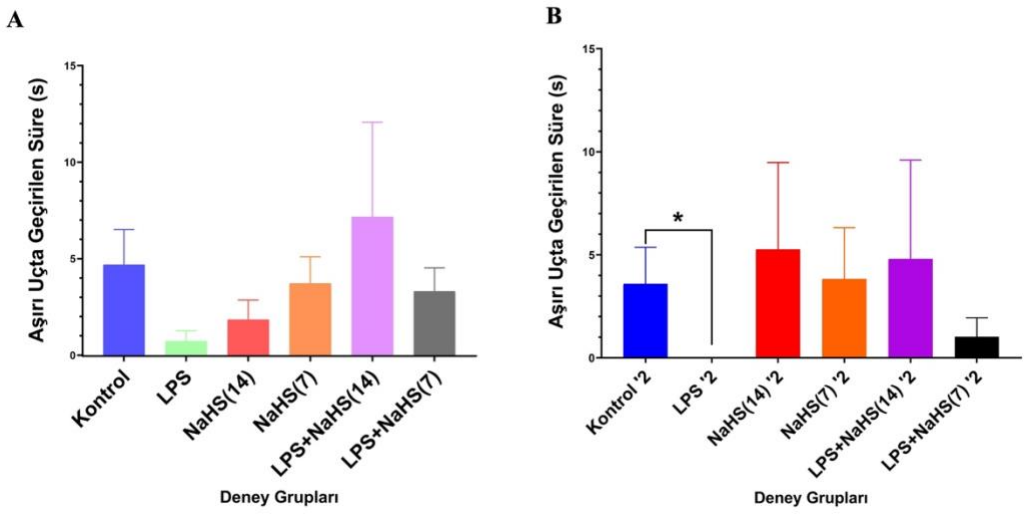
Yükseltilmiş artı labirent testinin aşırı uç kısma giriş sayısının 2. haftada gruplara göre değişimi Grafik 12-B'de verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinde aşırı uç kısma giriş sayısı 2. haftada, LPS grubunda (0±0) Kontrol grubuna (1,5±0,64) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$ Grafik 12-B). Yükseltilmiş artı labirent testinde 2. haftada diğer gruplararasında anlamlı bir fark görülmemiştir.



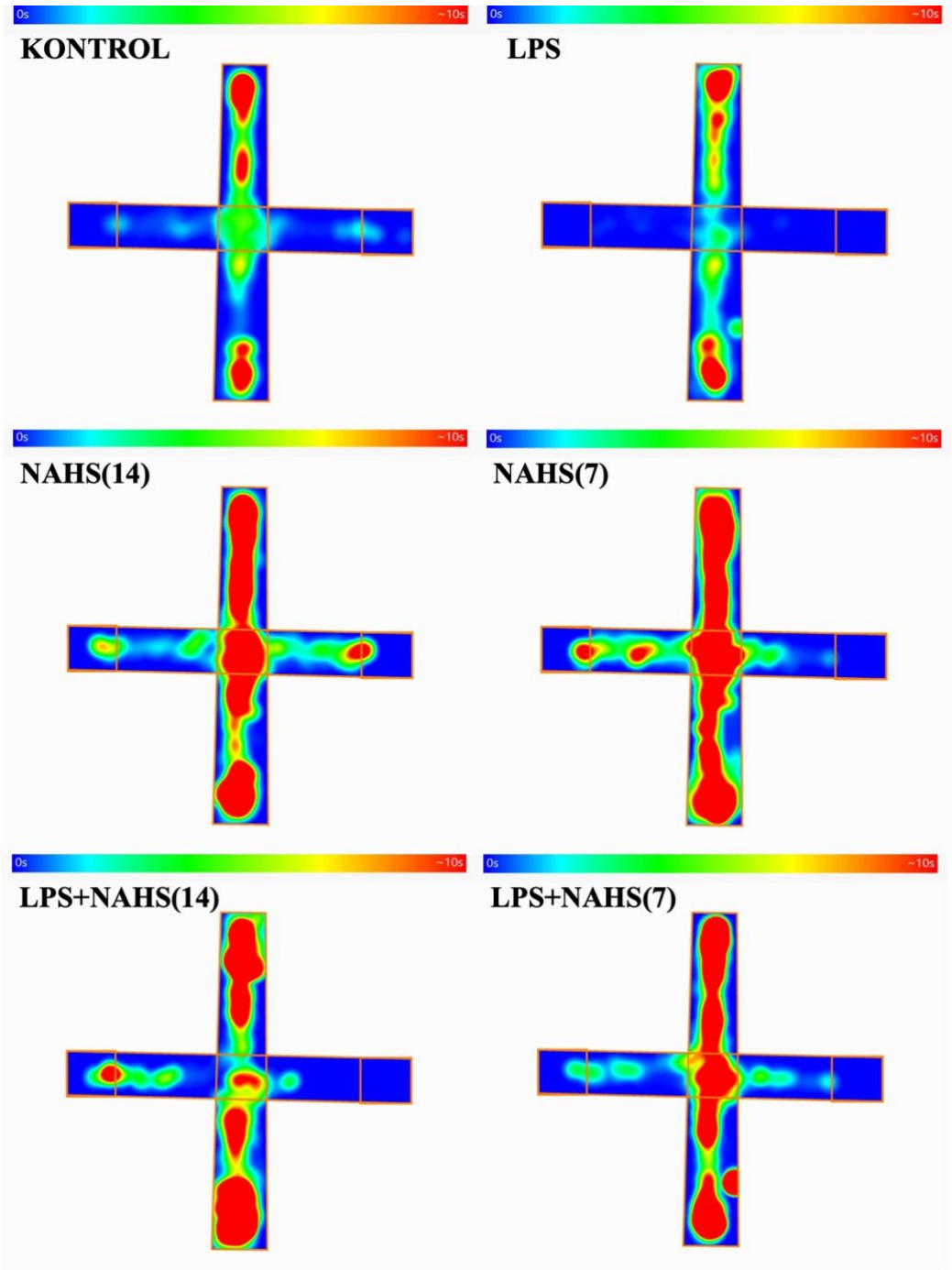
Grafik 12. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Aşırı Uç Kısma Giriş Sayısının Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Yükseltilmiş artı labirent testi 1. hafta aşırı uç kısma giriş sayısının gruplara göre değişimi. B) Yükseltilmiş artı labirent testi 2. hafta aşırı uç kısma giriş sayısının gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=9-10/grup.

Yükseltilmiş artı labirent testinin aşırı uçta geçirilen sürenin 1. haftada, gruplara göre değişimi Grafik 13-A'da verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinin aşırı uçta geçirilen sürede 1. haftada; gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Grafik 13-A).

Yükseltilmiş artı labirent testinde aşırı uçta geçirilen sürenin 2. haftada, gruplara göre değişimi Grafik 13-B'de verilmiştir. Yükseltilmiş artı labirent testinde aşırı uçta geçirilen süre 2. haftada, LPS grubunda (0±0 s) Kontrol grubuna (3,59±1,78 s) göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$ Grafik 13-B).



Grafik 13. Yükseltilmiş Artı Labirent Testinde Aşırı Uçta Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Değişimi. 1. haftada LPS gruplarına sadece saline uygulanmıştır, LPS içeren tüm gruplarda LPS uygulaması 2. hafta yapılmıştır. A) Yükseltilmiş artı labirent testi 1. hafta aşırı uçta geçirilen sürenin gruplara göre değişimi. B) Yükseltilmiş artı labirent testi 2. hafta aşırı uçta geçirilen sürenin gruplara göre değişimi. *:p<0,05, Kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade eder. '2: grupların 2. hafta verilerini temsil etmektedir. n=9-10/grup.



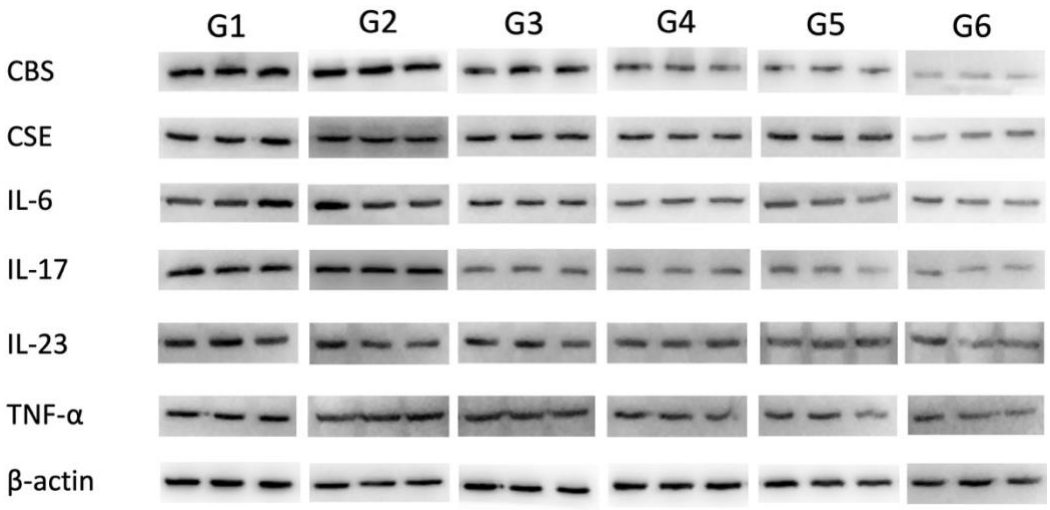
Şekil 3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi 2. Hafta Grup Ortalamalarına Göre Çizilmiş Sıcaklık Haritaları. LPS grubunda açık koldaki azalış, LPS+NaHS gruplarında açık koldaki artış dikkat çekicidir.

4.5. Western Blot Analizi Bulguları

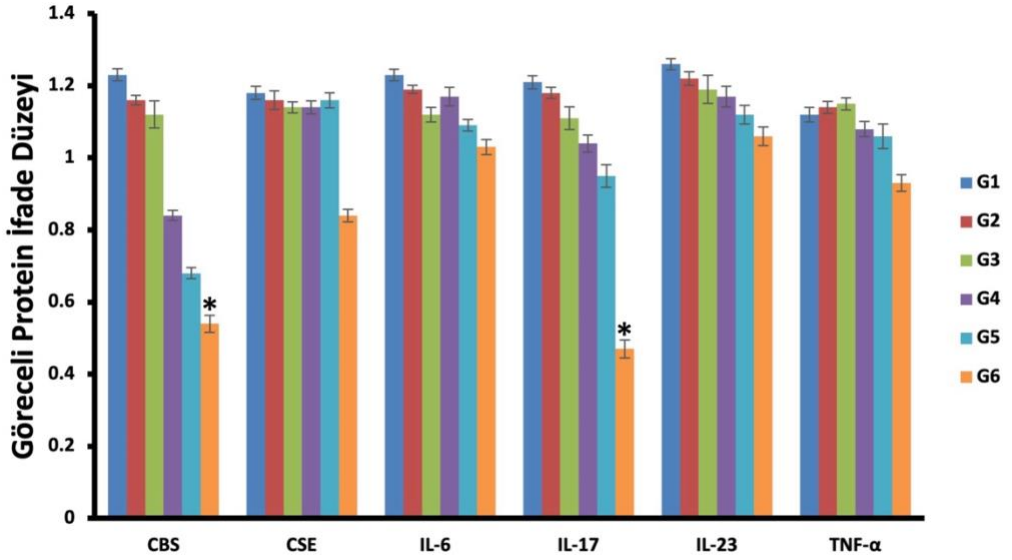
Hipokampüs dokularında CBS, CSE, IL-6, IL-17, IL-23 ve TNF-α protein ifade düzeylerinin analizi için Western blot yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4). Hipokampüs dokularındaki göreceli protein ifade düzeyleri Grafik 14'te verilmiştir.

CBS protein ifade düzeyinin LPS+NaHS(7) grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (*:$p<0.05$, Grafik 14).

IL-17 protein ifade düzeyinin LPS+NaHS(7) grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (*:$p<0.05$, Grafik 14).



Şekil 4. Hipokampüs dokularında CBS, CSE, IL-6, IL-17, IL-23 ve TNF-α Protein İfadelenme Düzeylerinin Temsili Western Blot Görüntüleri. G1: Kontrol 1; G2: LPS; G3: NaHS(14); G4: NaHS(7); G5: LPS+NaHS(14); G6: LPS+NaHS(7).



Grafik 14. Hipokampüs Dokularındaki Göreceli Protein İfade Düzeyleri. Veriler ortalama ± Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Grafikler, her grup için en az dört farklı sıçanda belirtilen proteinlerin kat değişimini temsil etmektedir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *:p<0.05. G1: Kontrol 1; G2: LPS; G3: NaHS(14); G4: NaHS(7); G5: LPS+NaHS(14); G6: LPS+NaHS(7).

5. TARTIŞMA

LPS'nin 0.25,0.5 ve 0.75 mg/kg dozlarında 7 gün uygulanmasıyla deneysel nöroinflamasyon modeli oluşturulan bir çalışmada vücut ağırlığı incelendiğinde LPS'nin deney hayvanlarının vücut ağırlıklarında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (49). NaHS'nin 12 gün boyunca 5 mg/kg uygulandığı bir çalışmada deney hayvanlarının vücut ağırlığında bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (73). Çalışmamızda deneylerin 0.,7.,10. ve 14. günlerinde yapılan vücut ağırlığı ölçümlerine göre 14 günlük deney süresi boyunca deney hayvanlarının ağırlıklarında anlamlı bir değişiklik görülmemiş olup, sonuçlarımız literatür ile uyumludur.

LPS uygulaması, nöroinflamasyon modeli oluşturmak için sıklıkla tercih edilen yöntemlerden biridir. Periferik (i.p.) ve santral (i.c.v.) olmak üzere iki farklı yöntem ile uygulanabilmektedir. İki farklı uygulama yolunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, LPS'nin i.p. uygulaması ve i.c.v. uygulamasının Morris su labirenti testinde bu iki grupta da hafızada bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (116).

LPS'nin hafıza ve öğrenme bozukluğuna neden olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi hafıza ve öğrenme üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. i.p. LPS uygulaması yapılan bir çalışmada Morris su labirenti testi alıştırma günlerinde, platformu bulmak için geçen sürede LPS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir (117). Morris su labirenti, yeni nesne tanıma ve bağlam nesnesi ayrımcılığı (context object discrimination) olmak üzere hipokampüse bağlı görevlerin incelendiği farklı davranış testleri kullanılan başka bir çalışmada; 167 µg/kg sistemik LPS

uygulamasının bağlam nesnesi ayrımcılığı testinde hafızayı bozduğu ancak Morris su labirenti ve yeni nesne tanıma testinde hafızayı etkilemediği gösterilmiştir. LPS uygulanan sıçanların, Morris su labirentindeki gizli platformu hatırlayabildiği ve yeni bir nesneyi tanıdık bir nesneden ayırt edebildiği ancak bir nesnenin farklı bir bağlamda olduğunu belirlemede başarısız oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda LPS ile indüklenen nöroinflamasyonun hipokampüs bağımlı tüm bellek görevlerini değil, bağlam ayrımcılığı gerektiren görevleri özel olarak bozabileceğini öne sürmüşlerdir (118). Çalışmamızda literatürle paralel şekilde Morris su labirenti testi alıştırma günlerinde platformu bulmak için geçen sürede ve probe testinde hedef kadranda geçirilen sürede LPS grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Sistemik LPS 500 µg/kg ve 750 µg/kg uygulanan bir çalışmada doz arttıkça hafıza bozukluğu görüldüğü saptanmıştır (116). Çalışmamızda LPS'nin düşük doz olarak kullanılmış olması nedeniyle sonuçlarımızda farklılık olabilir. LPS dozunun daha yüksek olması bellek fonksiyonu üzerindeki etkisini değiştiriyor olabilir. Bu sonuçlar, 7 gün uygulanan 250 µg/kg LPS'nin Morris su labirenti testinde gözlenen hafıza fonksiyonu üzerinde belirgin etkisi olmadığını göstermektedir.

Tekrarlanan TLR uyarılmasının IL-1 reseptör ilişkili kinaz-M (IRAK-M) indüksiyonuna yol açtığını ve bunun IRAK'nin TNF-reseptör ilişkili faktör-6 (TRAF6) ile etkileşimini durdurarak TLR sinyal yolunu negatif yönde düzenlediğini göstermişlerdir. Bu nedenle özellikle LPS'nin tekrarlanan uygulamasında LPS'ye karşı tolerans gelişebileceğinden literatürde bahsedilmektedir (46, 119). LPS'nin tek enjeksiyonunun ve tekrarlayan

enjeksiyonlarının bellek fonksiyonu üzerine olan etkisi Morris su labirenti testinde incelendiği bir çalışmada LPS'nin tekrarlanan uygulamasında LPS'ye karşı tolerans gelişebileceği tespit edilmiştir. Gruplardan birine LPS (100 µg/kg, i.p.) Morris su labirenti testinin 1. alıştırma gününde bir kez enjekte edilmiştir, başka bir gruba ise LPS (100 µg/kg, i.p.), alıştırma günlerinin tamamında her gün testten önce 1 kez enjekte edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre tek bir LPS enjeksiyonunun öğrenmeyi bozduğu, günlük uygulanan LPS enjeksiyonun ise öğrenmeyi bozmadığı gösterilmiştir (120). Nöroinflamasyonu indükleyerek hafıza bozukluğunu araştırmak için yaygın olarak tercih edilen LPS'nin çalışmamızda Morris su labirenti testinde hafızada belirgin bir bozukluğuna neden olmaması, çalışmamızda her gün uygulanan LPS enjeksiyonuna bağlı olarak tolerans gelişiminden kaynaklanıyor olabilir.

Sıçanlarda i.c.v. LPS uygulamasının neden olduğu bilişsel fonksiyon bozukluğuna NaHS'nin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, i.p. NaHS'nin tek başına uygulanmasının Morris su labirenti testinde platformu bulmak için geçen süreyi kontrol grubuna göre değiştirmediği ancak LPS ile birlikte uygulandığında LPS'nin neden olduğu bilişsel bozukluğu iyileştirdiği gösterilmiştir (93). Sıçanlar üzerinde β2-microglobulin ile bilişsel fonksiyon bozukluğu oluşturulan bir çalışmada, NaHS'nin tek başına verildiği gruplarda kontrole kıyasla değişim olmadığı ancak β2-microglobulin uygulanan gruplarda bozulmuş olan bilişsel fonksiyonların NaHS ile iyileştiği Morris su labirenti testinde gösterilmiştir (121). Sıçanlarda i.p. streptozotosin ile oluşturulan diyabet modelinde bilişsel fonksiyonların Morris su labirenti testinde değerlendirildiği

çalışmalarda, NaHS'nin tek uygulandığı grup ile kontrol grubu arasında bir fark olmadığı ancak diyabetik sıçanlarda streptozotosin ile bozulan hafızayı NaHS'nin iyileştirdiği gösterilmiştir (122, 123). Bu sonuçlar beraber ele alındığında NaHS'nin tek başına hafıza üzerine bir etkisi olmadığı ancak hafızada bozukluğuna neden olan LPS, β2-microglobulin, streptozotosin gibi ajanlarla beraber uygulandığında bu ajanların neden olduğu hafıza bozukluğunu iyileştirdiği dikkat çekmektedir. Çalışmamız NaHS'nin tek başına uygulanmasının Morris su labirenti testinde değerlendirilen hafıza üzerine belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda Morris su labirenti testinde NaHS(14) grubunda alıştırma günlerinde platformu bulma süresi, NaHS uygulanan 3. günde kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Morris su labirenti testinin diğer günlerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Literatürdeki başka bir çalışmada Morris su labirenti testinde 3 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarında uygulanan NaHS'nin alıştırma günlerinde platformu bulmak için geçen süreyi kontrole göre değiştirmediği gösterilmiştir. Ayrıca probe testinde hedef kadranda geçirilen süreyi kontrol grubuna kıyasla azalttığı gösterilmiştir. NaHS uygulamasının hafıza üzerindeki bu olumsuz etkisi, bahsedilen çalışmada NaHS'nin neden olduğu fazla miktarda ROS eliminasyonu ile ilişkilendirilmiştir (98). ROS'nin artmış üretimi hücre fizyolojisini bozsa da fizyolojik miktarda bulunmasının hücre sinyalizasyonu için önemli olduğundan literatürde bahsedilmektedir. ROS'nin fazla miktarda eliminasyonunun hafıza üzerine olumsuz etkisi, hücre

sinyalizasyonunun öğrenme ve hafıza süreçlerinde önemli rolünün etkilenmesinden kaynaklanıyor olabileceği ile açıklanmıştır (124).

Yetişkin, orta yaşlı ve yaşlı farelerde i.p. 200 μg/kg LPS'nin davranışsal etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, LPS uygulamasının yetişkin ve orta yaşlı farelerde açık alan testinde lokomotor aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir (125). Sıçanlarda farklı dozlardaki (1, 5, 15, 50, 125, ve 250 μg/kg) i.p. LPS enjeksiyonlarının davranış üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 1 μg/kg hariç test edilen tüm dozlarda LPS'nin lokomotor aktiviteyi bozduğu gösterilmiştir (126). Sıçanlarda H_2S donörü Na_2S'nin farklı dozları (4,8 ve 12 mg/kg) uygulanarak lokomotor aktivitenin değerlendirildiği bir çalışmada, H_2S'nin açık alan testinde lokomotor aktiviteyi değiştirmediği gösterilmiştir (127). Salin ve NaHS'nin lateral ventriküle i.c.v. uygulamasının ardından sıçanların iki gruba ayrıldığı ve bir gruba i.p. saline diğer gruba ise i.p. LPS uygulanarak etkilerinin açık alan testinde değerlendirildiği bir çalışmada; LPS'nin lokomotor aktiviteyi azalttığı, LPS'nin azalttığı lokomotor aktivite üzerine NaHS'nin bir etkisinin olmadığı ve NaHS'nin tek başına da lokomotor aktivite üzerine bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (128). Çalışmamızda lokomotor aktivitenin değerlendirildiği katedilen toplam mesafe, ortalama hız ve toplam hareketli zaman parametreleri LPS uygulanan gruplarda anlamlı şekilde azalmıştır. Bu bulgu LPS'nin lokomotor aktiviteyi azalttığını göstermektedir. LPS+NaHS tedavisi uygulanan gruplarda da lokomotor aktivitede azalma olması NaHS'nin lokomotor aktivitede azalma üzerine düzeltici bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Ayrıca tek başına NaHS uygulamasının lokomotor aktivite

üzerine bir etkisi olmadığı da görülmektedir. Kontrol ve LPS grubu karşılaştırması yapıldığında, LPS grubunda LPS uygulanmadan önce 1. hafta verileri değerlendirildiğinde katedilen toplam mesafe, ortalama hız ve toplam hareketli zaman parametreleri açısından LPS grubu kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksektir. LPS uygulamasının yapıldığı 2. hafta verilerine bakıldığında LPS grubunun verileri kontrol grubuna göre anlamlı fark olmasa da azalmıştır. Bu bulgu da lokomotor aktiviteyi LPS'nin azalttığını desteklemektedir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde literatür ile benzer şekilde LPS'nin lokomotor aktiviteyi azalttığı ve NaHS'nin bu azalma üzerine düzeltici bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

Farelerde i.p. LPS uygulanarak yapılan çalışmalarda LPS gruplarında kontrol gruplarına kıyasla açık alan testinde merkez kadranda geçirilen sürenin azaldığı ve yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürenin azaldığı, bu nedenle LPS uygulamasının anksiyete benzeri davranışlara neden olduğu gösterilmiştir (9, 129). 7-8 haftalık sıçanlara i.p. yol ile LPS'nin farklı dozları (10-50-100-200 ve 500 µg/kg) uygulanan bir çalışmada, yükseltilmiş artı labirent testinde LPS'nin dozu arttıkça açık alana giriş sayısı ve açık alanda geçirilen sürenin azaldığı görülmüş ancak bu azalış sadece 500 µg/kg dozunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu nedenle LPS'nin neden olduğu anksiyete benzeri davranışların ortaya çıkışında doza bağlı bir artış olduğu öne sürülmüştür (130). Çalışmamızda açık alan testinde LPS uygulanan grubun; merkez kadranda geçirdiği süre ve merkez kadranda katettiği toplam mesafe, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Yükseltilmiş artı labirent testinde ise LPS

uygulanan grubun; açık kolda geçirdiği süre, açık kolda katettiği toplam mesafe, aşırı uç kısma giriş sayısı ve aşırı uç kısımda geçirdiği süre; kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. LPS, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi olmak üzere iki farklı davranış testinde de deney hayvanlarında literatür ile benzer şekilde anksiyete benzeri davranışlara neden olmuştur.

Farelerde i.p. LPS ile indüklenen nöroinflamasyon ile ilişkili davranış değişiklikleri üzerine i.p. NaHS'nin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada sadece NaHS uygulanan gruplarda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen sürenin değişmediği gösterilmiştir (73). Çalışmamızda yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürede NaHS uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. H_2S donörü Na_2S'nin i.p. yüksek dozda 12mg/kg kronik (sekiz gün boyunca) uygulamasının değerlendirildiği bir çalışmada, Na_2S'nin açık kollarda harcanan zamanda bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ancak 4 mg/kg ve 8 mg/kg dozlarda uygulandığı gruplarda kontrole kıyasla anlamlı bir fark görülmemiştir (127). Benzer şekilde, çalışmamızda tek başına uygulanan NaHS'nin anksiyete benzeri davranışı azaltıcı yönde bir etkisi bulunmamaktadır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada i.p. NaHS uygulamasının yüksek yağlı diyet tüketiminin neden olduğu anksiyete benzeri davranışları azalttığı gösterilmiştir (98). Farelerde streptozotosin ile diyabet modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada, diyabetik farelere i.p. NaHS uygulandığında açık alan testinde merkez kadranda daha fazla vakit geçirdikleri bulunmuştur, dolayısıyla NaHS'nin streptozotosinin neden olduğu anksiyete benzeri davranışları azalttığı gösterilmiştir (131). Bu nedenle streptozotosin

uygulaması, yüksek yağlı diyet gibi anksiyete benzeri davranışlara neden olan modeller oluşturulduktan sonra tedavi için NaHS uygulandığı zaman H_2S'nin anksiyeteyi önleyici bir etkisi olduğu dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda 2. hafta anksiyete parametreleri olan açık alan testinde merkez kadranda geçirilen süre, merkez kadranda katedilen toplam mesafe; yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen süre, açık kolda katedilen mesafe, aşırı uç kısma giriş sayısı ve aşırı uçta geçirilen süre LPS grubunda kontrole kıyasla azalmıştır. LPS ve NaHS'nin beraber uygulandığı gruplarda ise açık kolda katedilen mesafe harici diğer tüm anksiyete parametreleri açısından kontrol grubuyla aralarında fark bulunmamaktadır. Bu bulgular NaHS uygulamasının, LPS'nin neden olduğu anksiyete benzeri semptomları azaltabildiğini göstermektedir.

Nörodejenerasyon modeli oluşturmak için 0.25 mg/kg LPS'nin yaşlı farelere i.p. yol ile 9 gün boyunca uygulandığı bir çalışmada, LPS grubunda hipokampüste TNF-α mRNA düzeyinin arttığı gösterilmiştir (132). Sıçanlarda i.c.v. LPS uygulanarak yapılan başka bir çalışmada, IL-6'nın LPS uygulaması ile beyinde up-regüle edildiği gösterilmiştir (133). Yenidoğan sıçanlarda i.p. 1 mg/kg LPS'nin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, hipokampüste IL-6 ve TNF-α ifadelenme düzeylerinin LPS uygulamasından sonra 1., 2. ve 3. günde kontrollerle karşılaştırıldığında belirgin şekilde up-regüle edildiği gösterilmiştir (134). Çalışmamızda LPS uygulamasından sonra hipokampüste TNF-α ve IL-6 ifadelenme düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim görülmemiştir. Bu durum literatürde insan monositlerinin LPS ile aktive edildiği

bir çalışmada, LPS ile aktive edilmiş hücreler tarafından aktivasyondan 7 saat sonra yüksek seviyelerde üretilen anti-inflamatuvar sitokin IL-10 üretimi ile açıklanmıştır (135). TNF-α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretiminin azalmasında IL-10'un aktif rol oynadığı bilinmektedir (136).

Literatürde H_2S'nin inflamasyondaki rolü tartışmalıdır ve hem proinflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etkileri gösterilmiştir. Bir çalışmada hızlı salımlı H_2S donörü NaHS ve yavaş salımlı H_2S donörü olan GYY4137'nin, LPS uygulanan RAW264.7 makrofajlarında proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. GYY4137'nin, LPS ile indüklenen IL-6 ve TNF-α salıverilmesini konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. NaHS'nin proinflamatuvar mediyatörler üzerinde bifazik bir etki gösterdiği ve yüksek konsantrasyonlarda IL-6 ve TNF-α sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, H_2S'nin inflamatuvar süreç üzerindeki etkilerinin yalnızca H_2S konsantrasyonuna değil aynı zamanda H_2S donörlerinin salıverilme hızına da bağlı olduğu öne sürülmüştür (137).

Sıçanlarda i.c.v. LPS uygulamasının neden olduğu bilişsel bozukluğa i.p. 5 mg/kg NaHS uygulamasının etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, tek başına NaHS uygulamasının kontrol grubuna kıyasla hipokampüste TNF-α ifadelenme düzeyini değiştirmediği görülmüştür. LPS uygulaması TNF-α ifadelenmesini yükseltirken; LPS ile beraber NaHS uygulaması LPS'nin neden olduğu bu yükselişi düşürmüştür (93). Farelere i.p. 0.25 mg/kg LPS'nin 7 gün boyunca uygulandığı bir çalışmada LPS'nin beyinde TNF- α ve IL-6 aktivitesini kontrol grubuna göre arttırdığı gösterilmiştir. LPS ile beraber NaHS'nin farklı dozları

uygulandığında ise NaHS'nin 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarında TNF- α ve IL-6 seviyelerini düşürdüğü ancak 2.5 mg/kg dozunda bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (104). Farelerde i.p. 1 mg/kg LPS kaynaklı anksiyete benzeri davranış ve hipokampüsteki protein ifadelenme düzeylerindeki değişimler üzerine H_2S donörü GYY4137'nin etkisinin incelendiği bir çalışmada, LPS uygulanan farelerin hipokampüsünde IL-6 ifadelenme düzeyinin arttığı gösterilmiştir. LPS+ GYY4137 grubunda ise IL-6 ifadelenme düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (138). Çalışmamızda 5 mg/kg NaHS'nin tek başına uygulandığı gruplarda hipokampüste IL-6 ve TNF-α ifadelenme düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark bulunmamıştır. LPS+NaHS gruplarında IL-6 ve TNF-α ifadelenme düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Farelerde i.p. 1 mg/kg LPS kaynaklı hipokampüsteki protein ifadelenme düzeylerindeki değişimler üzerine H_2S donörü GYY4137'nin etkisinin incelendiği bir çalışmada, hipokampüsteki CBS ve CSE protein ifadelenme düzeylerinin LPS uygulamasının ardından azaldığı gösterilmiştir. Tek başına GYY4137 uygulaması ise CBS ve CSE protein ifadelenme düzeylerini hipokampüs dokusunda değiştirmemiştir. LPS+GYY4137 uygulamasında ise CBS ve CSE protein ifadelenme düzeyinde kontrole göre anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (138). MAC-T (süt bezi epitel) hücreleri üzerinde yapılan bir *in vitro* çalışmada, LPS'nin CBS ve CSE ifadelenme düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir. NaHS düşük veya yüksek dozlarda tek başına uygulandığı zaman ise her iki dozda da CBS ve CSE mRNA ve protein ifadelenme düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir. LPS ile

beraber düşük veya yüksek NaHS uygulanan grupta, LPS grubuna kıyasla CBS ve CSE mRNA ve protein ifadelenme düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak NaHS uygulamasının LPS aracılığıyla CBS ve CSE sentezinin inhibisyonunu modüle ettiği öne sürülmüştür. Ayrıca H_2S'nin düşük konsantrasyonlarda LPS tarafından indüklenen inflamasyonu hafiflettiğini ancak yüksek konsantrasyonlarda H_2S'nin pro-inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu artırarak apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu durum H_2S'nin, inflamatuvar süreçleri hem azaltıcı hem de artırıcı yönde etkileyebilecek potansiyele sahip olduğu ve bu etkilerin doza bağımlı olabileceği ve ayrıca ortam ve koşullara göre farklılık gösterebileceği ile açıklanmıştır (139).

IL-17, çeşitli hücreler tarafından üretilen bir proinflamatuvar sitokindir. Bu hücreler arasında CD4 T hücreleri de bulunmaktadır. CD4 T hücreleri, Th17 hücreleri olarak adlandırılan yeni bir alt grupta sınıflandırılmaktadır. IL-17 spesifik reseptörü olan IL-17R, hipokampüsün CA1 bölgesinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (140, 141). Diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada diyabetik farelerde artmış olan IL-23 ve IL-17 seviyelerini NaHS tedavisinin düşürdüğü gösterilmiştir (142). Amiloid beta (Aβ) kaynaklı sinaptik disfonksiyon ve bilişsel bozukluklarda IL-17'nin patolojideki rolüne değinilen bir çalışmada, Aβ'nin IL-17 aracılığıyla nöronlara zarar verebileceğini ve IL-17 inhibisyonunun Aβ kaynaklı nörotoksisiteyi TRAF6/NF-κB yolağını down-regüle ederek geri çevirebileceğini göstermişlerdir (143). Literatürdeki çalışmalar IL-17'yi hedef alan tedavi stratejilerinin ilişkili hastalıkların önlenmesindeki önemine dikkat çekmektedir. Bu anlamda NaHS'nin LPS ile uygulandığı gruptaki IL-17 üzerine olan azaltıcı

etkisi nöronal hasardan koruma yönünde olabilir. Çalışmamızda hipokampüsteki IL-17 ifade düzeyi LPS+NaHS(7) grubunda kontrol grubuna göre azalmıştır. Sadece NaHS uygulanan gruplarda ise kontrole göre bir miktar azalmıştır ancak bu azalış anlamlı bulunmamıştır. IL-17 ifade düzeyi üzerine NaHS'nin tek başına anlamlı bir etkisi olmazken, LPS ile aynı anda uygulandığında IL-17 ifadelenme düzeyinde düşüşüne neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda IL-23 ifadelenme düzeyi gruplar arasında değişmemiştir.

Tüm sonuçlar beraber ele alındığında i.p. 250 µg/kg LPS'nin 7 gün boyunca uygulanmasının deney hayvanlarında Morris su labirenti testinde değerlendirilen uzamsal hafıza üzerine belirgin bir etkisi olmadığı, lokomotor aktiviteyi azalttığı ve anksiyete benzeri davranışlara neden olduğu gösterilmiştir. LPS uygulaması öncesi ve LPS ile eşzamanlı 5 mg/kg NaHS uygulamasının Morris su labirenti testinde değerlendirilen uzamsal hafıza üzerine belirgin bir etkisi olmadığı, lokomotor aktivite üzerine bir etkisi olmadığı ancak anksiyeteyi engelleyici bir etkisinin olduğu gösterilmiştir. NaHS'nin lokomotor aktivite üzerine bir etkisinin olmaması, NaHS'nin anksiyete parametreleri üzerine olan etkisinin motor hareketlerdeki farklılıktan değil direkt olarak deney hayvanlarının anksiyete durumundan kaynaklanabileceğini destekler niteliktedir. Ancak bu etkilerin kanıtlanması ve H_2S tedavisinin LPS kaynaklı nöroinflamasyon üzerindeki etkisini daha ayrıntılı olarak değerlendirmek için; açık alan testinde değerlendirilen lokomotor aktivite için ek olarak Rotarod testi uygulamasına,

literatürde yer alan yavaş salımlı H_2S donörleri kullanılmasına ve histopatolojik görüntüleme yöntemlerinin kullanıldığı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

1. LPS uygulamasının sıçanlarda Morris su labirenti testinde değerlendirilen hafıza fonksiyonu üzerine anlamlı bir etkisi olmamıştır, lokomotor aktiviteyi azaltmıştır ve anksiyete benzeri davranışları arttırmıştır.
2. NaHS'nin tek başına uygulanmasının Morris su labirenti testinde değerlendirilen hafıza fonksiyonu üzerine anlamlı bir etkisi olmamıştır, lokomotor aktiviteyi değiştirmemiştir ve anksiyete benzeri davranışlara neden olmamıştır.
3. LPS ve NaHS'nin beraber uygulanmasının Morris su labirenti testinde değerlendirilen hafıza fonksiyonu üzerine anlamlı bir etkisi olmamıştır, lokomotor aktiviteyi değiştirmemiştir, ancak LPS'nin neden olduğu anksiyete benzeri davranışları azaltmıştır.
4. NaHS ve LPS beraber uygulandığında sıçan hipokampüs dokusunda IL-17 ifadelenme düzeyi azalmıştır. 14 gün uygulanan NaHS'ye kıyasla 7 gün uygulanan NaHS'nin IL-17 seviyesini anlamlı bir miktarda düşürmesi, LPS ile aynı anda NaHS uygulamasının profilaktik NaHS uygulamasından daha etkili olduğuna işaret ediyor olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Tamura Y, Yamato M, Kataoka Y. Animal Models for Neuroinflammation and Potential Treatment Methods. Front Neurol. 2022;13:890217.
2. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. Nat Rev Immunol. 2014;14(7):463-77.
3. Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. Prog Neurobiol. 2005;76(2):77-98.
4. Han T, Xu Y, Sun L, Hashimoto M, Wei J. Microglial response to aging and neuroinflammation in the development of neurodegenerative diseases. Neural Regen Res. 2024;19(6):1241-8.
5. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017;35:441-68.
6. Hamilton JA. GM-CSF in inflammation. Journal of Experimental Medicine. 2019;217(1).
7. Khan AW, Farooq M, Hwang MJ, Haseeb M, Choi S. Autoimmune Neuroinflammatory Diseases: Role of Interleukins. Int J Mol Sci. 2023;24(9).
8. Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:3.
9. Sulakhiya K, Keshavlal GP, Bezbaruah BB, Dwivedi S, Gurjar SS, Munde N, et al. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. Neurosci Lett. 2016;611:106-11.
10. Ohanian SH, Schwab JH. Persistence of group a streptococcal cell walls related to chronic inflammation of rabbit dermal connective tissue. J Exp Med. 1967;125(6):1137-48.
11. Anaeigoudari A, Soukhtanloo M, Reisi P, Beheshti F, Hosseini M. Inducible nitric oxide inhibitor aminoguanidine, ameliorates deleterious effects of lipopolysaccharide on memory and long term potentiation in rat. Life Sci. 2016;158:22-30.

12. Li J, Csakai A, Jin J, Zhang F, Yin H. Therapeutic Developments Targeting Toll-like Receptor-4-Mediated Neuroinflammation. ChemMedChem. 2016;11(2):154-65.
13. Chen S, Saeed A, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2023;8(1):207.
14. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci. 1996;16(3):1066-71.
15. Nagpure BV, Bian JS. Brain, Learning, and Memory: Role of H2S in Neurodegenerative Diseases. Handb Exp Pharmacol. 2015;230:193-215.
16. He JT, Li H, Yang L, Mao CY. Role of hydrogen sulfide in cognitive deficits: Evidences and mechanisms. Eur J Pharmacol. 2019;849:146-53.
17. Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. 2002;420(6917):846-52.
18. Giri PM, Banerjee A, Ghosal A, Layek B. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders: Current Knowledge and Therapeutic Implications. Int J Mol Sci. 2024;25(7).
19. Busche MA, Konnerth A. Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2016;371(1700).
20. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 2018;9(6):7204-18.
21. Kwon HS, Koh S-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. Translational Neurodegeneration. 2020;9(1):42.
22. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-κB Signaling Pathway. Kidney Blood Press Res. 2016;41(6):901-10.
23. Sun J, Zhang S, Zhang X, Zhang X, Dong H, Qian Y. IL-17A is implicated in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in aged rats via microglial activation. J Neuroinflammation. 2015;12:165.

24. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. Exp Neurol. 2007;208(1):1-25.
25. Gąssowska-Dobrowolska M, Chlubek M, Kolasa A, Tomasiak P, Korbecki J, Skowrońska K, et al. Microglia and Astroglia-The Potential Role in Neuroinflammation Induced by Pre- and Neonatal Exposure to Lead (Pb). Int J Mol Sci. 2023;24(12).
26. Campbell IL, Erta M, Lim SL, Frausto R, May U, Rose-John S, et al. Trans-signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of interleukin-6 in the brain. J Neurosci. 2014;34(7):2503-13.
27. Xu XJ, Ge QQ, Yang MS, Zhuang Y, Zhang B, Dong JQ, et al. Neutrophil-derived interleukin-17A participates in neuroinflammation induced by traumatic brain injury. Neural Regen Res. 2023;18(5):1046-51.
28. Touil T, Fitzgerald D, Zhang GX, Rostami AM, Gran B. Pathophysiology of interleukin-23 in experimental autoimmune encephalomyelitis. Drug News Perspect. 2006;19(2):77-83.
29. Konsman JP. Cytokines in the Brain and Neuroinflammation: We Didn't Starve the Fire! Pharmaceuticals (Basel). 2022;15(2).
30. Brown GC, Heneka MT. The endotoxin hypothesis of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2024;19(1):30.
31. Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. J Neuroinflammation. 2019;16(1):180.
32. Chae JH, Miller BJ. Beyond Urinary Tract Infections (UTIs) and Delirium: A Systematic Review of UTIs and Neuropsychiatric Disorders. J Psychiatr Pract. 2015;21(6):402-11.
33. Tate JA, Snitz BE, Alvarez KA, Nahin RL, Weissfeld LA, Lopez O, et al. Infection hospitalization increases risk of dementia in the elderly. Crit Care Med. 2014;42(5):1037-46.
34. Fu Y, Xu X, Zhang Y, Yue P, Fan Y, Liu M, et al. Oral Porphyromonas gingivalis Infections Increase the Risk of Alzheimer's Disease: A Review. Oral Health Prev Dent. 2023;21:7-16.

35. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. BMC Gastroenterol. 2014;14:189.

36. Brenchley JM, Douek DC. Microbial translocation across the GI tract. Annu Rev Immunol. 2012;30:149-73.

37. Lamptey RNL, Chaulagain B, Trivedi R, Gothwal A, Layek B, Singh J. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. Int J Mol Sci. 2022;23(3).

38. Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. N Engl J Med. 1999;340(25):1970-80.

39. Feigin VL, Vos T, Nichols E, Owolabi MO, Carroll WM, Dichgans M, et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. Lancet Neurol. 2020;19(3):255-65.

40. Adamu A, Li S, Gao F, Xue G. The role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases: current understanding and future therapeutic targets. Frontiers in Aging Neuroscience. 2024;16.

41. Pasko VI, Churkina AS, Shakhov AS, Kotlobay AA, Alieva IB. Modeling of Neurodegenerative Diseases: ‘Step by Step’ and ‘Network’ Organization of the Complexes of Model Systems. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(1):604.

42. Perry VH. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. Acta Neuropathol. 2010;120(3):277-86.

43. Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. Nat Rev Neurol. 2013;9(1):25-34.

44. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nat Rev Neurosci. 2007;8(1):57-69.

45. Town T, Jeng D, Alexopoulou L, Tan J, Flavell RA. Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. J Immunol. 2006;176(6):3804-12.

46. Zakaria R, Wan Yaacob WM, Othman Z, Long I, Ahmad AH, Al-Rahbi B. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's disease. Physiol Res. 2017;66(4):553-65.

47. Nazem A, Sankowski R, Bacher M, Al-Abed Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2015;12:74.

48. Moore AH, Wu M, Shaftel SS, Graham KA, O'Banion MK. Sustained expression of interleukin-1beta in mouse hippocampus impairs spatial memory. Neuroscience. 2009;164(4):1484-95.

49. Alzahrani NA, Bahaidrah KA, Mansouri RA, Alsufiani HM, Alghamdi BS. Investigation of the optimal dose for experimental lipopolysaccharide-induced recognition memory impairment: behavioral and histological studies. JIN. 2022;21(2).

50. Evaluation IfHMa. GBD Results Tool. In: Global Health Data Exchange: GBD Results Tool. In: Global Health Data Exchange [website]. ; 2019 [Available from: https://vizhub.healthdata.org/gbd-results?params=gbd-api-2019-permalink/716f37e05d94046d6a06c1194a8eb0c9.

51. Javaid SF, Hashim IJ, Hashim MJ, Stip E, Samad MA, Ahbabi AA. Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations. Middle East Current Psychiatry. 2023;30(1):44.

52. Zhao H, Zhou M, Liu Y, Jiang J, Wang Y. Recent advances in anxiety disorders: Focus on animal models and pathological mechanisms. Animal Model Exp Med. 2023;6(6):559-72.

53. Khurana K, Bansal N. Lacidipine attenuates caffeine-induced anxiety-like symptoms in mice: Role of calcium-induced oxido-nitrosative stress. Pharmacol Rep. 2019;71(6):1264-72.

54. Li M, Li C, Yu H, Cai X, Shen X, Sun X, et al. Lentivirus-mediated interleukin-1β (IL-1β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. J Neuroinflammation. 2017;14(1):190.

55. Jang HM, Lee KE, Lee HJ, Kim DH. Immobilization stress-induced Escherichia coli causes anxiety by inducing NF-κB activation through gut microbiota disturbance. Sci Rep. 2018;8(1):13897.

56. Jangra A, Lukhi MM, Sulakhiya K, Baruah CC, Lahkar M. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. Eur J Pharmacol. 2014;740:337-45.

57. Babaei F, Mirzababaei M, Mohammadi G, Dargahi L, Nassiri-Asl M. Saccharomyces boulardii attenuates lipopolysaccharide-induced anxiety-like behaviors in rats. Neurosci Lett. 2022;778:136600.

58. Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: Classical strategies and new directions. Annals of Medicine. 2010;42(4):252-64.

59. Cryan JF, Slattery DA. Animal models of mood disorders: Recent developments. Curr Opin Psychiatry. 2007;20(1):1-7.

60. Becker M, Pinhasov A, Ornoy A. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? Diagnostics (Basel). 2021;11(1).

61. Jarrard LE, Okaichi H, Steward O, Goldschmidt RB. On the role of hippocampal connections in the performance of place and cue tasks: comparisons with damage to hippocampus. Behav Neurosci. 1984;98(6):946-54.

62. Kesner RP, Evans RB, Hunt MA. Further evidence in support of the neurobiological bases of an attribute model of memory: role of the hippocampus. Int J Neurol. 1987;21-22:184-96.

63. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Brain Res Rev. 2001;36(1):60-90.

64. Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. Learning and Motivation. 1981;12(2):239-60.

65. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 1984;11(1):47-60.

66. Nunez J. Morris Water Maze Experiment. J Vis Exp. 2008(19).

67. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc. 2006;1(2):848-58.

68. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. Journal of Comparative Psychology. 1934;18:385-403.
69. Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. J Vis Exp. 2014(91):51785.
70. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. J Vis Exp. 2015(96):e52434.
71. Sarkar D. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. Clin Psychopharmacol Neurosci. 2020;18(3):341-51.
72. Zhu X, Liu J, Chen S, Xue J, Huang S, Wang Y, et al. Isoliquiritigenin attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment through antioxidant and anti-inflammatory activity. BMC Neuroscience. 2019;20(1):41.
73. Kumar M, Arora P, Sandhir R. Hydrogen Sulfide Reverses LPS-Induced Behavioral Deficits by Suppressing Microglial Activation and Promoting M2 Polarization. Journal of Neuroimmune Pharmacology. 2021;16(2):483-99.
74. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Behav Brain Res. 2002;134(1-2):49-57.
75. Karth M, Kinzig K. Adolescent activity-based anorexia has a substantial and prolonged impact on social behavior in young adult female rats. Physiol Behav. 2024:114528.
76. Klein SL, Nelson RJ. Activation of the immune-endocrine system with lipopolysaccharide reduces affiliative behaviors in voles. Behav Neurosci. 1999;113(5):1042-8.
77. van der Donk LEH, Bermejo-Jambrina M, van Hamme JL, Volkers MMW, van Nuenen AC, Kootstra NA, et al. SARS-CoV-2 suppresses TLR4-induced immunity by dendritic cells via C-type lectin receptor DC-SIGN. PLoS Pathog. 2023;19(10):e1011735.

78. Song M, Jin J, Lim JE, Kou J, Pattanayak A, Rehman JA, et al. TLR4 mutation reduces microglial activation, increases Aβ deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2011;8:92.
79. Gilmour BC, Corthay A, Øynebråten I. High production of IL-12 by human dendritic cells stimulated with combinations of pattern-recognition receptor agonists. NPJ Vaccines. 2024;9(1):83.
80. 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.
81. Rowe DC, McGettrick AF, Latz E, Monks BG, Gay NJ, Yamamoto M, et al. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(16):6299-304.
82. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008;42(2):145-51.
83. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. Nat Rev Immunol. 2006;6(9):644-58.
84. 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).
85. Hu LF, Lu M, Hon Wong PT, Bian JS. Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology. Antioxid Redox Signal. 2011;15(2):405-19.
86. Zhou X, Cao Y, Ao G, Hu L, Liu H, Wu J, et al. CaMKKβ-dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation. Antioxid Redox Signal. 2014;21(12):1741-58.
87. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev. 1979;59(3):527-605.

88. Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. Faseb j. 2004;18(10):1165-7.

89. Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2006;8(3-4):661-70.

90. Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H(2)O(2)-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. Free Radic Biol Med. 2008;45(12):1705-13.

91. Hu LF, Lu M, Wu ZY, Wong PT, Bian JS. Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function. Mol Pharmacol. 2009;75(1):27-34.

92. Tang XQ, Yang CT, Chen J, Yin WL, Tian SW, Hu B, et al. Effect of hydrogen sulphide on beta-amyloid-induced damage in PC12 cells. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2008;35(2):180-6.

93. Gong QH, Wang Q, Pan LL, Liu XH, Huang H, Zhu YZ. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment: a pro-inflammatory pathway in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2010;96(1):52-8.

94. Lee M, Sparatore A, Del Soldato P, McGeer E, McGeer PL. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. Glia. 2010;58(1):103-13.

95. Zhao FL, Fang F, Qiao PF, Yan N, Gao D, Yan Y. AP39, a Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Supports Cellular Bioenergetics and Protects against Alzheimer's Disease by Preserving Mitochondrial Function in APP/PS1 Mice and Neurons. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:8360738.

96. Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, Sathnur PB, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice. Neuroscience. 2013;252:302-19.

97. Chen M, Pritchard C, Fortune D, Kodi P, Grados M. Hydrogen sulfide: a target to modulate oxidative stress and neuroplasticity for the treatment of pathological anxiety. Expert Rev Neurother. 2020;20(1):109-21.

98. Habibitabar E, Moridi H, Shateri H, Karimi SA, Salehi I, Komaki A, et al. Chronic NaHS treatment improves spatial and passive avoidance learning and memory and anxiety-like behavior and decreases oxidative stress in rats fed with a high-fat diet. Brain Res Bull. 2020;164:380-91.
99. Morrison LD, Smith DD, Kish SJ. Brain S-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease. J Neurochem. 1996;67(3):1328-31.
100. Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. Biochem Biophys Res Commun. 2002;293(5):1485-8.
101. Liu XQ, Liu XQ, Jiang P, Huang H, Yan Y. [Plasma levels of endogenous hydrogen sulfide and homocysteine in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia and the significance thereof]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2008;88(32):2246-9.
102. Gong QH, Wang Q, Pan LL, Liu XH, Xin H, Zhu YZ. S-propargyl-cysteine, a novel hydrogen sulfide-modulated agent, attenuates lipopolysaccharide-induced spatial learning and memory impairment: involvement of TNF signaling and NF-κB pathway in rats. Brain Behav Immun. 2011;25(1):110-9.
103. He XL, Yan N, Zhang H, Qi YW, Zhu LJ, Liu MJ, et al. Hydrogen sulfide improves spatial memory impairment and decreases production of Aβ in APP/PS1 transgenic mice. Neurochem Int. 2014;67:1-8.
104. Kshirsagar V, Thingore C, Gursahani M, Gawali N, Juvekar A. Hydrogen Sulfide Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Mice by Reducing Apoptosis, Oxidative, and Inflammatory Effects. Neurotox Res. 2021;39(4):1310-22.
105. Zhu B, Wang ZG, Ding J, Liu N, Wang DM, Ding LC, et al. Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus. Exp Ther Med. 2014;7(3):750-4.
106. Beheshtimanesh Z, Rajaei Z. Neuroprotective effects of sesamol against LPS-induced spatial learning and memory deficits are mediated via anti-

inflammatory and antioxidant activities in the rat brain. Avicenna J Phytomed. 2023;13(2):213-22.

107. Anaeigoudari A, Shafei MN, Soukhtanloo M, Sadeghnia HR, Reisi P, Nosratabadi R, et al. The effects of L-arginine on spatial memory and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide. Adv Biomed Res. 2015;4:202.

108. Ammari M, Othman H, Hajri A, Sakly M, Abdelmelek H. Pistacia lentiscus oil attenuates memory dysfunction and decreases levels of biomarkers of oxidative stress induced by lipopolysaccharide in rats. Brain Res Bull. 2018;140:140-7.

109. Marefati N, Beheshti F, Vafaee F, Barabadi M, Hosseini M. The Effects of Incensole Acetate on Neuro-inflammation, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Memory Impairment Induced by Lipopolysaccharide in Rats. Neurochem Res. 2021;46(9):2473-84.

110. Marefati N, Beheshti F, Memarpour S, Bayat R, Naser Shafei M, Sadeghnia HR, et al. The effects of acetyl-11-keto-β-boswellic acid on brain cytokines and memory impairment induced by lipopolysaccharide in rats. Cytokine. 2020;131:155107.

111. Baradaran Rahimi V, Rajabian A, Rajabi H, Mohammadi Vosough E, Mirkarimi HR, Hasanpour M, et al. The effects of hydro-ethanolic extract of Capparis spinosa (C. spinosa) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and cognitive impairment: Evidence from in vivo and in vitro studies. J Ethnopharmacol. 2020;256:112706.

112. Yan T, Zhang X, Mao Q, Wu B, He B, Jia Y, et al. Alpinae Oxyphyllae Fructus alleviated LPS-induced cognitive impairments via PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway. Environ Toxicol. 2022;37(3):489-503.

113. Hong ZY, Shi XR, Zhu K, Wu TT, Zhu YZ. SCM-198 inhibits microglial overactivation and attenuates Aβ(1-40)-induced cognitive impairments in rats via JNK and NF-κB pathways. J Neuroinflammation. 2014;11:147.

114. Metin Yeşiltepe MYS. Vagal Sinir Uyarımı ve Yüksek Fruktoz Tüketiminin Sıçan Alzheimer Hastalığı Modelinde Nöropsikiyatrik Semptomlar Üzerine Etkileri [Tıpta Uzmanlık Tezi]: Hacettepe Üniversitesi; 2020.
115. Yar Saglam AS, Alp E, Elmazoglu Z, Menevse S. Treatment with cucurbitacin B alone and in combination with gefitinib induces cell cycle inhibition and apoptosis via EGFR and JAK/STAT pathway in human colorectal cancer cell lines. Hum Exp Toxicol. 2016;35(5):526-43.
116. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. Scientific Reports. 2019;9(1):5790.
117. Bossù P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D, et al. A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF-α and IL-18. J Neuroinflammation. 2012;9:101.
118. Czerniawski J, Miyashita T, Lewandowski G, Guzowski JF. Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval of context-object discrimination, but not spatial, memory: Evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation. Brain Behav Immun. 2015;44:159-66.
119. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell. 2002;110(2):191-202.
120. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. Behav Brain Res. 2001;124(1):47-54.
121. Chen SM, Yi YL, Zeng D, Tang YY, Kang X, Zhang P, et al. Hydrogen Sulfide Attenuates β2-Microglobulin-Induced Cognitive Dysfunction: Involving Recovery of Hippocampal Autophagic Flux. Front Behav Neurosci. 2019;13:244.
122. Zou W, Yuan J, Tang ZJ, Wei HJ, Zhu WW, Zhang P, et al. Hydrogen sulfide ameliorates cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats:

involving suppression in hippocampal endoplasmic reticulum stress. Oncotarget. 2017;8(38):64203-16.

123. He J, Chen Z, Kang X, Wu L, Jiang J-M, Liu S-M, et al. SIRT1 Mediates H2S-Ameliorated Diabetes-Associated Cognitive Dysfunction in Rats: Possible Involvement of Inhibiting Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress and Synaptic Dysfunction. Neurochemical Research. 2021;46(3):611-23.

124. Sena Laura A, Chandel Navdeep S. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Molecular Cell. 2012;48(2):158-67.

125. Kinoshita D, Cohn DWH, Costa-Pinto FA, de Sá-Rocha LC. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. Physiology & Behavior. 2009;96(2):328-32.

126. Bison S, Carboni L, Arban R, Bate S, Gerrard PA, Razzoli M. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research. 2008;1(null):1-13.

127. Donatti AF, Soriano RN, Leite-Panissi CR, Branco LG, de Souza AS. Anxiolytic-like effect of hydrogen sulfide (H(2)S) in rats exposed and re-exposed to the elevated plus-maze and open field tests. Neurosci Lett. 2017;642:77-85.

128. Oliveira MK, Batista TH, Rojas VCT, Vitor-Vieira F, Reis L, Giusti FCV, et al. Neuromodulator hydrogen sulfide attenuates sickness behavior induced by lipopolysaccharide. Journal of Neuroimmunology. 2024;389:578324.

129. Sulakhiya K, Kumar P, Gurjar SS, Barua CC, Hazarika NK. Beneficial effect of honokiol on lipopolysaccharide induced anxiety-like behavior and liver damage in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2015;132:79-87.

130. Bassi GS, Kanashiro A, Santin FM, de Souza GEP, Nobre MJ, Coimbra NC. Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behaviour Evaluated in Different Models of Anxiety and Innate Fear in Rats. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2012;110(4):359-69.

131. Wang Y, Wang S, Xin Y, Zhang J, Wang S, Yang Z, et al. Hydrogen sulfide alleviates the anxiety-like and depressive-like behaviors of type 1 diabetic mice via inhibiting inflammation and ferroptosis. Life Sciences. 2021;278:119551.

132. Kim MW, Choe K, Park JS, Lee HJ, Kang MH, Ahmad R, et al. Pharmacological Inhibition of Spleen Tyrosine Kinase Suppressed Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction in LPS-Induced Neurodegeneration Model. Cells. 2022;11(11).
133. Qian Z-M, He X, Liang T, Wu K-C, Yan Y-C, Lu L-N, et al. Lipopolysaccharides Upregulate Hepcidin in Neuron via Microglia and the IL-6/STAT3 Signaling Pathway. Molecular Neurobiology. 2014;50(3):811-20.
134. Lin L, Chen X, Zhou Q, Huang P, Jiang S, Wang H, et al. Synaptic structure and alterations in the hippocampus in neonatal rats exposed to lipopolysaccharide. Neuroscience Letters. 2019;709:134364.
135. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med. 1991;174(5):1209-20.
136. St Clair EW. Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 1999;58(suppl 1):I99-I102.
137. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. Antioxid Redox Signal. 2010;12(10):1147-54.
138. Shentu Y, Chen M, Wang H, Du X, Zhang W, Xie G, et al. Hydrogen sulfide ameliorates lipopolysaccharide-induced anxiety-like behavior by inhibiting checkpoint kinase 1 activation in the hippocampus of mice. Exp Neurol. 2024;371:114586.
139. Wang Y, Zhang C, Xu C, Feng L, Li A, Jin X, et al. H(2)S mediates apoptosis in response to inflammation through PI3K/Akt/NFκB signaling pathway. Biotechnol Lett. 2020;42(3):375-87.
140. Moynes DM, Vanner SJ, Lomax AE. Participation of interleukin 17A in neuroimmune interactions. Brain Behav Immun. 2014;41:1-9.
141. Wang D-d, Zhao Y-f, Wang G-y, Sun B, Kong Q-f, Zhao K, et al. IL-17 potentiates neuronal injury induced by oxygen–glucose deprivation and affects

neuronal IL-17 receptor expression. Journal of Neuroimmunology. 2009;212(1):17-25.

142. Ma S, Zhong D, Ma P, Li G, Hua W, Sun Y, et al. Exogenous Hydrogen Sulfide Ameliorates Diabetes-Associated Cognitive Decline by Regulating the Mitochondria-Mediated Apoptotic Pathway and IL-23/IL-17 Expression in db/db Mice. Cell Physiol Biochem. 2017;41(5):1838-50.

143. Liu Y, Meng Y, Zhou C, Yan J, Guo C, Dong W. Activation of the IL-17/TRAF6/NF-κB pathway is implicated in Aβ-induced neurotoxicity. BMC Neuroscience. 2023;24(1):14.

8. ÖZET

Lipopolisakkarit ile İndüklenen Sıçan Nöroinflamasyon Modelinde Hidrojen Sülfür Tedavisinin Etkilerinin Araştırılması

Nöroinflamasyonun bilişsel bozulmaya neden olan önemli faktörlerden biri olduğu ve birçok nörodejeneratif hastalığın oluşmasına zemin hazırladığı bilinmektedir. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarındaki immünstimülatör bileşen olan Lipopolisakkarit, ilk kez TLR-4 ligandı olarak tanımlanmıştır ve santral sinir sisteminde primer olarak mikroglia üzerinde ifade edilen bu reseptör aktive olduğunda nöroinflamatuvar süreci başlatan proinflamatuar sitokinlerin artışına aracılık eder. Bu etkisinden dolayı LPS enjeksiyonu, deney hayvanlarında nöroinflamasyon modeli oluşturmak için tercih edilen bir yöntemdir. H_2S, vücuttaki önemli fizyolojik etkileri birçok çalışma ile gösterilmiş endojen gaz modülatör olarak kabul edilen bir moleküldür. H_2S'nin nöroprotektif, anti-inflamatuvar, anti-oksidan etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde H_2S donörü NaHS ile tedavinin etkisini incelemeyi amaçladık. Sıçanlar rastgele 6 gruba ayrıldı (Kontrol, LPS, NaHS(14), NaHS(7), LPS+NaHS(14), LPS+NaHS(7)). 7 gün boyunca i.p. 250 µg LPS, 7 veya 14 gün boyunca 5 mg/kg i.p. NaHS uygulandı. Morris su labirenti testinde hipokampal hafıza fonksiyonu, açık alan testinde lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışlar, yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyete benzeri davranışlar incelendi. Davranış deneylerinin bitişini takiben deney hayvanları sakrifiye edilerek hipokampüs dokuları çıkarılarak Western blot incelemeleri için muhafaza edildi. Western Blot yöntemi ile hipokampüs dokusunda CBS, CSE, IL-

6, IL-17, IL23 ve TNF- α ifadelenme düzeylerine bakıldı. LPS'nin lokomotor aktiviteyi azalttığı ve anksiyete benzeri davranışlara neden olduğu, NaHS'nin LPS'nin neden olduğu anksiyete benzeri davranışları azalttığı görülmüştür. LPS ve NaHS'nin beraber uygulanması IL-17 ifadelenmesini düşürmüştür. Çalışmamızın sonuçları Hidrojen Sülfür'ün immün-inflamatuvar aktivasyon patogenezi ile ortaya çıkan anksiyete benzeri davranışları azaltıcı etkisinin IL-17 ile ilişkisi olduğu/olabileceğini düşündürmektedir. Santral sinir sistemindeki IL-17 artışı ile ilişkilendirilen anksiyete bozukluğu ve Alzheimer hastalığı gibi nöropsikiyatrik hastalıkları engellemek için Hidrojen Sülfür tedavisinin potansiyelini daha detaylı göstermek amacıyla ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Lipopolisakkarit, hidrojen sülfür, nöroinflamasyon

9. SUMMARY

Investigating the Effects of Hydrogen Sulfide Treatment on a Lipopolysaccharide-Induced Rat Model of Neuroinflammation

Neuroinflammation has been accepted as an important trigger for cognitive impairment and promotes the development of certain neurodegenerative diseases. Lipopolysaccharide, an immunostimulatory component of the cell wall of Gram-negative bacteria, first became known as a TLR-4 ligand. The activation of TLR-4, which is mainly expressed in microglia in the central nervous system, promotes the production of proinflammatory cytokines that trigger the neuroinflammatory process. LPS injection is a common method for developing a neuroinflammation model in animal experiments. H_2S is a molecule known as an endogenous gas modulator that has significant physiological effects, as demonstrated by many studies. The neuroprotective, anti-inflammatory, and antioxidant properties of H_2S have been demonstrated. Our work aimed to investigate the effects of the H_2S donor NaHS on the LPS-induced neuroinflammation model. We randomly assigned rats into six groups: Control, LPS, NaHS(14), NaHS(7), LPS+NaHS(14), and LPS+NaHS(7). 250 μg of LPS was administered intraperitoneally for 7 days, and 5 mg/kg of NaHS was administered intraperitoneally for either 7 or 14 days. The hippocampal memory function was examined by the Morris water maze test, and the locomotor activity and anxiety-like behaviors were examined in the open field test. Anxiety-like behaviors have also been examined in the elevated plus maze test. After completing the behavioral experiments, animals were euthanized, their hippocampus tissues were collected and preserved for Western blot analysis.

The expression levels of CBS, CSE, IL-6, IL-17, IL-23, and TNF-α in hippocampal tissue have been examined by the Western Blot procedure. LPS decreased locomotor activity and induced anxiety-like behaviors, whereas NaHS alleviated the anxiety-like behaviors caused by LPS. The combined administration of LPS and NaHS reduced IL-17 expression in the hippocampus tissue. Our investigation findings indicate that Hydrogen Sulfide's impact on alleviating anxiety-like behaviors related to immune-inflammatory activation pathophysiology may be related to IL-17. Further study needs to be done for a better understanding of the beneficial effects of Hydrogen Sulfide treatment in preventing IL-17-related neuropsychiatric disorders, including anxiety disorder and Alzheimer's disease, which have been linked to elevated IL-17 levels in the central nervous system.

Keywords: Lipopolysaccharide, hydrogen sulfide, neuroinflammation