



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SİSTEMİK İNFLAMASYONUN SIÇAN HİPOKAMPÜSÜNDE
MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLERİN MOLEKÜLER
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YILDIRAY KAYA

EYLÜL 2016

DÜZCE

KABUL VE ONAY BELGESİ

Yıldıray KAYA tarafından hazırlanan “Sistemik İnflamasyonun Sıçan Hipokampüsünde Meydana Getirdiği Değişikliklerin Moleküler Düzeyde İncelenmesi” isimli lisansüstü tez çalışması, Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun 07/09/2016 tarih ve 2016/695 sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye

(Tez Danışmanı)

Yrd. Doç. Dr. Gülgün ÇAKMAK

Düzce Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç. Dr. Sevgi Türker Kaya

Kocaeli Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç. Dr. Meral Kekeçoğlu

Düzce Üniversitesi

Tezin Savunulduğu Tarih: 26.09.2016

ONAY

Bu tez ile Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yıldıray KAYA’nın Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans derecesini almasını onamıştır.

Doç. Dr. Resul KARA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

26 Eylül 2016

Yıldıray KAYA





Sevgili Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve bu tezin hazırlanması süresince gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gülgün ÇAKMAK'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Feride SEVERCAN ve Prof. Dr. Eyüp Sabri AKARSU'a da şükranlarımı sunarım.

Yaşamım boyunca yanımda olan ve olacak olan, bugünlere gelmem için gereken gücü veren, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, başarılarımla gurur duyan babam Ali Şükrü KAYA'ya, annem Reyhan KAYA'ya ve ablam Yıldız KAÇKAN'a en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

26 EYLÜL 2016

Yıldıray KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR SAYFASI	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
EXTENDED ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	10
1.1. İNFLAMASYON	10
1.1.1. İnflamasyonun Kimyasal Araçları	12
1.1.2. Sistemik İnflamasyon	19
1.1.3. Sistemik İnflamasyonun Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi	21
1.2. HİPOKAMPÜS	22
1.2.1. Hipokampüsün Fonksiyonları.....	25
1.3. LİPOPOLİSAKKARİT	26
1.4. HİPOTERMİ	31
1.5. SPEKTROSKOPİNİN TEMELLERİ.....	32
1.5.1. Kızılötesi Spektroskopisi.....	35
1.5.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi.....	37
1.5.3. FTIR Spektroskopisinin Avantajları ve Uygulamaları	39
1.6. ÇALIŞMANIN AMACI	40

2. MATERYAL VE YÖNTEM	43
2.1. SARF MALZEMELER	43
2.2. HAYVAN DENEYLERİ	43
2.3. FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARI.....	45
2.3.1. Spektral Verilerinin Toplanması	45
2.3.2. FTIR Spektroskopisi Analiz Yöntemleri.....	46
2.3.3. Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA)	47
2.3.4. FTIR Spektrumlarından Protein İkincil Yapı Tahmini	47
2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	48
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
3.1. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	49
3.2. TARTIŞMA	76
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	85
5. KAYNAKLAR	87

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİL LİSTESİ

		<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1.	Yara iyileşmesinde görevli hücrelerin zamana bağlı ortaya çıkışları.	11
Şekil 1.2.	İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları.	12
Şekil 1.3.	T hücrelerden sekrete edilen sitokinler ve hücreyel orjinleri.	15
Şekil 1.4.	Mast hücre kaynaklı vasküler inflamatuvar olaylar.	18
Şekil 1.5.	İmmün ve inflamatuvar hücrelerde nitrik oksit sentezi ve reaksiyonları.	18
Şekil 1.6.	İnflamasyonun meydana gelmesi için gerekli olan perivasküler bağ doku elemanları.	20
Şekil 1.7.	A) Hipokampüsün denizati ile benzerliği B) Ammon: Koçbaşı Mısır ilahı.	23
Şekil 1.8.	Hipokampüsün konumu ve şekli.	23
Şekil 1.9.	Limbik sistem.	24
Şekil 1.10.	Hipokampüsün bölümleri.	24
Şekil 1.11.	Lipopolisakkarit ve lipit A'nın yapısının şematik gösterimi A) LPS ve B) Lipit A.	27
Şekil 1.12.	LPS sinyal iletiminde görevli olan aksesuar proteinler.	28
Şekil 1.13.	LPS sinyal iletisi.	31
Şekil 1.14.	Elektromanyetik spektrum.	33
Şekil 1.15.	Dalga boyu ve frekans ilişkisi.	34
Şekil 1.16.	Enerji düzey diyagramı.	35
Şekil 1.17.	IR emilim spektrumunda titreşim hareketleri.	37
Şekil 1.18.	Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektrometresi.	38
Şekil 2.1.	Atmosferik havanın 4000-450 cm^{-1} bölgesindeki FTIR spektrumu.	46
Şekil 2.2.	Hipokampüs dokusunun 1700-1600 cm^{-1} arası örnek soğurma ve ikincil türev spektrumları.	48
Şekil 3.1.	Kontrol sıçan hipokampüsünün 4000-900 cm^{-1}	50

	bölgesindeki spektrumu.	
Şekil 3.2.	Kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus dokularına ait 3800–3025 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları.	54
Şekil 3.3.	Kontrol ve LPS gruplarının A) Amid A B) Amid B bantlarının alan değerleri.	55
Şekil 3.4.	Kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus dokularına ait 3025-2800 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları.	56
Şekil 3.5.	Kontrol ve LPS gruplarının olefinik=CH gerilme bantının alan değerleri.	57
Şekil 3.6.	Kontrol ve LPS gruplarının doymamış/doymuş lipit alan oranları.	57
Şekil 3.7.	Kontrol ve LPS gruplarının CH ₃ antisimetrik gerilme bantının alan değerleri.	58
Şekil 3.8.	Kontrol ve LPS gruplarının A) CH ₂ antisimetrik gerilme bantı B) CH ₂ simetrik gerilme bantının alan değerleri.	59
Şekil 3.9.	Kontrol ve LPS gruplarının CH ₂ bükülme bantının alan değerleri.	59
Şekil 3.10.	Kontrol ve LPS gruplarının CH ₂ antisimetrik gerilim bantının dalga sayısı değerleri.	60
Şekil 3.11.	Kontrol ve LPS gruplarının CH ₂ antisimetrik gerilim bantının bant genişlikleri.	60
Şekil 3.12.	Kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus dokularına ait 1800-900 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrumları.	61
Şekil 3.13.	Kontrol ve LPS gruplarının karbonil ester gerilme bantının alan değerleri.	62
Şekil 3.14.	Kontrol ve LPS gruplarının karbonil ester gerilme bantının dalga sayısı değerleri.	63
Şekil 3.15.	Kontrol ve LPS gruplarının A) Amid I bantının B) CH ₃ simetrik gerilme bantının alan değerleri.	64
Şekil 3.16.	Kontrol ve LPS gruplarının Amid I bantının dalga sayısı değerleri.	65
Şekil 3.17.	Kontrol ve LPS gruplarının Amid I bantının bant	65

	genişlikleri.	
Şekil 3.18.	Kontrol ve LPS gruplarının Amid I/Amid II alan oranları.	66
Şekil 3.19.	Kontrol ve LPS gruplarının COO ⁻ simetrik gerilme bantının alan değerleri.	66
Şekil 3.20.	Kontrol ve LPS gruplarının Amid III bantının alan değerleri.	67
Şekil 3.21.	Kontrol ve LPS gruplarının A) PO₂⁻ antisimetrik gerilme B) PO₂⁻ simetrik gerilme bantlarının alan değerleri.	68
Şekil 3.22.	Kontrol ve LPS gruplarının PO ₂ ⁻ antisimetrik gerilme bantının dalga sayısı değerleri.	68
Şekil 3.23.	Kontrol ve LPS gruplarının CO-O-C antisimetrik gerilme bantının alan değerleri.	69
Şekil 3.24.	Kontrol ve LPS gruplarının C-N ⁺ -C gerilme titreşim bantının alan değerleri.	70
Şekil 3.25.	Kontrol ve LPS gruplarının z-form DNA bantının alan değerleri.	70
Şekil 3.26.	Kontrol ve LPS gruplarının CH ₂ antisimetrik/CH ₃ antisimetrik bant alan oranları.	71
Şekil 3.27.	Kontrol ve LPS gruplarının karbonil ester/lipit alan oranları.	72
Şekil 3.28.	Kontrol ve LPS gruplarının lipit/protein bant alan oranları.	73
Şekil 3.29.	Kontrol ve LPS gruplarının nükleik asit/protein bant alan oranları.	73
Şekil 3.30.	İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen kontrol ve LPS gruplarının dokularındaki A) Alfa Heliks B) Beta Tabaka C) Turn D) Random Coil proteinlerin ikincil yapı miktarındaki değişimler.	74
Şekil 3.31.	Kontrol ve LPS grubundaki bireylere ait hipokampus dokusu spektrumlarına 3100-450 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.	75

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. Spesifik kimyasal araçların sınıflandırılması.	13
Çizelge 1.2. Kızılötesi spektral bölgeleri.	36
Çizelge 3.1. Sıçan hipokampusünün IR spektrumundaki başlıca soğurmaları.	51
Çizelge 3.2. Kontrol ve LPS gruplarının başlıca fonksiyonel gruplarınıninalan değerleri.	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

A.U	Arbitrary Unit (Göreceli birim)
AA	Araşidonik Asit
A β	Amiloid Beta
CO	Karbonmonoksit
DA	Dopaminerjik
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HCA	Hiyerarşik Kümeleme Analizi
HETE	Hidroksieikozatetraenoik Asit
HPETE	Hidroperoksieikozatetraenoik Asit
IFN	Interferon
IL	Interlökin
IR	Kızılötesi
LBP	Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lipoteikoik Asit
MD	Myeloid Farklılaşma
MDA	Malondialdehit
MS	Multiple Skleroz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PGI ₂	Prostasiklin

RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
TAF	Trombosit Aktive Eden Faktör
TBARS	Tiobarbiturik Asit Reaktif Madde
TH0	Immatür CD4+ T hücreler
TLR	Toll-Benzeri Reseptör
TNF	Tümör Nekrozis Faktörü
TxA ₂	Tromboksan A2



ÖZET

SİSTEMİK İNFLAMASYONUN SIÇAN HİPOKAMPÜSÜNDE MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLERİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Yıldıray KAYA

Düzce Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gülgün ÇAKMAK

Eylül 2016, 119 sayfa

İnflamasyon, bağışıklık sisteminin çeşitli iç ve dış uyaranlara karşı gösterdiği, yaşamın devamı için gerekli, iltihabi bir reaksiyondur. Eğer uyaran organizmada inflamasyonu tetiklerken belli bir eşik değeri aşarsa, sistemik inflamasyon ortaya çıkar. Sistemik inflamasyonun seyri sırasında merkezi sinir sistemi tarafından kontrol edildiği bilinen birçok nörobiyolojik olay gelişmektedir. Şimdiye kadar kanser ve obezite gibi bazı hastalıklarla ilişkisi ortaya konmuş olan inflamasyon, son yıllarda Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir. İnflamasyonun nöral dejenerasyon ve kognitif işlev kaybıyla olan ilişkisi ile ilgili veriler her geçen gün artmakla birlikte bunun ne gibi moleküler değişimlerden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada amacımız, sıçanlarda sistemik inflamasyonun, beynin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi açıkça ortaya konmuş bir bölgesi olan hipokampüsteki etkilerini moleküler düzeyde ortaya çıkarmaktır. Bu amaç doğrultusunda, Wistar albino sıçanlarda, gram negatif bakteri duvarının bir komponenti olan lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu ile sistemik inflamasyon oluşturulmuş ve bu sıçanlardan çıkarılan beyinlerin hipokampus bölgeleri Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi tekniğiyle incelenmiştir. Sonuçlar, sistemik inflamasyonun hipokampüsteki lipitlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin miktarını anlamlı derecede artırdığını ve bu moleküllerin yapısında ve konformasyonunda önemli değişiklikler

meydana getirdiğini göstermiştir. Makromoleküllerin birbirlerine göre oranları incelendiğinde, doymamış/doymuş lipit ve karbonil ester/lipit oranlarında artış gözlenmiştir; bu artışlar lipit peroksidasyonunun varlığını göstermektedir. Lipit/protein oranında gözlenen azalma protein miktarında daha dramatik bir artış olduğunu, nükleik asit/protein oranında gözlenen azalma ise translasyon hızındaki artışı göstermektedir. Ayrıca, LPS uygulamasından sonra sistemdeki lipitlerin zincir uzunluğunda bir artış, membran düzeninde bir azalma ve membran dinamiğinde bir artış tespit edilmiştir. Dahası, sistemik inflamasyon, dönme (turn) miktarında azalma ve tesadüfî kıvrılma miktarında artışı indükleyerek proteinlerin ikincil yapısında önemli değişikliklere sebep olmuştur. İlâveten, spektral değişimler temel alınarak gerçekleştirilen hiyerarşik kümeleme analizi ile kontrol grubu ve LPS uygulanmış grup başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Bu bulgular, sistemik inflamasyonun hipokampus dokusunda önemli yapısal, konformasyonel ve fonksiyonel değişikliklere sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Sözcükler: Beyin, Fourier dönüşüm kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi, Hipokampus, Lipopolisakkarit (LPS), Sistemik inflamasyon

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE CHANGES OF SYSTEMIC INFLAMMATION ON RAT BRAIN HIPPOCAMPUS AT MOLECULAR LEVEL

Yıldıray KAYA

Duzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master of Science Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülgün ÇAKMAK

September 2016, 119 pages

Inflammation, which is necessary for the continuation of life, is the inflammatory reaction by which the immune system manifests to various endo and exo stimuli. If the stimulus exceeds a certain threshold while it is triggering inflammation, systemic inflammation occurs in the organism. It is known that as the systemic inflammation develops, many neurobiological phenomena controlled by the central nervous system take place. Until now, it has been well documented the relationship between inflammation and some diseases such as cancer and obesity. In recent years, inflammation has been related to neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Although the data regarding the relationship between the inflammation and neuronal and cognitive function loss are increasing, the molecular changes causing this relation are not known exactly. The aim of the study is to reveal the effects of systemic inflammation on the hippocampus, which is well known neurodegenerative diseases-related region of the brain, at molecular level. For this purpose, systemic inflammation was induced by the injection of lipopolysaccharide (LPS), a component of the outer cell wall of gram-negative bacteria, in Wistar albino rats and the hippocampus regions of the brains of these rats were analyzed by FTIR spectroscopy technique. The results showed that systemic inflammation increased the

amounts of lipids, proteins and nucleic acids significantly and caused important changes in the structure and conformation of these molecules in hippocampus. When the changes in macromolecular ratios were examined, an increase in the unsaturated/saturated lipid ratio and carbonyl ester/lipid ratio were observed indicating lipid peroxidation presence. A decrease observed in the lipid/protein ratio showed a more dramatic increase in the amount of protein, a decrease observed in the nucleic acid/protein ratio showed an increase in translation rate. Moreover, an increase in the lipid chain length, a decrease in membrane order and an increase in membrane dynamics were detected after LPS administration. Furthermore, systemic inflammation altered the secondary structure of proteins by inducing a decrease in turn and an increase in random coil structures. In addition, the control and LPS-treated groups were successfully differentiated by hierarchical cluster analysis which was performed based on the spectral variations. The results revealed that systemic inflammation caused significant structural, conformational and functional changes in the hippocampus.

Keywords: Brain, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Hippocampus, Lipopolysaccharide (LPS), Systemic inflammation

EXTENDED ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE CHANGES OF SYSTEMIC INFLAMMATION ON RAT BRAIN HIPPOCAMPUS AT MOLECULAR LEVEL

Yıldıray KAYA

Duzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master of Science Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülgün ÇAKMAK

September 2016, 119 pages

1. INTRODUCTION:

The relationship between the immune system and the central nervous system is in the most recent studies among the topics in neuroscience. Basically, inflammation, which is necessary for the continuation of life, is the inflammatory reaction by which the immune system manifests to various endo and exo stimuli. The purpose of this response is to prevent the harmful effects of the stimulation on the organism. If the stimulus exceeds a certain threshold while it is triggering inflammation, systemic inflammation occurs in the organism. It is known that as the systemic inflammation develops, many neurobiological phenomena controlled by the central nervous system take place. Fever, tendency to sleep, anorexia and the activation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis are some of them. In recent years, inflammation has been related to neurodegenerative and neuropsychiatric diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Although the data regarding the relationship between the inflammation and neuronal and/or cognitive function loss are increasing, the molecular changes causing this relation are not known exactly. For this reason, in this study, we aimed to investigate the effects of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS), on the hippocampus, which is well known neurodegenerative diseases related region of the brain, at molecular level.

It has been known that inflammation causes lipid peroxidation and important changes on the lipid order of the cell membrane but there are no studies showing these effects in the literature. In addition, it has not been investigated that inflammation causes what kind of changes in the secondary structure of protein in brain tissue. It has been known that neurodegenerative diseases are closely related with the changes in protein secondary structure but the relation between inflammation and protein secondary structure is not clear.

2. MATERIALS AND METHODS:

8-12 weeks old male Wistar albino rats ranging from 220—280 g body weight were used. The animals were divided into two groups, including 7 rats each, as control and LPS administered group. The abdominal temperature was recorded by radiotelemetry. At least one week before the day of the experiment, a temperature transmitter, the output signal of which is frequency modulated by its own temperature, was implanted into the peritoneal cavity of each rat under aseptic conditions and general anesthesia (Ketamine, 80 mg/kg, IP + Xylazine, 10 mg/kg, IP). The detected signals were fed into a personal computer through an interface. 7 days later, the animals without any abnormalities weighed and the animals have normal body weight has been accepted as healthy and suitable for the experiment. The operated rats, individually housed in a Macrolon cage, were placed on radio-signal receivers through which data signals were sent to a data matrix that was controlled and operated by computer software. The experiment began after the animals adapted to the environment and their body temperature stabilized.

Control Group: Saline, 5 ml/kg, was injected to the rats intraperitoneally. 1 hour after the injection (temporal period corresponding to the entrance of hypothermia), the animals were decapitated, their hippocampus of brains were removed and kept at -80 °C until use.

LPS Group: LPS (*E. coli* O111:B4, 250 µg/kg) was injected to the rats intraperitoneally. After the injection, when the body temperature of the animals showed a decrease of 0.5°C, which corresponded to the preamble of hypothermia, the animals were decapitated and all the procedures applied to the control group were repeated for the LPS group.

The brain samples were dried in a dry lyofreeze dryer for 24 hours to remove water. The samples then were ground in an agate mortar containing liquid nitrogen to obtain brain powder. The brain powder was mixed with potassium bromide (at the ratio of 1/100) which was dried in the incubator for 24 hours to remove water. The mixture then was subjected to a pressure of 100 kg/cm² in an evacuated die to obtain a KBr pellet for FTIR studies. The spectra of brain samples were recorded in the 4000–450 cm⁻¹ region at room temperature. 100 scans were taken for each interferogram at 4 cm⁻¹ resolution.

The Mann–Whitney-U test was performed to test the significance of the differences between the control and LPS-treated samples.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS:

Dramatic increases were observed in the area values of the amide A and amide B, which contain strong absorptions from N-H stretching modes of proteins, in the LPS-treated group. In addition, significant increases in the area values of the amide I, amide III and CH₃ symmetric stretching bands, which are also arising from proteins, were observed in the LPS-treated tissue. The increase observed in the area of olefinic=CH band shows that the amount of unsaturated lipids increased in the LPS treated group. The areas of the CH₃ antisymmetric, CH₂ antisymmetric and symmetric stretching, CH₂ bending and CO-O-C antisymmetric stretching bands, which are mainly due to saturated lipids, also increased in the LPS treated group. These results suggest that LPS injection caused an increase in the amount of the proteins, saturated and unsaturated lipids in the LPS treated group. The amount of nucleic acids were also increased as revealed by the increase in the areas of PO₂ antisymmetric, C-N⁺-C stretching and Z-form DNA bands, which are due to nucleic acid in the tissue.

The decrease observed in the lipid to protein ratio shows that there is an alteration in the lipid and protein metabolism in LPS treated group and could be attributed to a lower lipid content or higher protein content. The increase observed in the olefinic=CH/lipid ratio suggests a lipid peroxidation since this increase could be attributed to the double bonds in the lipid peroxidation end products. The increase in the CH₂/CH₃ ratio shows an increase in the chain length of the lipids and the increase in the carbonyl/lipid shows an increase in the carbonyl level of the system. A decrease in the nucleic acid/protein ratio may be due to a change in the nucleus/cytoplasm ratio, an increase in the cell

division rate or a decrease in the DNA condensation. The increase in the amide I/amide II ratio and the shifting in the wavenumber and the decrease in the bandwidth of the amide I band revealed that the protein composition, structure and conformation were altered by LPS injection.

The analysis of the secondary structure of the proteins revealed that turns structure decreased and random coil structure increased significantly in the LPS-treated group. The increase in the random coil structure shows that LPS injection caused protein denaturation in the system. A significant change in the position of the CH₂ antisymmetric band to higher frequencies for LPS group indicates an increment in gauche conformers in acyl chains e.g. lipid disordering. An increase in the bandwidth of this band was observed in LPS group indicating an increase in membrane dynamics and hence fluidity. In addition, the shifts in the carbonyl ester stretching band to higher wavenumbers and PO₂⁻ antisymmetric band to lower wavenumbers confirm the alterations in the lipid composition and packing in rat hippocampus.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK:

According to the results of our study, LPS application increased the amounts of lipids, proteins and nucleic acids significantly and caused important changes in the structure and conformation of these molecules. When the changes in macromolecular ratios were examined, an increase in the unsaturated/saturated lipid ratio and carbonyl ester/lipid ratio were observed, indicating lipid peroxidation presence. These changes were accompanied by a decrease in the lipid/protein ratio and nucleic acid/protein ratio and an increase in the CH₂/CH₃ ratio. In addition, a decrease in membrane order and an increase in membrane dynamics were detected. Furthermore, systemic inflammation induced a decrease in turn and an increase in random coil structures of proteins. These results revealed that LPS-induced systemic inflammation caused significant changes in the content, structure and functions of lipid, protein and nucleic acids in the rat hippocampus.

Since the hippocampus section of brain is clearly associated with a large number of neurodegenerative diseases, our study guides many future researches into a better understanding of etiopathogenesis of neurodegenerative diseases. In the light of the results of our study new investigations on causes and treatment of neurodegenerative

diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Multiple Sclerosis will be conducted. By adding a neurodegenerative disease model that incoherent with the changes observed in our study, national as well as international new researches on diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases could be developed.



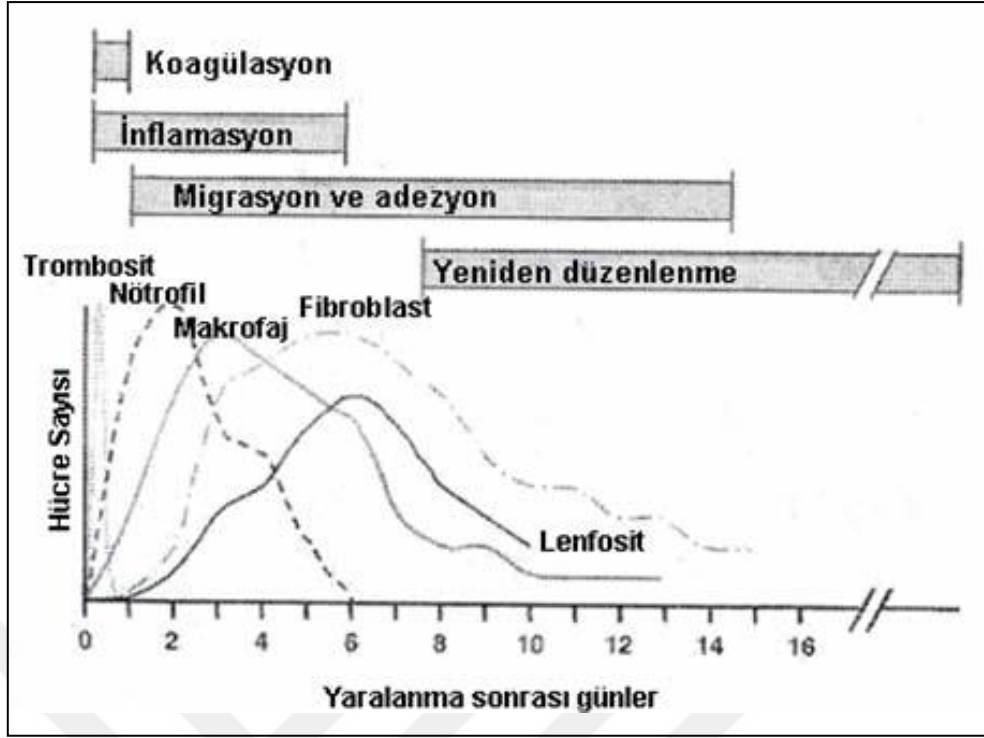
1. GİRİŞ

1.1. İNFLAMASYON

Birçok fizyolojik ve patolojik olayın temelini oluşturan inflamasyon bağışıklık sisteminin çeşitli mikrobik ajanlar veya toksinlere karşı göstermiş olduğu iltihabi bir reaksiyondur (Majno 1975; Collins 1998; Terzioglu 2004). İnflamasyon organizmanın iç ve dış uyaranlara karşı başlattığı yaşamın devamı için gerekli olan bir yanıttır. Bu yanıtın biyolojik amacı, uyarının neden olduğu hücrel yaralanmayı tamir etmek, hücre ve yabancı cisim atıklarını temizlemek, bakteri ve/veya uyarıyı sınırlandırarak organizma üzerine olan zararlı etkileri engellemektir (Majno 1975; Weissman 1992; Collins 1998).

Organizmada uyarıların tetikleme sonucu aktive olan inflamasyon, çok iyi şekilde kontrol edilen bir dizi reaksiyona neden olur. Bu yolla uyarının hasara uğrattığı dokuda lokal olarak tamir olayını başlatır. Meydana gelen lokal inflamasyon sonucunda ya tam rezolüsyon ile etkenin meydana getirdiği hadise dokuda hiçbir hasar bırakmadan temizlenebilir ya uyarı sınırlandırılarak iyileşme gerçekleşir ya da sistemik inflamatuvar yanıt gelişebilir (Weissman 1992; Collins 1998).

İnflamasyonun vasküler ve hücrel yanıtları, plazma hücrelerinden oluşan ve inflamatuvar bir uyarı ile meydana gelen kimyasal faktörlerle ortaya çıkmaktadır. Bu gibi kimyasal araçlar bir arada veya sırayla etki ederek inflamatuvar yanıtın oluşmasını tetiklerler (Aghabeigi 1992; Çevikbaş 1995; Mullington ve diğ. 2001). İnflamasyon ve tamir, vücudun iç içe geçmiş savunma mekanizmalarıdır. Vücut inflamatuvar etkeni yok etmeye, ortamdaki uzaklaştırmaya, inflamasyonu sınırlandırarak hasar gören dokuyu tamir etmeye çalışmaktadır. Yara iyileşmesinde görevli olan hücrelerin zamana bağımlı ortaya çıkışları Şekil 1.1.'te gösterilmektedir (Mullington ve diğ. 2001). İnflamatuvar yanıt inflamasyonun bir komplikasyonu olarak organ fonksiyonlarında bozulma veya yetmezliğe, hatta ani ölüme sebep verebilir.



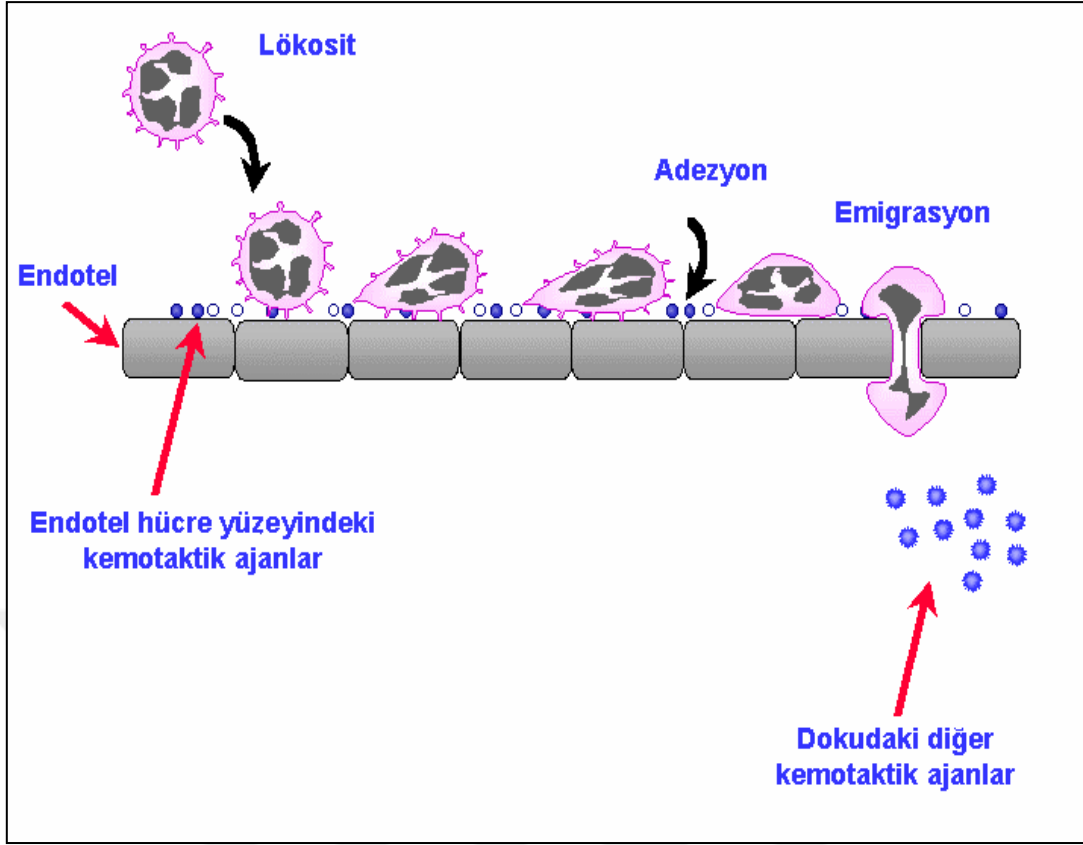
Şekil 1.1. Yara iyileşmesinde görevli hücrelerin zamana bağlı ortaya çıkışları (Kuralay ve Çavdar 2006).

İnflamasyon patolojisi vasküler ve hücrel olaylar olmak üzere iki ana olayı içerir (Sies 1993; Sessle 2001).

A.Vasküler Olaylar: Vasküler akım ve permeabilite ile ilgili iki çarpıcı değişiklik söz konusudur.

1. Vasküler akım ve damar çapındaki değişiklikler: Arteriollerin birkaç saniyelik kısa süreli vazodilatasyonu oluşur ve erken dönemde ısı ve kızarıklığın artışına neden olur.
2. Vasküler permeabilite artışı: Vazodilatasyon ve artmış kan akımı intravasküler hidrostatik basıncı, bu da kapillerden sıvı filtrasyonunu artırır.

B. Hücrel Olaylar: Lökositlerin en çarpıcı fonksiyonu incinme yerine göçleridir. Lökosit olayları sırasıyla: a) Marjinyasyon ve yuvarlanma, b) Adezyon, c) Emigrasyon, d) Fagositoz ve intravasküler yıkım, e) Lökosit ürünlerinin ekstraselüler salınımıdır. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları Şekil 1.2.'te gösterilmektedir.



Şekil 1.2. İnflamasyon sürecindeki lökosit olayları (Kuralay ve Çavdar 2006).

1.1.1. İnflamasyonun Kimyasal Aracıları

İnflamasyon sırasında birçok aracı molekül açığa çıkmaktadır. Bunlar plazmada ya da hücre içinde bulunurlar. Plazma kökenli olanların öncü hücreleri aktive edilecekleri zamanı bekleyen ürünlerden oluşur (kompleman, kontakt aktivasyon ve pıhtılaşma sistemi). Hücrede bulunanlar ise ya hücre içi granüllerde depolanır (histamin, serotonin, lizozomal enzimler) ya da yeni sentez edilirler (prostaglandinler, lökotrienler, PAF, sitokinler, nitrik oksit). Aracı moleküllerin salgılanmaları için uyarıya ihtiyaç vardır. Aracıların majör hücresel kaynağı; trombositler, nötrofiller, monosit, makrofaj, mast hücreleri ve mezankimal hücrelerden (endotel, düz kas, fibroblast ve epitel) sağlanır ve birçoğu biyolojik aktivitelerini göstermede hedef hücrelerdeki özel reseptörleri kullanırlar (Collins 1988). Bazıları ise lizozomal proteaz gibi kendileri doğrudan enzimatik aktiviteye sahiptir. Bir kimyasal aracı diğerlerini hedef hücreler yolu ile salgılatırabilir. Aracı moleküllerin bazılarının etkileri inflamasyonu şiddetlendirirken bazıları buna karşı zıt etki oluşturabilir. Bir veya birden çok hücreyi etkileyebildikleri gibi farklı hücrelerde farklı farklı etkiler de gösterebilirler. Genelde yaşam süreleri çok

kısadır. Organizmada ya çabuk yıkılırlar (örn. araşidonik asit metabolitleri), ya enzimlerle inaktive edilirler (örn. Kininaz bradikinini aktive eder) veya inhibe edilirler (örn. kompleman inhibitörleri). Kısaca bu sistemin düzenini ve dengesini kontrol eden başka bir sistem vardır. Bu araçların çoğunun potansiyel zararlı etkilerinin olduğuda bilinmektedir (Majno 1975; Pinckard 1994; Beutler 1995; Kunkel 1995; Margdius 1995; Morgan 1995; Dinarello 1996; Cirino 1997; Collins 1998).

İnflamatuvar doku yanıtı oluşturulmasında aracılık eden kimyasal araçlardan, ilk keşfedilen histamin olmakla birlikte, sayıları giderek artmaktadır. Araçlar, hasarlı dokudan, hücrelerden veya plazmadan köken alan çeşitli kimyasal maddelerdir (Kuralay ve Çavdar 2006). Çizelge 1.1.'te başlıca kimyasal araçları görebiliriz.

Çizelge 1.1. Spesifik kimyasal araçlarının sınıflandırılması.

Kimyasal Araçlar
1. Vazoaktif Aminler: Histamin, serotonin
2. Plazma Proteazları: a) Kininler: Bradikinini, kallikrein b) Kompleman sistemi: C3a, C5a, C5b-9 c) Koagülasyon-fibrinolitik sistem: Fibrinopeptidler ve fibrin yıkım ürünleri
3. Araşidonik Asit Metabolitleri: a) Siklooksigenaz yolu (prostaglandinler, tromboksanlar, endoperoksitler) b) Lipoksigenaz yolu [lökotrienler, hidroperoksieikozatetraenoik asit (HPETE), hidroksieikozatetraenoik asit (HETE)]
4. Lökosit Ürünleri: Lizozomal proteazlar, serbest oksijen radikalleri
5. Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF)
6. Sitokinler
7. Büyüme Faktörleri
8. Diğer Araçlar

1.Vazoaktif Aminler: Histamin ve serotonin akut inflamasyonun en başında artmış permeabiliteden sorumlu araçlardır (Bienvenu 1995).

- a. Histamin:** Histamin için en zengin kaynak, kan damarlarına bitişik olan konnektif dokudaki mast hücreleridir. Ayrıca kan bazofilleri ve trombositlerde saklanırlar. Mast hücrelerinden histamin salınımı, mast hücre degranülasyonuna yol açan çeşitli fiziksel uyarıları (travma ve soğuk/sıcak vb.) tetikler.
- b. Serotonin:** Trombositlerde ve mast hücrelerinde granüllerde saklanırlar. Trombositlerden serotonin çıkışını takiben, kollagenle temas veya antijen antikor kompleksleri ile temastan sonra uyarılır. IgE aracılı reaksiyonlarda mast hücrelerinden kaynaklanan trombosit aktive eden faktör (TAF), trombositlerden histamin ve serotonin salınımına ve trombosit agregasyonuna neden olur.

2.Plazma Proteazları: İnflamatuvar yanıtta plazmadan kaynaklanan aracı çeşitleridir (Bienvenu 1995).

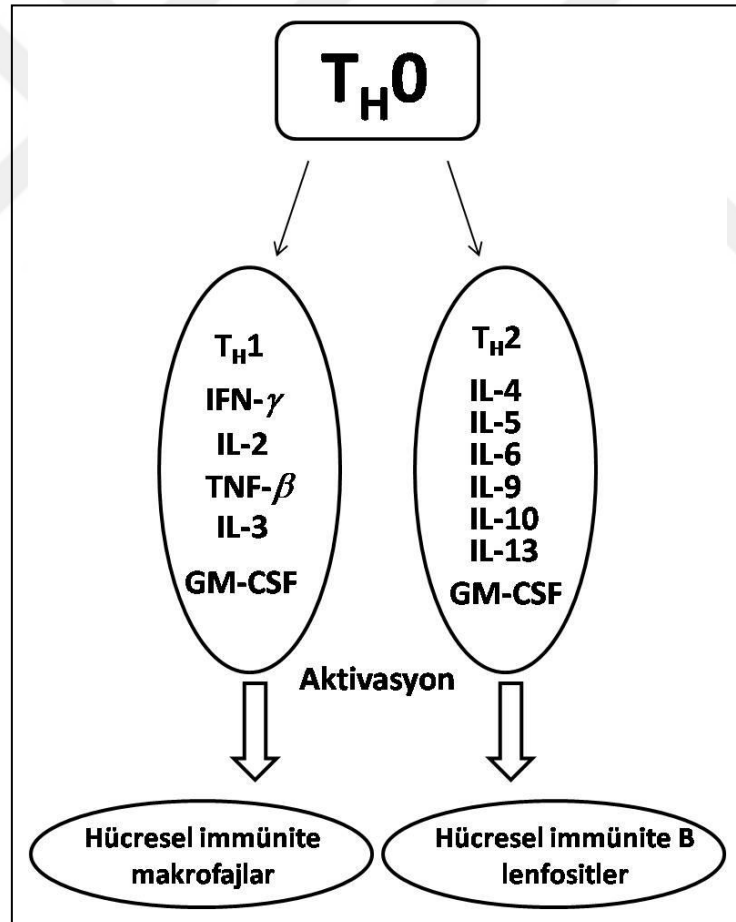
- a. Kininler:** Sistemde vazoaktif olan ve erken vasküler permeabilite artışından sorumlu olan bradikinindir.
- b. Kompleman Sistem:** Hem immünite de hem inflamasyonda rol oynarlar. C3 aktivasyonu diğer kompleman birimleriyle etkileşimde olduğu için en kritik olaydır.
- c. Koagülasyon-Fibrinolitik Sistem:** Fibrinopeptidler ve fibrin yıkım ürünleri vasküler permeabilitede artışa neden olurlar.

3.Araşidonik Asit (AA) Metabolitleri: İnflamatuvar stimulus veya C5a gibi araçlarla fosfolipaz aktivasyonu ile membran fosfolipidlerinden açığa çıkan çoklu doymamış yağ asitleridir. Yirmi karbonlu yağ asitlerinin membran fosfolipitlerinden mekanik, kimyasal ve fizik uyarıları ve diğer araçların etkisi ile oluşan hücrel fosfolipazlar sayesinde açığa çıkarlar. Araşidonik asit metabolitleri iki majör enzim aracılığı ile sentezlenirler. Siklooksijenaz yolu ile prostasiklin (PGI₂), tromboksan A₂ (TxA₂), PGE₂, PGD₂, PGF₂ meydana gelir. Bunlar inflamasyonda ağrı ve ateş gelişiminde de rol oynarlar. Lipooksijenaz yolu ile lökotaksinler (lökotrienler) oluşur ve inflamasyonda önemli görevleri üstlenirler. Lipoksinler bu ailenin en yeni üyesidir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar etkileri vardır.

4.Lökosit Ürünleri: Lizozomal proteazlar ve serbest oksijen radikalleridir. Nötrofil ve makrofajlar kemotaksi, immünkompleksler veya fagositoz ile aktive edildiklerinde lizozomal enzimleri ve serbest oksijen radikalleri salarak inflamatuvar yanıtı eşlik ederler.

5.Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF): Trombositlerin toplanmasına ve içeriklerinin salınmasına sebep olan antijenle uyarılmış nötrofil, bazofil, monosit ve çeşitli endotel hücrelerinden açığa çıkan araçlardır.

6.Sitokinler: CD4+ T lenfosit ve aktive makrofajlar gibi birçok hücre tipinden oluşan araçlardır. T hücrelerinden salınan sitokinler ve hücreler orjinleri Şekil 1.3.'te gösterilmektedir (Park ve Barbul 2004).



Şekil 1.3. T hücrelerden sekrete edilen sitokinler ve hücreler orjinleri (T_H0 , immatür $CD4+$ T hücreler; IFN , interferon; IL , interlökin; TNF , tümör nekroz faktör; $GM-CSF$, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör) (Kuralay ve Çavdar 2006).

Sitokin salınımı, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel incinmeler ve çeşitli inflamatuvar olaylarla uyarılabilir. Sitokinler polipeptid yapıda olup inflamasyonda en önemlileri interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktör-alfadır (TNF- α). Özellikle IL-1 ve TNF- α birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşır. Her ikisi de aktif makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulur ve proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılırlar (Kuralay ve Çavdar 2006).

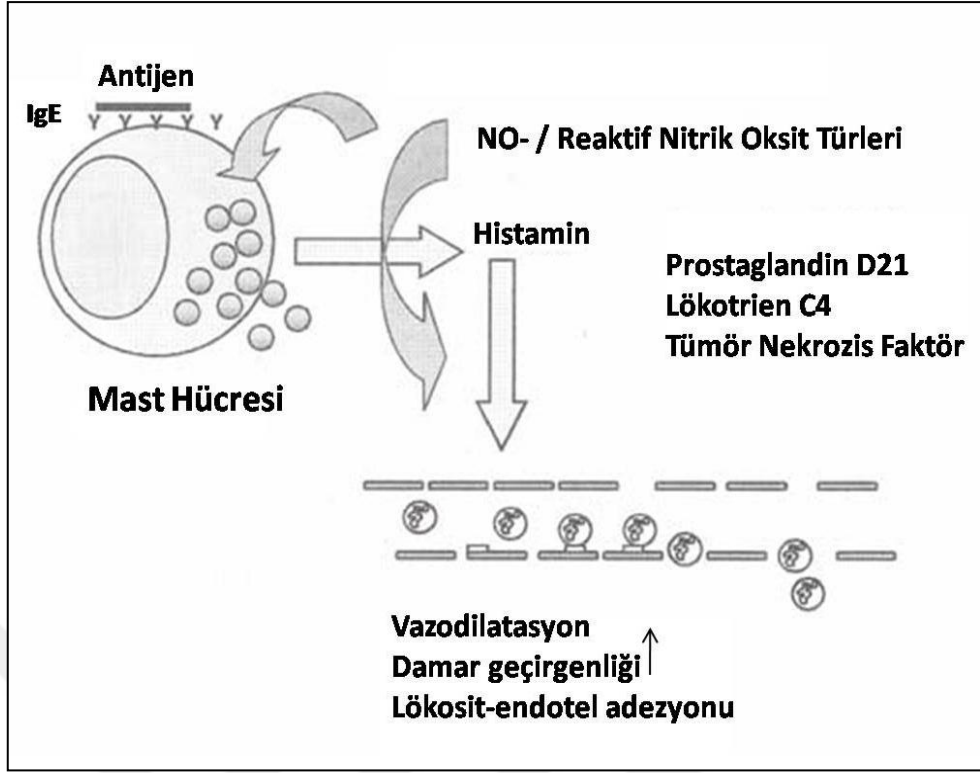
Sitokinler, kendilerinin hiçbir intrinsik ve enzimatik aktivitesi olmadığı halde inflamasyon sırasında uyarana karşı (bakteri, yabancı cisim vs.) başlatılmış immün cevabın bir parçası olarak görev alırlar. Bu şekilde hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanır ve hücre davranışını değiştirirler. Kök hücrelerinde, özellikle lenfosit, makrofaj, endotel, epitel ve bağ dokusu hücrelerinde sentezlenir ve salgılanırlar. Otokrin, parakrin, endokrin etkileri olabilir. Uyarın ne olursa olsun (infeksiyöz/infeksiyöz olmayan) organizmadaki tüm sitokin ağı harekete geçer. Sadece birinin aktivasyonu hepsini tetikler ve aşırı düzeylerde salgılanır. Böylelikle proinflamatuvar sitokinler (TNF, IL-1, IL-12, IFN- α , IL-6 vb.), bunlarla zıt etkileri olan antiinflamatuvar sitokinler (IL-10) ve çözünür haldeki proinflamatuvar sitokin inhibitörler (çözünür haldeki TNF reseptörüne karşı, IL-1 tip 2 reseptörüne karşı ve IL-1ra) salınır (Schlag ve Redc 1996; Paterson ve Webster 2000). Bu proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki denge ne tarafa doğru değişirse inflamasyonun gidişi de o yönde olur. Sitokinler inflamasyondaki en önemli etkilerini endotel, lökosit, fibroblast ve akut faz reaktanları üzerine gösterirler. Endotel aktivasyonu ve endotelyal adezyon moleküllerinin sentezini artırmalarının yanında, birçok kimyasal aracılarn, büyüme faktörlerinin, araşidonik asit metabolitlerin ve nitrik oksitin salınımını arttırırlar. TNF aynı zamanda nötrofillerin etkilerini artırır ve proteolitik enzim deşarjı ile hücre hasarına neden olabilir.

7.Büyüme Faktörleri: Aktive olmuş makrofajlardan salınır ve etkilerini hücre membranındaki reseptörlere bağlanarak gösterirler. Aktif makrofaj, hücre hacmi velizozomal enzim düzeyi artmış olduğundan daha fazla fagosite edebilme yeteneğine sahiptir ve kronik inflamasyonun karakteristiği olan fibrozisi oluşturan çeşitli biyolojik aktif ürünleri salgılar. Bunlar lizozomal proteazlar ve plazminojen aktivatörü gibi proinflamatuvar enzimler, koagülasyon ve kompleman sistemi fragmanları, reaktif

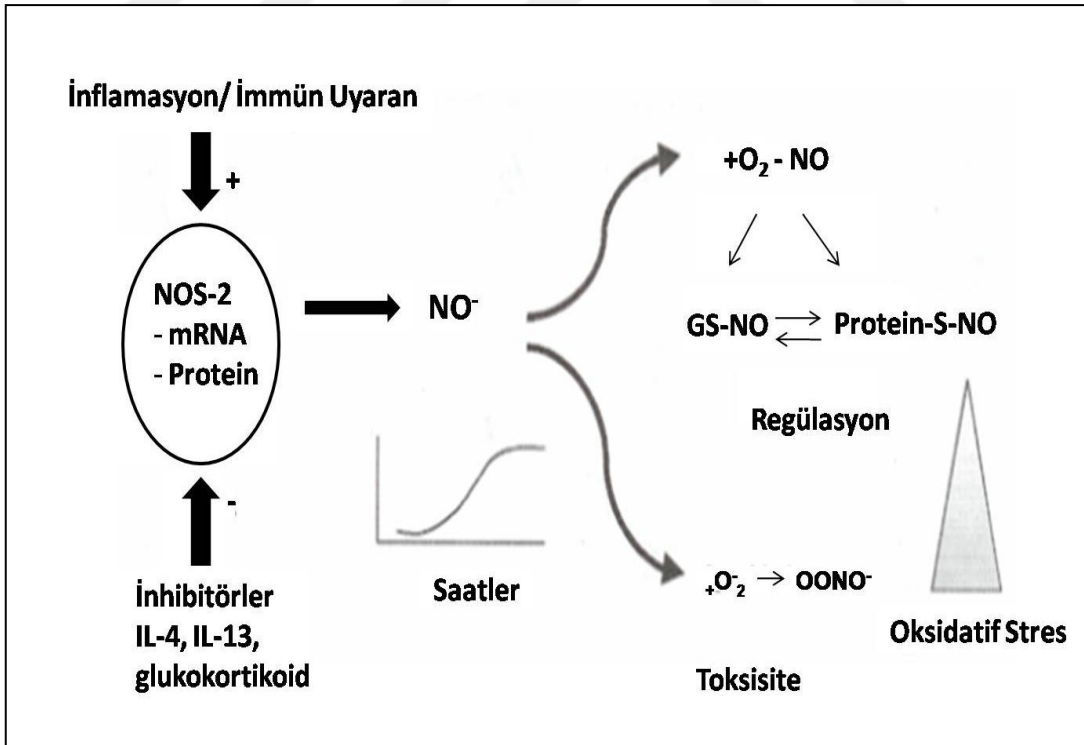
oksijen metabolitleri, AA metabolitleri, TAF ve IL-1 ve TNF gibi sitokinlere ilaveten çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu etkileyen büyüme faktörleridir (Park ve Barbul 2004).

8.Diğer Araçılar:

- a. Nitrik Oksit (NO):** Arjinin aminoasidinin guanido grubunda yer alan nitrojen atomu ile moleküler oksijenin reaksiyona girmesi sonucu oluşan kısa ömürlü bir serbest radikaldir. NO oluşumunu katalize eden enzim ise nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinmektedir. Bu enzimin endotel hücrelerinde e-NOS, nöronlarda cNOS ve indüklenebilir form olarak iNOS olmak üzere, üç tip izoformu bulunmaktadır (Rizk ve diğ. 2004). NO'in mast hücreleri üzerine etkisi Şekil 1.4.'te, immün ve inflamatuvar hücrelerde NO sentezi ve reaksiyonları ise Şekil 1.5.'te gösterilmektedir (Coleman 2002). Nitrik oksidin mast hücre aktivasyonunu inhibe edici fonksiyonu yanında süperoksit radikali ile reaksiyona girerek reaktif radikal türlerinin oluşması ve doku hasarına yol açtığı gösterilmiştir (Kuralay ve Çavdar 2006). NO, sistemik inflamatuvar yanıtın oluşmasında da rol oynayan serbest radikallerle birleşerek reaktif nitrojen türevlerini meydana getirir. Bunların ekstraselüler olarak az miktarlarda salınımı kemotaksis, sitokin ve endotel lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olur. Aşırı salınımı ise vücut için zararlıdır. Endotel hücre hasarı ve vasküler permeabilite artışı, antiproteazların inaktivasyonu sonucu hücrelerin yaralanması gibi olumsuzluklara neden olur (Ward ve diğ. 1998).



Şekil 1.4. Mast hücre kaynaklı vasküler inflamatuvar olaylar (Kuralay ve Çavdar 2006).



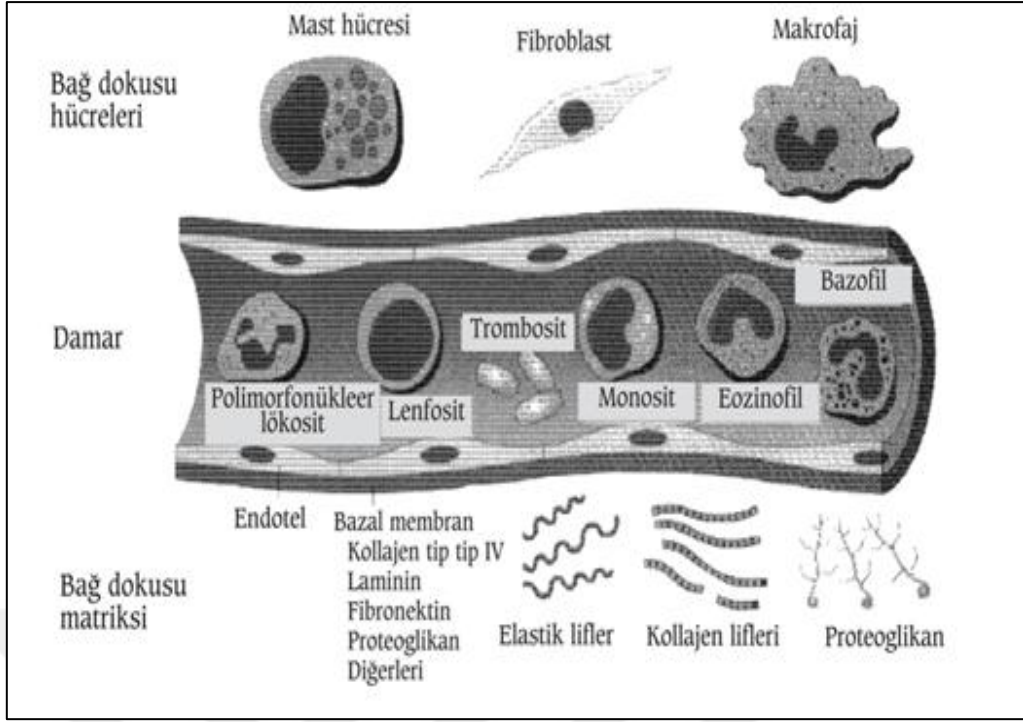
Şekil 1.5. İmmün ve inflamatuvar hücrelerde nitrik oksit sentezi ve reaksiyonları (Kuralay ve Çavdar 2006).

- b. P Maddesi:** Bu nöropeptit sınıfı araçlar, başlıca primer periferik afferent sinirlerin terminal uçlarında bulunur ve ağrı iletiminde primer olarak görevli kimyasal araçlardan biridir.
- c. Hem Oksijenaz 1 (HO-1):** Yıkım yolunda da etkin mikrozomal bir enzimdir. Bu yolda üretilen karbon monoksitin (CO) hız kısıtlayıcı enzimidir. NO üretimi gibi CO üretimi de guanilat siklaz tarafından düzenlenir. Sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde HO-1 aktivitesi veya aktivitesi sonucu ortaya çıkmış CO miktarları bu proteinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkilerine aracılık etmektedir (Zhuang ve diğ. 2005). Ayrıca ödem, lökosit adezyonu ve diğer inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe edici etkileri vardır (Alcaraz ve diğ. 2003).

Koruyucu bir yanıt olan inflamasyonun temel amacı, organizmayı hücre incinmesinin neden ve sonuçları olan nekrotik hücre ve dokulardan temizlemektir. İnflamasyonda salınan kimyasal araçların hücreler üzerine etkileri kompleks ve değişkendir.

1.1.2. Sistemik İnflamasyon

Bağışıklık sistemi inflamasyonun oluşumunda ve devamında hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sisteminin tüm bileşenlerini kullanır. Etkili bir inflamatuvar yanıt güçlü bir bağışıklık sistem varlığında gerçekleşir (Terzioglu 2004). Eğer uyarıcı organizmada inflamasyonu tetiklerken belli bir eşik değeri aşar ise o zaman sistemik inflamasyon bulguları ortaya çıkar. Sistemik inflamasyon kandan beyne geçen hastalık sinyalleri ile ilişkilidir ve beyinle ilişkili olan perivasküler makrofajlar ve mikroglialar aracılığıyla gelişir (Amor ve diğ. 2013). Makrofajlar monositlerden türer, monositler kemik iliğinde büyür ve daha sonra kan dolaşımına girerler. Dolaşımdaki monositler inflamasyonun kimyasal araçlara yanıt verirler. Bu araçlar tarafından aktive edildiklerinde monositler endotelin içinden geçer ve bu geçişten sonra artık kendilerine makrofaj denir. Merkezi sinir sisteminde bulunan makrofajlara ise mikroglialar denilmektedir. Bu perivasküler elemanların aktivasyonu sonucunda sistemik inflamasyon gerçekleşir. Şekil 1.6.'ta sistemik inflamasyonun meydana gelmesi için gerekli olan perivasküler bağ dokusu elemanları gösterilmektedir.



Şekil 1.6. İnflamasyonun meydana gelmesi için gerekli olan perivasküler bağ doku elemanları (Collins 1988; Referanstan değiştirilerek alınmıştır.).

Son zamanlara kadar merkezi sinir sistemi ile periferik bağışıklık sisteminin birbirinden neredeyse tamamen bağımsız işlediği düşünölmekteydi. Fakat son dönemdeki araştırmalar, düşünölenin aksine periferik bağışıklık sistemindeki bazı olayların özellikle sistemik inflamasyonun merkezi sinir sistemindeki süreçleri önemli ölçüde etkileyebileceğine dair veriler sağlamaya başlamıştır (McAllister ve van de Water 2009). Merkezi sinir sisteminde bulunan mikroglialar, astrosit ve oligodendrositler nöronlar için sadece destek ve nutrijyonel fonksiyonları üstlenmez, aynı zamanda, zaman zaman merkezi sinir sisteminin patojenlerden korumak üzere inflamatuvar proselere katkıda bulunurlar. Merkezi sinir sisteminde meydana gelen herhangi bir inflamatuvar yanıt neticesinde mikroglia hücreleri aktive olurlar. Mikroglialar aktive olduktan sonra sitokin, kemokin, nitrik oksit ve reaktif oksijen türleri gibi aracı molekülleri salgırlar. Nöronların mikroglia hücrelerini kontrol ettiği ve inflamatuvar cevap olmadığı durumlarda bunları sessiz pozisyonda tuttuğu bilinmektedir. Herhangi bir inflamatuvar cevap neticesinde, mikroglia aktivasyonu gerçekleştirilerek doğal ve bağışıklık sistem aktive edilir (Amor ve diğ. 2013). Proinflamatuvar sitokinlerin reseptörlerinin en yüksek olduğu beyin bölgeleri hipotalamus, hipokampus ve korteksdir.

1.1.3. Sistemik İnflamasyonun Nörodejeneratif Hastalıklarla İlişkisi

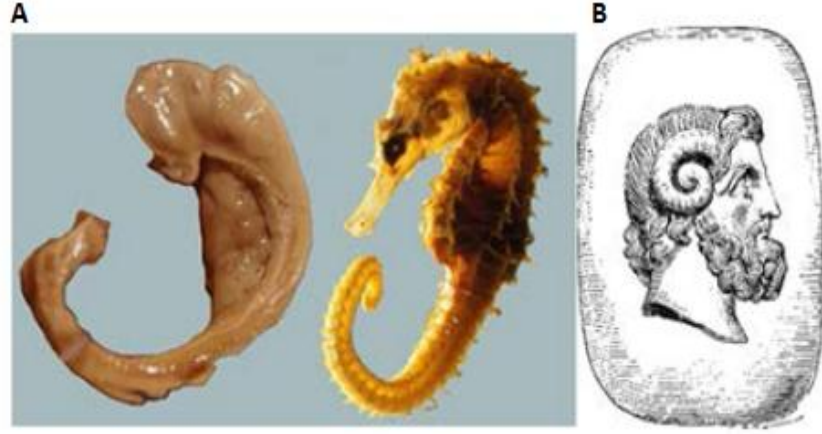
Sistemik inflamasyonun seyri sırasında merkezi sinir sistemi tarafından kontrol edildiği bilinen birçok nörobiyolojik olay gelişmektedir. Hipertermi, hipotermi, uykuya yatkınlık, anoreksi ve hipotalamo-hipofizer-adrenal korteksin aktivasyonu bunlar arasında sayılabilir. Bu değişiklikler temelde adaptif nitelikte olup inflamasyona yol açan uyarana karşı (örneğin; enfeksiyöz mikroorganizmalar gibi) optimal bir savunma yapmaya yöneliktir (Kumar ve diğ. 2003; Majno ve Joris 2004). Ancak, bu süreçte oluşan bazı değişiklikler maladaptif karakterde olabilir ve bunlar nöronal hasara neden olabilirler. Bağışıklık sisteminin disregülasyonunun birçok nörolojik ve psikiyatrik hastalıkla bağlantısı olduğuna dair veriler gün geçtikçe artmaktadır (McAllister ve Patterson 2012). Ayrıca nöral inflamasyonun Alzheimer, Multiple skleroz ve Parkinson hastalıklarındaki rolü de giderek netleşmektedir (Block ve Hong 2005; Lucin ve Wyss-Coray 2009).

Sistemik infeksiyonun veya organizmayı sistemik inflamatuvar cevaba iten herhangi zorlayıcı bir durumun, kronik nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna ve/veya gelişimine katkı sağladığı tahmin edilmektedir (Perry 2004). Alzheimer, Parkinson veya Prion hastalıkları gibi kronik nörodejeneratif hastalıklarda, hastalığın patolojisi direkt olarak inflamatuvar cevapla ilişkilidir ve beyindeki makrofaj popülasyonunun aktivasyonu ile karakterizedir (Town ve diğ. 2005; Bellucci ve diğ. 2011; Maetzler ve diğ. 2011; Mosley ve diğ. 2012). Nörodejeneratif hayvan modellerinin, sistemik inflamasyonu takiben abartılı derecede merkezi doğal bağışıklık cevabı verdiğiine ilişkin kanıtlar her geçen gün artmaktadır (Gabbita ve diğ. 2012; Marchese ve diğ. 2014). Nitekim Alzheimer hastalığıyla ilgili yapılan klinik çalışmalar, sistemik inflamasyona cevap olarak kognitif işlevlerde azalma ve abartılı hastalık davranışı ile ilgili veriler sunmaktadır (Holmes ve Butchart 2011). Bu iletişimin daha iyi anlaşılması Alzheimer hastalığının oluşumuna ve gelişimine neden olduğunu bildiğimiz risk faktörlerini daha iyi açıklamamızı sağlayabilir ve sistemik doğal bağışıklık sisteminin manipülasyonunu alternatif bir tedavi yöntemi olarak sunabilir. Alzheimer hastalığının, beyinde anormal amiloid beta (A β) protein plaklarının ve tau proteininden oluşan nörolif yumaklarının birikimi sonucunda meydana geldiği bilinmektedir. Nitekim Alzheimer hastalığıyla ilgili yapılan klinik çalışmalarda inflamasyonun hastalığa önemli düzeyde katkıda bulunduğu saptanmıştır (Holmes ve Butchart 2011). Örneğin, Alzheimer hastalığının

sistemik inflamasyonun oluşumu sırasında meydana gelen araçlardan biri olan nitrik oksit sentezi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Nitrik oksit sentez ekspresyonuna, müteakip nitrik oksit üretiminin ve ortaya çıkan ürünün Aβ'yi nasıl değiştirdiği henüz bilinmemekle birlikte Alzheimer patolojisine katkıda bulunduğunu ve hastalığın ilerlemesine neden olabileceği saptanmıştır (Kummer ve diğ. 2011). Ayrıca, son çalışmalar kronik nöroinflamasyonun, Parkinson hastalığının patofizyolojisi ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (Bartels ve diğ. 2007; Collins ve diğ. 2012). Parkinson hastalığı vücut hareketini düzenleyen nigrostriatal dopaminerjik (DA) yolun ilerleyici dejenerasyonu ile karakterizedir (Olanowand 1999). Beynin alt kısımlarındaki gri cevher çekirdeklerinin bozukluğuna bağlı bir sinir sistemi hastalığıdır (Jellinger 2001). Aynı şekilde kronik sistemik inflamasyonun neden olduğu hastalıklardan biri olan Multiple skleroz (MS), genellikle genç erişkinlerde gözlenir. Hastalığın %10'luk belirtileri ortaya çıktığında hafifleme gösterse de semptomlar daha da kötüleşir. Multiple skleroz ile ilişkili nörodejenerasyonlar, merkezi sinir sisteminin beyaz beyin dokusunda lezyonlar şeklinde ortaya çıkar. Özellikle otoimmün tepki olduğuna inanılan Multiple sklerozda miyelin tabakası zarar görmüştür (Schonrock ve diğ. 1998; Hill ve diğ. 2004; Rose ve diğ. 2004).

1.2. HİPOKAMPÜS

Filogenetik olarak beynin en eski bölümlerinden biri olan hipokampus frontal kesitlerde C harfi şeklinde görülür (Barr ve Klernam 1988; Songur ve diğ. 2001) (Şekil 1.7.). Dış yüzünün görünümü koçboynuzuna benzediği için önceleri Ammon'un boynuzu anlamına gelen Cornu ammonis adı ile anılan bu oluşuma, sonra denizatına benzerliğinden dolayı hipokampus (hippos=at, kampos=deniz) adı verilmiştir.



Şekil 1.7. A) Hipokampüsün denizatı ile benzerliği **B)** Ammon: Koçbaşı Mısır ilahı (Koc Okudur 2013).

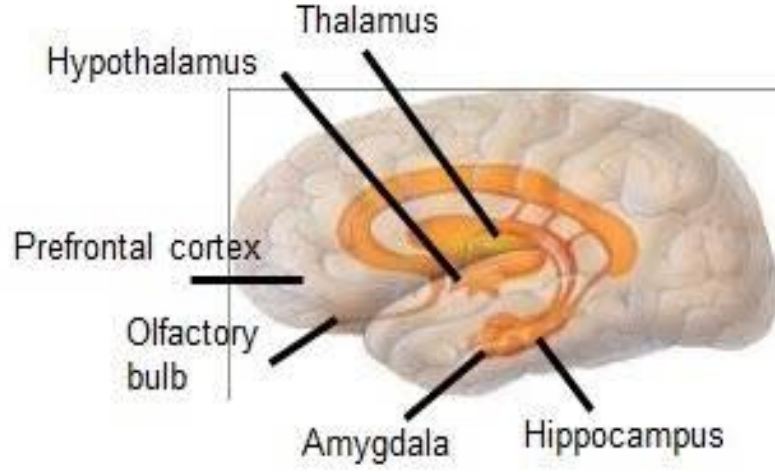
Hipokampüs bir gri cevher tabakası olup, Şekil 1.8.'te görüldüğü gibi lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Yaklaşık 5-8 cm uzunluğunda, ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır (Songur ve diğ. 2001).



Hipokampüs

Şekil 1.8. Hipokampüsün konumu ve şekli (Koc Okudur 2013).

Hipokampüs; prefrontal korteks, septumamigdala, hipotalamusun paraventriküler çekirdeği, gyrus cinguli gibi yapılarla birlikte limbik halkayı oluşturur. Limbik sistem içgüdü ve emosyonel reaksiyonlardan beynin diğer kısımlarına oranla daha fazla sorumludur (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. Limbik sistem (Boeree 2009).

Histolojik olarak hipokampus üç bölüme ayrılmaktadır ve bu üç bölümün tamamına hipokampal formasyon adı verilmektedir. İlk bölüm cornu ammonis esas hipokampus (hippocampus proper) diğer bölümler ise dentat girus ve subikulumdur. Hipokampal formasyon hafızadan ve öğrenmeden sorumludur.



Şekil 1.10. Hipokampusün bölümleri (Boeree 2009).

1.2.1. Hipokampüsün Fonksiyonları

Hipokampüsün karmaşık yapısı ve beyinde bulunan birçok bölge ile yakın ilişki içinde olması hipokampüs fonksiyonunun tanımını zorlaştırmaktadır (Kandel 1979; Cooper 1981; Nolte 1988; Songur 2001; Turkoglu 2005). Görme, işitme, koku, dokunma, iç organ duyuları gibi her türlü duyuşsal uyarı, küçük bir alan dahi olsa, hipokampüsü aktive eder. Hipokampüs ise hypothalamus, ventral thalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Böylece hipokampüs, hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce, limbik sistemi etkileyerek davranışların şekillenmesine neden olur (Brodal 1981). Bundan dolayı hipokampüsün, gelen duyuşsal sinyalleri içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynadığı düşünülebilir (Guyton ve Hall 1996). Yeni bilgilerin depolanma kapasitesi olarak bilinen kısa süreli hafızanın, hipokampüs ile yakından ilgisi bulunmaktadır (Green 1960; Songur ve diğ. 2003). Bu nedenle verbal veya sembolik uzun süreli anıların kalıcı olabilmesi için sağ ve sol hipokampüse gereksinim vardır (Brodal 1981; Carpenter ve Sutin 1983; Guyton ve Hall 1996; Songur 2001). Görsel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda sağ, sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda sol hipokampüs bölgesi daha fazla aktivite göstermektedir (Taner 1999; Kandel ve diğ. 2000).

Günümüzde hipokampüsün nörodejeneratif hastalıklarla yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Songur ve diğ. 2001). Örneğin, Alzheimer hastalarının hipokampüsünde hücre sayısında bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Selkoe 1993). Sağ hipokampüste meydana gelen bir lezyonun görsel hafızada, sol hipokampüste meydana gelen bir lezyonun sözel hafızada kayıp meydana getirdiği rapor edilmiştir (Kandel ve diğ. 2000).

İnsanda nöronların büyük çoğunluğu prenatal yaşamda ikinci trimesterin sonunda oluşur. Nöronal migrasyon gebeliğin ilk haftalarında başlar ve doğum sırasında büyük ölçüde tamamlanır. İnsan beyninin gelişimi doğum öncesi dönem ile ilk altı yaş dolayında oldukça hızlıdır. İlerleyen yaşlarda sinaps sayısında azalma gözlenir. Ancak önceki bilgilerin tersine günümüzde nöronların kendini yenileme veya onarma yeteneği ile yeni nöronların oluşması olarak tanımlanabilecek nörogenezin erişkin dönemde de devam ettiği bilinmektedir. Nörogenezle ilişkili en önemli beyin bölgesi hipokampüstür (Bakırcı 2009; Koc Okudur 2013).

Hipokampusün fonksiyonlarında nöroplastisite çok önemlidir. Merkezi sinir sistemi gerek iç çevreden gerekse dış çevreden gelen uyarılara yanıt verme ve uyum sağlayabilme yeteneğine sahiptir. Nöroplastisite, iç ve dış uyarılara bağlı olarak nöronların ve oluşturdukları sinapsların yapısal özellikleri ve işlevlerindeki değişiklikler olarak tanımlanabilir. Nöroplastisite ile gerçekleşen değişikliklere örnek olarak; dendritlerde dallanmanın azalması veya artması, dendritlerde kırılma, dendrit boylarında uzama, yeni sinaps oluşumu veya mevcut sinapsların ortadan kalkması, sinapsların etkinliğinin değişmesi, nörogenез, nörotrofik faktörlerin etkinliğinde değişimler sayılabilir (Warner-Schmedt ve Duman 2006). Hipokampusün limbik sistemin amigdala başta olmak üzere duygudurum düzenlenmesinde rol oynayan diğer bölgeleri ile sıkı bir iletişim halinde olması da nöroplastisite yönünden çok önemlidir (Warner-Schmedt ve Duman 2006).

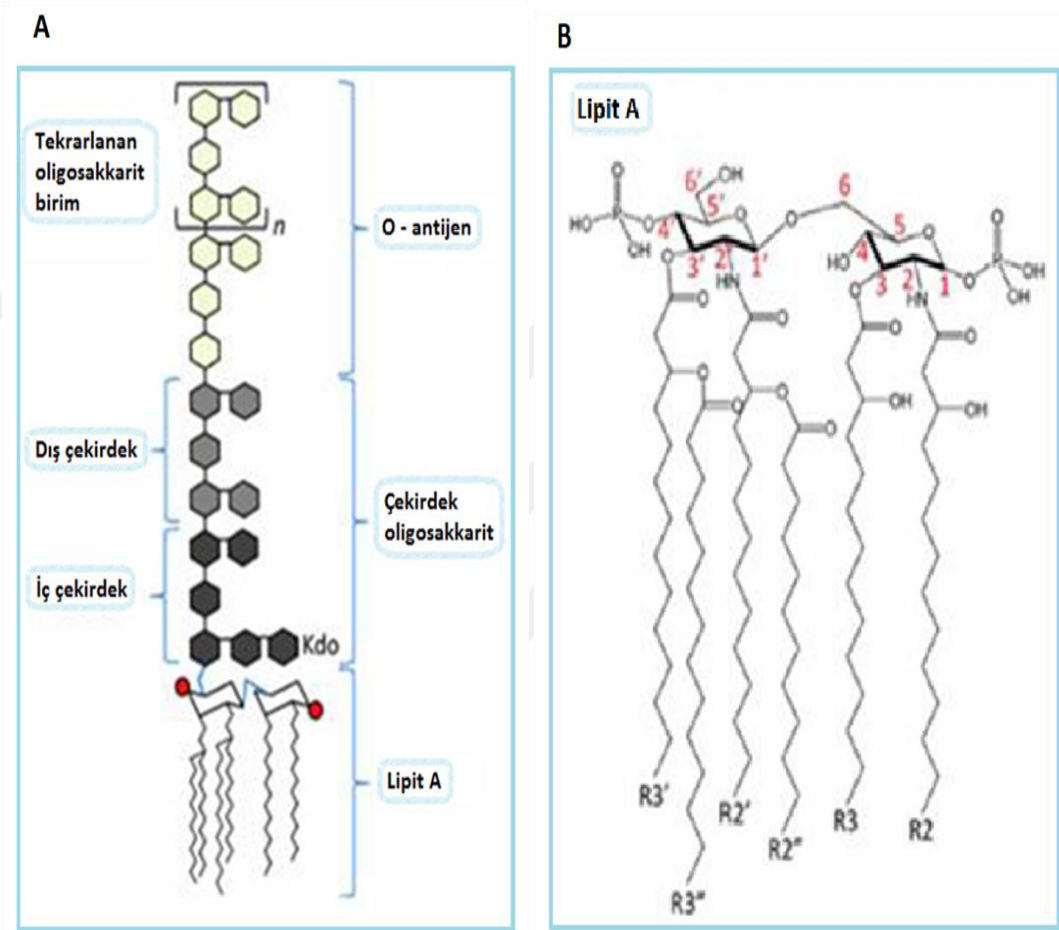
1.3. LİPOLİSAKKARİT

Lipopolisakkarit (LPS), Gram (-) bakterilerin hücre duvarının yapısında bulunan bir endotoksindir. Vasküler sistemde artan LPS miktarı, sitokinlerin salınmasında ve sistemik inflamatuvar cevabın oluşmasında anahtar role sahiptir (Beutler 2002; Özdemir 2014). LPS uygulaması, sistemik inflamasyonu tetiklemekte ve dolaşıma yeterince LPS geçtiğinde, immün sistemin hücrelerini aktive ederek proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olmaktadır. İnflamatuvar yanıt, proinflamatuvar sitokinlerin salınması ile tetiklenmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi, hayatı tehdit eden semptomların görülmesine neden olmaktadır (Damas ve diğ. 1997; Haupt ve diğ. 1999). Geçtiğimiz yıllarda yapılan çalışmalarda, LPS uygulaması ile aktive edilen periferik inflamatuvar cevabın aktivasyonunun hipokampüse bağlı hafızayı bozabileceği gösterilmiştir (Thomson ve Sutherland 2005).

LPS dışında lipoteikoik asit (LTA), peptidoglikan ve mannan gibi Gram-pozitif bakterilerin ve fungusların hücre duvarı bileşenleri de immün yanıtı güçlü bir şekilde uyarmakta ve enfeksiyona yanıt olarak proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu tetiklemektedir (Ulevitch ve Tobias 1995).

LPS, birbirlerine kovalent olarak bağlanmış, moleküle polar ve amfipatik özelliklerini kazandıran üç değişik bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1.11a.) (Temiz 2014).

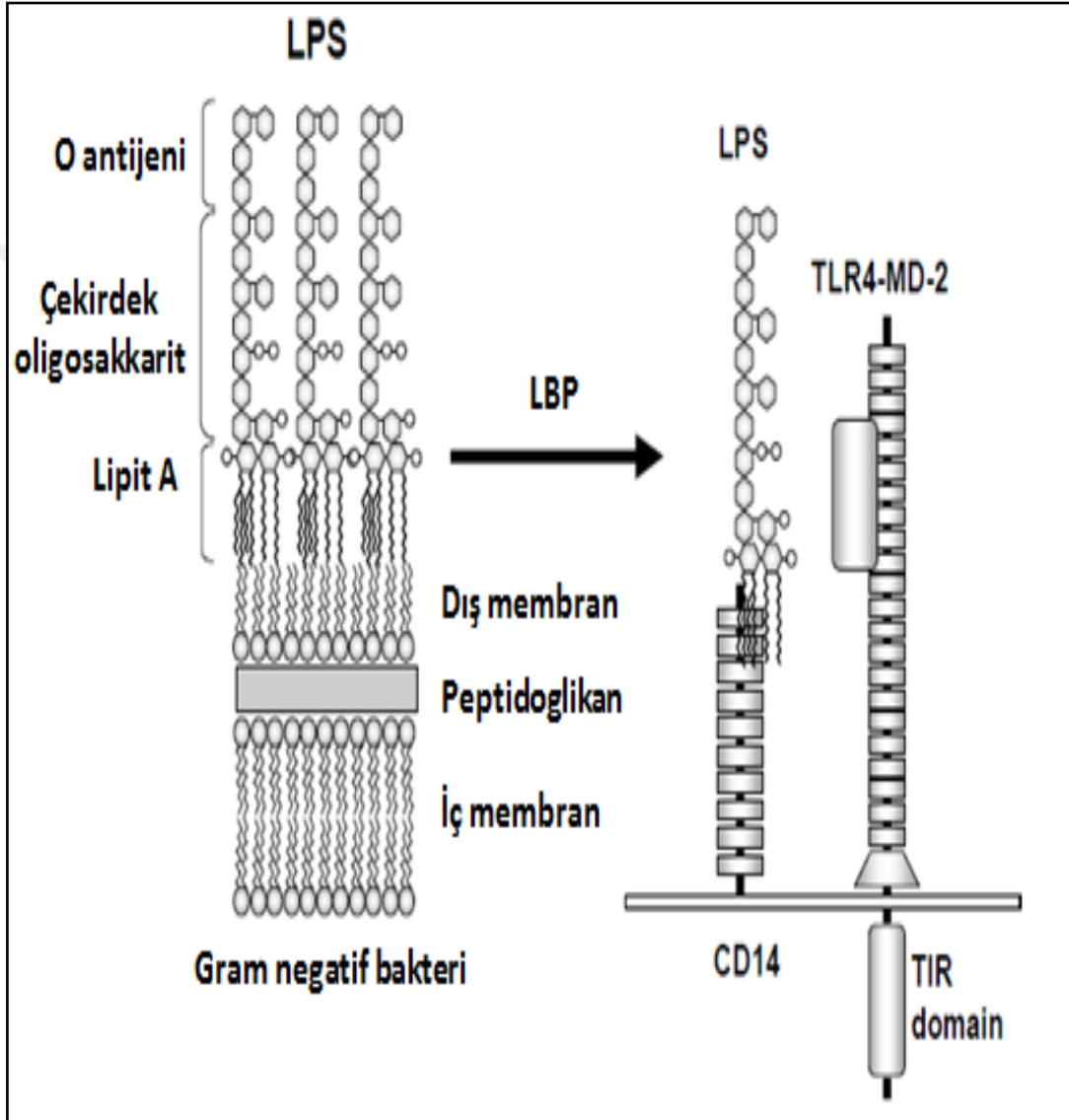
- 1) Endotoksin olarak da bilinen lipit A
- 2) Çekirdek oligosakkarit
- 3) Tekrarlayan oligosakkarit zincirlerinden oluşan O antijeni.



Şekil 1.11. Lipopolisakkarit ve lipit A'nın yapısının şematik gösterimi **A) LPS** ve **B) Lipit A** (Temiz 2014).

LPS'nin toksisitesi ile immünolojik etkisinden sorumlu olan ve yapının en iç tabakasını oluşturan immünoaktif, biyoaktif lipit A bileşeni, gram-negatif bakterilerde gözlenen toksik etkilerin birçoğundan sorumlu olan ve "endotoksin" olarak da bilinen yapıdır. Şekil 1.11b.'te görüldüğü üzere 6 adet açıl grubu ile 2 adet glukozamin molekülüne bağlıdır (Kitchens ve diğ. 1998) ve konak hücredeki toll-benzeri reseptör (TLR) 4 ve myeloid differentiation (MD) 2 reseptörleri tarafından tanınarak güçlü bir immün yanıt oluşturmaktadır (Kawai ve Akira 2010).

Lipit A'nın başlıca etkisi, makrofajları etkinleştirmesi ve inflamasyona neden olan olayları tetiklemesidir (Sari ve diğ. 2014). Gram-negatif bakterilere veya LPS gibi bakteriyel ürünlere yanıt olarak başlayan inflamatuvar süreçlerde rol alan başlıca reseptör TLR4 olmasına karşın, 3 farklı ekstraselüler aksesuar proteinde görev almaktadır (Şekil 1.12) (Gangloff ve Gay 2004).



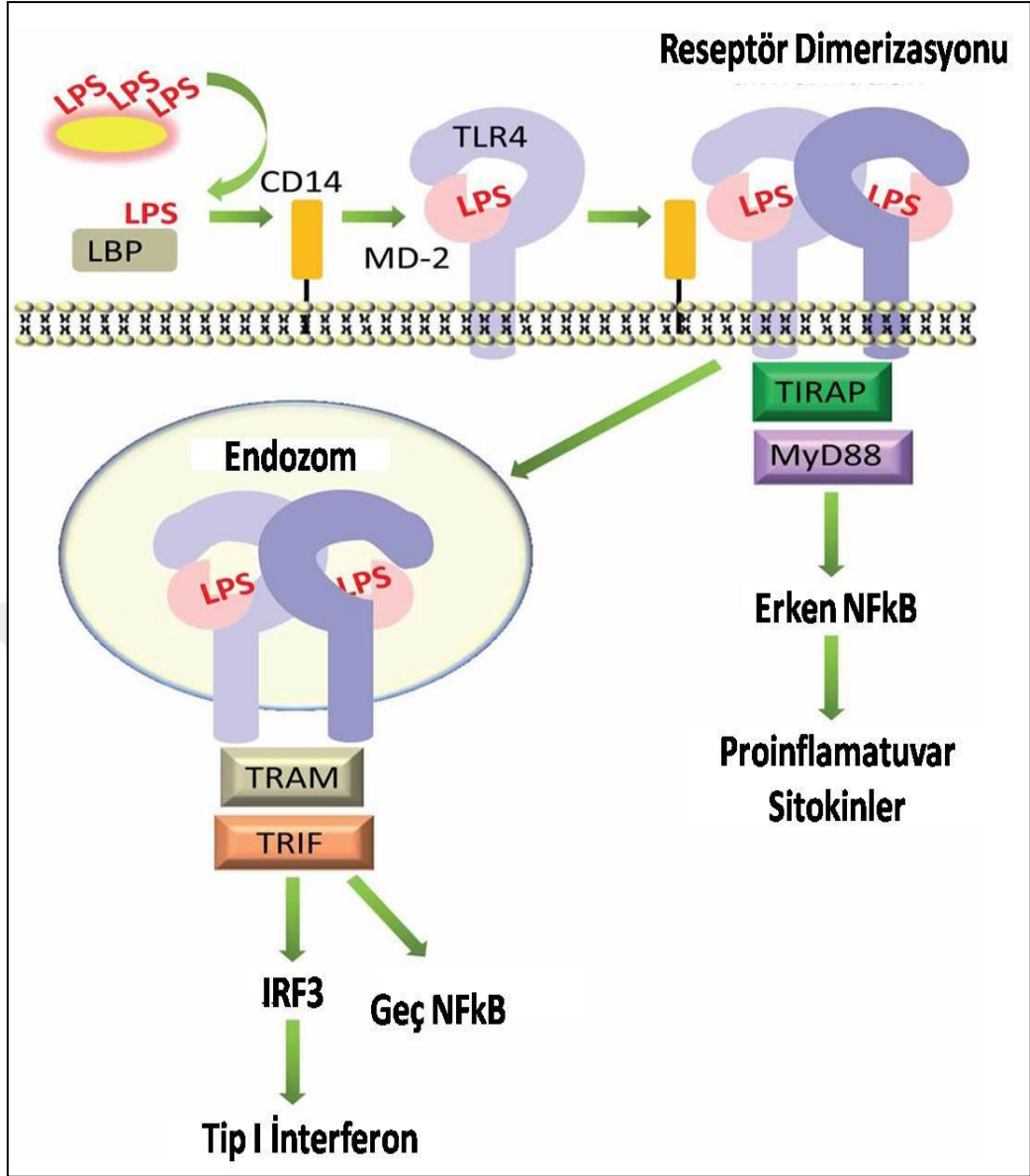
Şekil 1.12. LPS sinyal iletiminde görevli olan aksesuar proteinler (*CD*, farklılaşma kümesi; *LPS*, lipopolisakkarit; *LBP*, LPS-bağlayıcı protein; *MD*, myeloit farklılaşma; *TIR*, toll/*IL-1*-reseptör homolog bölgesi; *TLR*, toll-benzeri reseptör) (Temiz 2014).

LPS ve gram-negatif bakterilere verilen hızlı inflamatuvar yanıtın indüksiyonunda (Jack ve diğ. 1997) rol alan aksesuar proteinlerden biri olan lipopolisakkarit bağlayıcı protein (*LPS bağlayıcı protein*; LBP), hepatositler tarafından sentezlenip dolaşıma verilen LPS'nin lipit A kısmına bağlanan (Tobias ve diğ. 1995) ve lipit transferaz etkinliğine sahip bir serum glikoproteinidir. Lipit transferaz etkinliği ile bakteri hücre duvarında bulunan LPS'nin *farklılaşma kümesi* (CD) 14 reseptörlerine transferine aracılık etmektedir (Schumann ve diğ. 1990). CD14 reseptörü miyelomonosit, makrofaj ve polimorfonükleer lökositlerde eksprese edilen LPS sinyal iletiminde rol alan aksesuar proteinlerden bir diğeridir (Wright ve diğ. 1990). TLR4, LPS ile başlayan sinyal ileti olaylarında yer alan, TLR ailesinin bir üyesi olan tip I transmembran proteinidir (Kang ve Lee 2011). TLR4'ten farklı olarak CD14'ün hücre içi olayları başlatabilen sitoplazmik bileşeni yoktur.

Şekil 1.13'te LPS'nin sinyal iletimini göstermektedir. LPS, bakteri hücre duvarlarından LBP tarafından ekstrakte edilip serumda LBP tarafından taşınmaktadır. LBP, LPS'yi dolaşımda çözülmüş bir protein halinde bulunan veya makrofaj hücreleri gibi immün sistem hücrelerinin membranlarında glikozil-fosfotidilinozitol ile bağlı halde bulunan CD14 reseptörlerine transfer etmektedir. CD14 reseptörleri hücre içi sitoplazmik bölgesinin olmaması nedeniyle sinyal iletimini başlatamamaktadır. CD14, TLR4-MD-2 reseptör kompleksine LPS sunmakta ve bu reseptör kompleksinin dimerize forma dönüşerek etkinleşmesine aracılık etmektedir. LPS'nin bağlanmasının ardından TLR4-MD-2 kompleksi ikinci bir TLR4-MD-2 reseptör kompleksi ile dimerize olarak hücre içi TIR bölgesi aracılığıyla adaptör proteinlerini etkinleştirmektedirler (Lu ve diğ. 2008). TLR4 reseptörleri *myeloid farklılaşma faktör 88* (MyD88)'e bağımlı ve *toll-interlökin 1 reseptör alanı içeren adaptör protein- indükleyici interferon-β* (TRIF)-bağımlı olmak üzere 2 farklı yol ile sinyal iletimini başlatmaktadır. MyD88'e bağımlı yolda TLR4-MD-2 reseptör kompleksinin dimerizasyonu ile etkinleşen *toll-interlökin 1 reseptör alan içeren adaptör protein* (TIRAP) ve MyD88 gibi adaptör proteinler (Kagan ve Medzhitov 2006), özgül tirozin kinazlar ile serin/treonin kinazların etkinleşmesine aracılık ederek birbirlerini izleyen bir dizi olayları tetiklemektedir. Bu sinyal ileti yolu, diğer transkripsiyonel etkinleştiriciler ile birlikte inhibitör κB (*inhibitörü κB* ; I κB)'nin fosforilasyonu, ubiquitinasyonu ve degradasyonuna yol açarak NF- κB 'nin serbest hale gelmesine, nükleer membran bağlayıcı bölgeleri ile nükleer membrana bağlanarak nükleusa translokasyonuna aracılık etmektedir. İnflamasyona aracılık eden pıhtılaşma

faktörleri, sitokinler, kemokinler, nitrik oksit sentaz (NOS), kompleman sistemi ve diğer akut faz proteinlerinin genleri, promotör bölgelerinde NF- κ B bağlayan alanlara sahiptir (Reitsma ve diğ. 2003; Cristofaro ve Opal 2006). TLR4 reseptörlerinin etkinleşmesi ile başlayan bu sinyal ileti yolu, bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'in etkinliğinin artması, TNF- α ile IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve inflamasyonda rol oynayan enzimlerin oluşumunda ve/veya etkinliğinde artma ile sonuçlanmaktadır (Takeuchi ve Akira 2010). TLR4'ün endozomal internalizasyonu bir diğer transkripsiyon faktörü olan IRF3'ün etkinliğini artıran TRAM ve TRIF gibi farklı adaptör proteinlerin etkinleşmesine aracılık etmektedir. Bu yol ile tip I interferon üretimini artırarak da NF- κ B'in geç dönem etkinleşmesine yol açmaktadır (Şekil 1.13.) (Kawai ve Akira 2011).





Şekil 1.13. LPS sinyali (CD, farklılaşma kümesi; LPS, lipopolisakkarit; LBP, lipopolisakkarit bağlayıcı protein; MD, myeloid farklılaşma; MyD, myeloid farklılaşma faktör; TLR, toll-benzeri reseptör; TIRAP, toll-interlökin 1 reseptör alanı içeren adaptör protein; TRIF, toll-interlökin 1 reseptör alanı içeren adaptör protein-indükleyici interferon- β ; TRAM, TRIF-iliği adaptör molekül) (Temiz 2014).

1.4. HİPOTERMİ

İnsan ve hayvanlarda, ısı regülasyonu hayatın devam ettirilmesi için önemlidir. Normal vücut sıcaklığı, genellikle 36-37 °C arasında kabul edilmekte ve vücut sıcaklığının 35 °C'in altına düşmesi hipotermi olarak tanımlanmaktadır (Witte ve Sessler 2002). Hipoterminin hafif, orta ve ağır olmak üzere üç farklı formu vardır (Özüçelik 2002).

Hafif Hipotermi; vücut ısısı 34-35 °C arasındadır. Özellikle ellerde ve ayaklarda başlayan üşüme hafif koordinasyon bozukluğu ve güçlü titremeler meydana gelir. Hipotermi derinleştikçe hafıza kaybı, konuşma bozukluğu, yürümede zorlanma ve bilinç değişiklikleri olur.

Orta Derece Hipotermi; vücut ısısı 30-33 °C arasındadır. Tüm vücut enerji metabolizması ve fonksiyonlarında yavaşlama olur. Tüm dokularda O₂ tüketimi ve CO₂ üretimi azalmıştır. Titremeler kaybolmuştur.

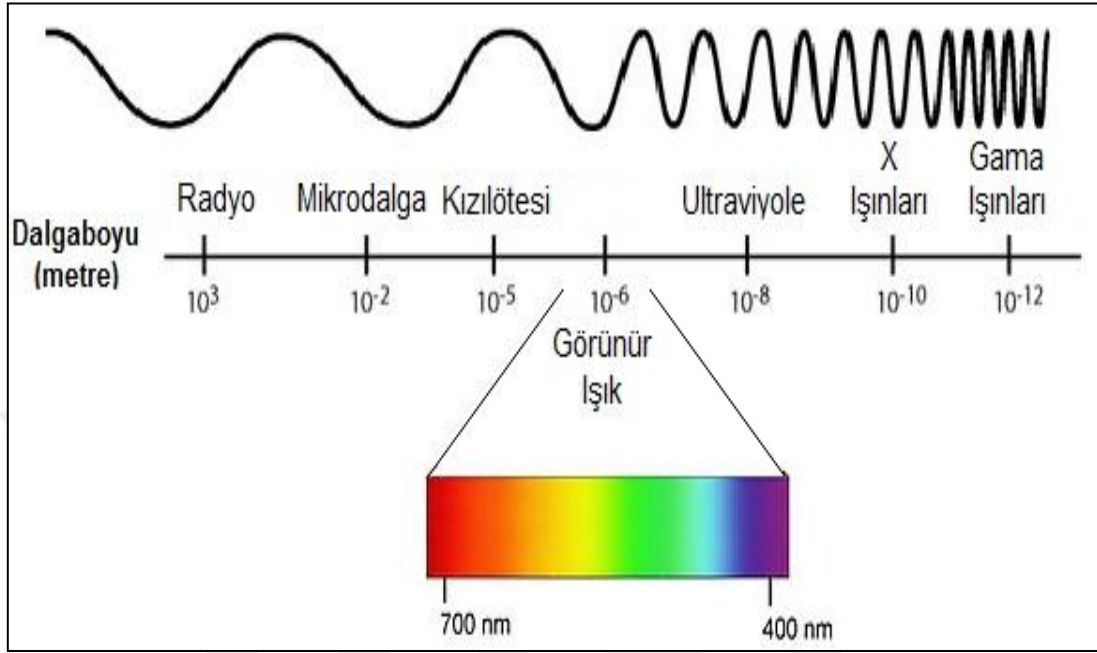
Ağır Hipotermi; vücut ısısı 30 °C'nin altındadır. Titreme yoktur ancak bu dönemde hayatı tehdit eden ciddi sorunlar ortaya çıkar (Weinber 1993; Klainer ve Mongillo 1996).

Genel olarak ısı yapımı ve ısı kaybı arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan hipotermi cilt hastalıkları, ilaç yan etkileri, metabolik durumlar, nörolojik hastalıklar veya nöromuskuler yetersizlik kaynaklı ortaya çıkmaktadır. Bazen ise cerrahi müdahale sırasında ameliyathane şartlarına ve kullanılan malzemelere bağlı olarak spontan ya da çeşitli uyarılara bağlı olarak da oluşabilmektedir (Yılmaz 1997). Örneğin; LPS enjeksiyonu, deney hayvanlarında immünolojik, endokrin, metabolik ve nörodavranışsal bir dizi biyolojik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Patojen istilasına karşı organizmanın oluşturduğu bu stratejiler akut-faz tepkimeleri olarak ifade edilir (Hart 1988; Kushner ve Rzewnicki 1997). Ateş ve/veya hipotermi akut faz tepkimelerinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Kluger 1991; Rothwell 1997; Dogan ve diğ. 2002). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki periferik tümör nekrozis faktörü (TNF)- α salınımı LPS uyarımlı hipotermi başlangıcını tetiklemektedir (Waage 1987).

1.5. SPEKTROSKOPİNİN TEMELLERİ

Spektroskopinin araştırma konusu elektromanyetik ışınla madde arasındaki etkileşimdir. Spektroskopi, bir maddedeki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında soğurulan, saçılan veya yayılan elektromanyetik ışınların ölçülmesi ve yorumlanması olarak tanımlanabilir (Pekin 2013). Elektromanyetik ışın, uzayda çok büyük hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışınların en çok karşılaşılan türleri, gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız kızılötesi ışınlarıdır. Elektromanyetik ışın, dalga

frekanslarına göre yedi grupta sınıflandırılır; radyo dalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi, görünür ışık, ultraviyole, x ışınları ve gama ışınları (Genç İnan 2014) (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. Elektromanyetik spektrum (Genç İnan 2014).

Işınımın birden çok temel özelliğinden (dalga boyu, periyodu, frekansı, hızı, dalga sayısı gibi) söz edilebilir:

Dalga boyu (λ); bir ışının dalga hareketinin ard arda gelen iki tepe noktası arasındaki uzaklığıdır.

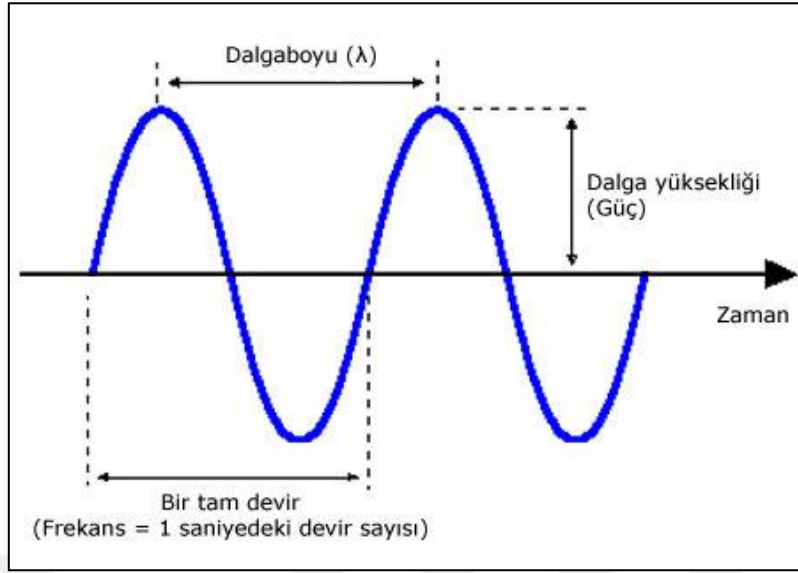
Frekans (ν); birim zamandaki titreşim sayısıdır.

Periyot (P); birbirini izleyen iki dalga tepesinin belli bir noktadan geçmesi için gerekli süredir. Birimi saniyedir.

Hız (c); ışının birim zamanda aldığı yoldur. Her çeşit ışının vakumdaki hızı aynıdır ($c = 3 \cdot 10^{10}$ cm/sn).

Dalga sayısı (ν); birim uzaklıktaki (örneğin 1 cm'teki) dalga sayısıdır.

Şekil 1.15.'te dalga boyu ve frekans ilişkisi gösterilmiştir (Pekin 2013).



Şekil 1.15. Dalga boyu ve frekans ilişkisi (Pekin 2013).

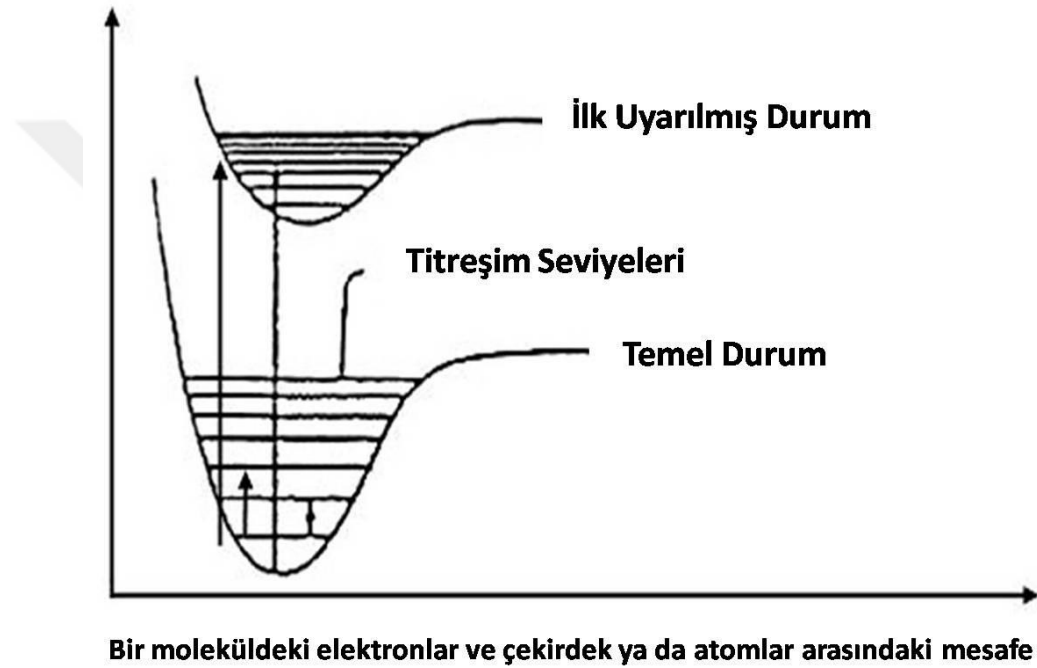
Bir ışının dalga özelliğinin yanında, parçacık özelliği de vardır ve bu parçacıkların her birine, foton denir. Işığın şiddeti, ışık demeti içindeki foton sayısı ile ilgilidir ve enerji birimleriyle ölçülür. Işık enerjisinin absorpsiyonunda, molekül kuantlanmış (değişken) miktarda enerji alıp vereceğine göre, belli düzeydeki bir ışınımı absorblar. Bu bileşiğin bütün molekülleri için geçerlidir ve böylece spektrumda absorpsiyon çizgileri görülür. Fakat belli bir elektronik seviyede olan her molekül aynı zamanda değişik titreşim ve dönme seviyelerinde olduğundan bunlar spektruma absorpsiyon bantları ve spektrum pikleri şeklinde yansır. Fotonlar belli bir enerjiye sahiptirler ve bu ışınımın frekansını belirler. Işınımın sahip olduğu enerji yukarıda verilmiş olan temel özellikleri dikkate alınarak bulunur. Buna göre bir molekülün ışınımı absorblaması durumunda enerji değişimi aşağıdaki denklem ile bulunur (planck sabiti: $h = 6.6 \times 10^{-34}$ joule, $c = 3,0 \times 10^8$ ms^{-1}).

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

(1.1.)

Bu hesaplamalardan; hem dalga sayısı hemde frekansın direkt enerjiyle ilgili olduğu sonucuna varılabilir (Pekin 2013).

Elektromanyetik ışımaya madde ile etkileşime geçtiğinde, frekans değişiklikleriyle birlikte niteliksel olarak davranışları da değişir. Elektromanyetik ışımaya ve madde arasındaki etkileşim; elektronlar veya atomların enerji düzeyleri arasında geçişe neden olabilir. Elektronlar, bir enerji düzeyinden diğer bir enerji düzeyine geçişleri sırasında enerjiye ihtiyaç duyar. İlk uyarılmış durum ile temel durum arasında, olası elektron geçişleri meydana gelebilir (Freifelder 1982). Şekil 1.16.'ta tipik bir enerji düzey diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 1.16. Enerji düzey diyagramı (Freifelder 1982).

Her bir spektroskopik yöntemin uygulanışı sırasında, fotonların sahip oldukları ve yukarıda sözü edilen enerjiler, moleküller tarafından farklı amaçlarla absorblanırlar. Absorblanan ışınların spektrofotometre tarafından saptanıp, değerlendirilmesiyle elde edilen veriler (spektrum) absorpsiyonu yapan maddeye ilişkin analizi sonuçlandırmamıza yardımcı olur.

1.5.1. Kızılötesi Spektroskopisi

İnfrared (IR) spektroskopisi, kızıl ötesi ışınlar ile analizlenen molekül arasındaki etkileşimi esas alarak geliştirilmiş spektroskopik yöntemlerden birisidir. Bir

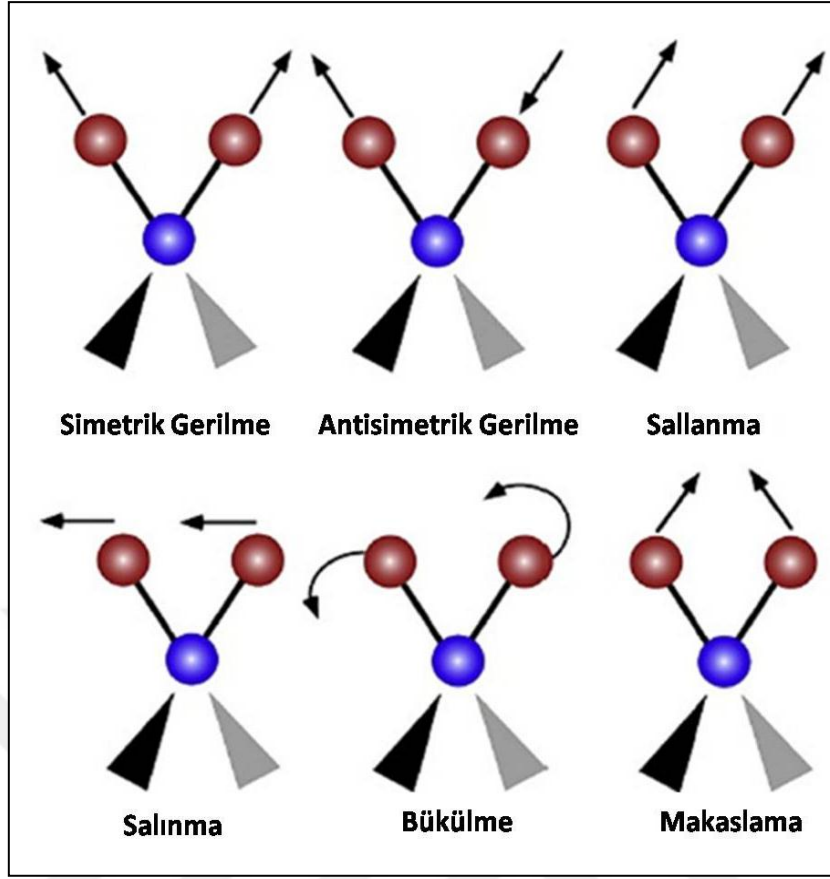
moleküldeki elektron veya atomların temel durumu ile ilk uyarılmış durumu arasındaki geçiş kızılötesi bölgesindeki ışınların soğurulması olur. Kızıl ötesi spektrumu, moleküldeki özel fonksiyonel grupların kimyasal bağlarındaki karakteristik titreşimler tarafından üretilir. Bir bileşiğin titreşim spektrumu o bileşiğe özgüdür ve optik izomerler dışında hiçbir bileşiğin titreşim spektrumu bir başkası ile aynı değildir. Her bir fonksiyon grubunun teşhisi o grup için belirgin olan titreşim dalga sayısı ile sağlanır. Değişik fonksiyonel gruplara ait titreşim dalga sayıları, daha önce literatürde yer verilen bilgilerden veya atlaslardan faydalanılarak tanımlanmaya çalışılır (Stuart 1997).

Elektromanyetik spektrumların kızılötesi kısmı yakın, orta ve uzak kızılötesi olmak üzere 3'e ayrılır (Smith 1999) (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Kızılötesi spektral bölgeleri (Smith 1999).

Bölge	Dalga sayısı Aralığı (cm^{-1})	Dalgaboyu (μm)
Yakın-IR	14000-4000	0.8-2.5
Orta-IR	4000-400	2.5-25
Uzak-IR	400-4	25-1000

IR spektroskopisi moleküldeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçer ve moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. IR spektrumlarındaki absorpsiyon bantlarını tanımak için, çeşitli titreşim şekillerine verilen isimleri bilmek gerekir. IR alanda gönderilen ışınların absorblanmasına temel oluşturan ve enerji gereksinimini yaratan hareketler bu titreşim hareketleridir. Bunlar gerilme titreşimleri ve eğilme titreşimleri olarak iki grupta toplanırlar (Genç İnan 2014). Gerilme titreşimleri; iki atomun ortak eksenleri boyunca birbirine yaklaşma ve uzaklaşma hareketlerinden kaynaklanır. Antisimetrik ve simetrik gerilme olmak üzere iki çeşidi vardır. Eğilme titreşimleri; atomlar arasındaki bağ açılarındaki değişmelerinden kaynaklanır. Sallanma, salınma, bükülme ve makaslama gibi çeşitleri vardır. Bir kompleks molekülündeki atomlar Şekil 1.17.'te görüldüğü gibi 6 değişik yolla titreşebilir (Genç İnan 2014).

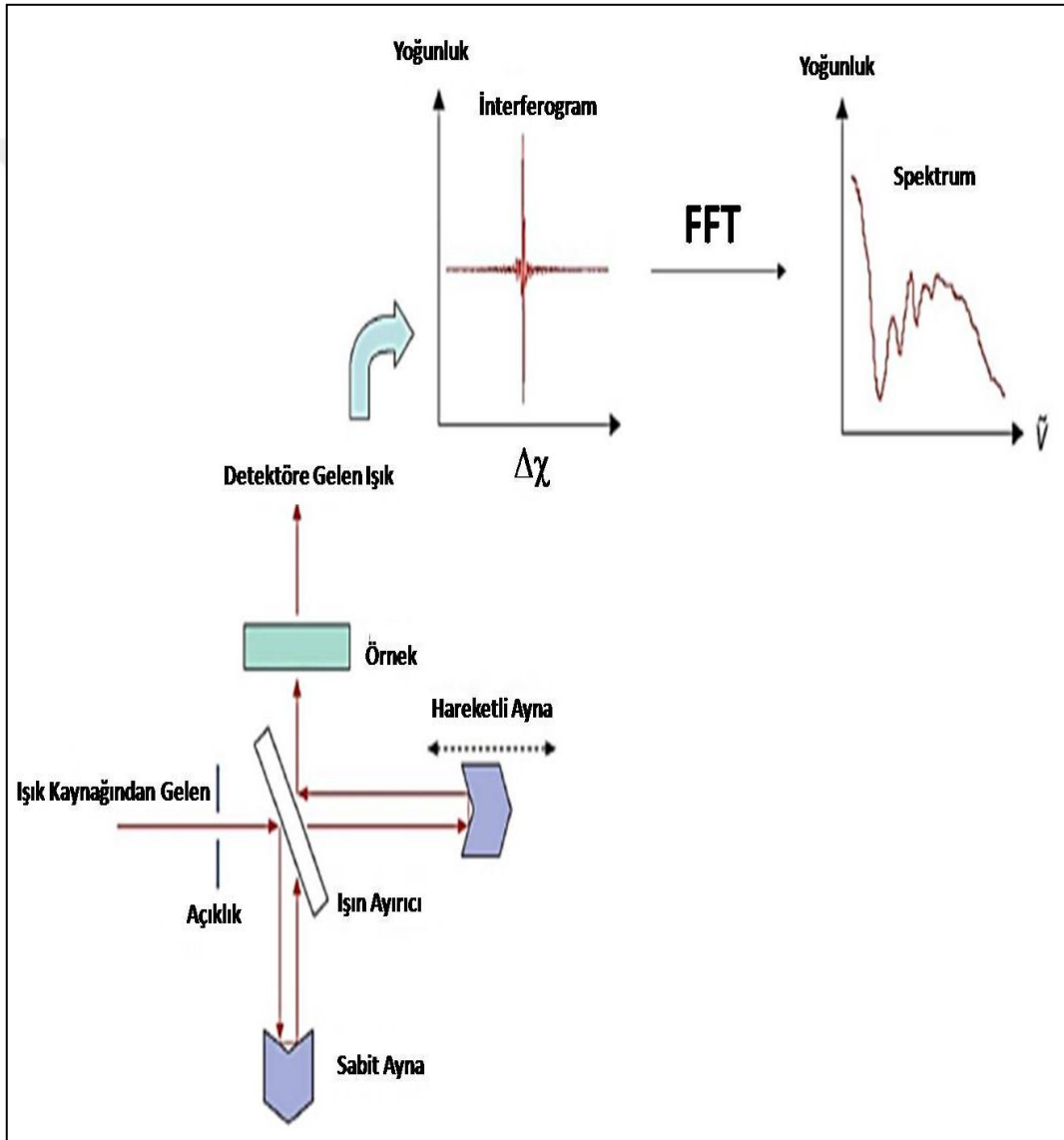


Şekil 1.17. IR emilim spektrumunda titreşim hareketleri (Marcelli 2012).

1.5.2. Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, matematiksel bir metod olan bir Fourier transformasyonu uygulayarak veriyi zaman alanından frekans alanına aktaran özel bir kızılötesi spektroskopisi tekniğidir. Bir FTIR spektrometre, interferogramı toplar ve dijital hale getirir, Fourier Dönüşüm uygular ve bilgisayar monitöründe spektrum olarak gösterir. FTIR spektrometresi, ilk olarak bir Michelson interferometresi kullanarak örnekten gelen sinyallerin bir interferogramını toplar. Daha sonra bu interferograma Fourier Dönüşümü uygulayarak bir spektrum elde eder. İnterferometre, gelen kızıl ötesi ışınları bir ışın ayırıcı kullanarak iki optik ışına ayırır. Bir ışın sabit alandaki düz bir aynaya gider. Diğer ışın, ışın ayırıcıdan ayrılıp çok kısa bir mesafeye hareket eden düz bir aynaya gider. İki ışın kendi aynalarından geri gelirler ve ışın ayırıcısında tekrar karşılaştıklarında birleşirler. İnterferometredeki sinyal, birbirleriyle birleşen bu iki ışının sonucudur. Elde edilen bu sinyal interferogram olarak adlandırılır (Gerwert 2010).

Bir interferogramda, kaynaktan gelen sinyaller her kıvıı ötesi frekans hakkında bilgi verir. Böylelikle, aynı zamanda bütün frekanslarda ölçölmüş olur. Spektrum veri analizi için frekanslar kullanılır. Fourier Dönüşümü, interferogramı absorbans-frekans spektrumuna dönüştürür. Bu dönüşüm spektrometre bilgisayarı tarafından gerçekleştirilir ve dalgaboyuna karşı absorbans grafiği olarak gösterilir ya da genellikle daha ileri analizler için frekans (cm^{-1}) olarak sunulur. Şekil 1.18.'te FTIR spektroskopisinin çalışma prensibi verilmiştir.



Şekil 1.18. Fourier dönüşüm kıvııötesi (FTIR) spektrometresi (Gerwert 2010).

1.5.3. FTIR Spektroskopisinin Avantajları ve Biyolojik Uygulamaları

FTIR spektroskopisi, incelenmek istenen örneğin fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan hassas bir tekniktir. Elde edilen parmak izi özelliği taşıyan bilgiler, moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesine ve dolayısıyla farklı yapılarının ayırt edilmesine olanak sağlar. Bu bilgiler, öncelikle doğru bant tanımlamalarının yapılması, sonrasında ise ilgilenilen bantların konumu, bant şiddetleri ya da bantların altında kalan alan ve bant genişliği değerlerinin hesaplanması ile elde edilebilir. Bant şiddeti ve alanı maddenin konsantrasyonu hakkında bilgi verirken, bant konumu düzen/düzensizlik hakkında, bant genişliği ise dinamik hakkında bilgi verir (Cameron ve Charette 1981; Casal ve Mantsch 1984; Cakmak ve diğ. 2003; Toyran ve Severcan 2003). Dolayısıyla, FTIR spektrumlarından bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısı ile sistemde mevcut moleküllerin belirlenmesi, bunların konsantrasyonu gibi pek çok bilgi elde etmek mümkündür.

FTIR spektroskopisi ile kullanılan örneğe zarar vermeden biyolojik sistemler hakkında değerli bilgiler elde edilebilir (Rigas ve diğ. 1990; Andrus ve Sitrickland 1998; Boyar ve diğ. 2003; Severcan ve diğ. 2005; Toyran ve diğ. 2006; Dogan ve diğ. 2007; Walsh ve diğ. 2007; Garip ve diğ. 2009; Severcan ve diğ. 2012). Bu teknik kullanılarak çok düşük konsantrasyondaki örnekler hem *in vivo*, hem *in vitro* koşullarda incelenebilir. Protein, lipit, DNA, RNA, karbohidrat gibi moleküllerin fonksiyonel gruplarındaki değişimler ve dolayısı ile bu moleküllerdeki değişimler hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (Stuart 1997; Severcan ve Haris 2012). FTIR spektroskopisi sağladığı yüksek sinyal-gürültü oranı ile düşük absorbanza sahip sulu protein çözeltilerinin de incelenebilmesine olanak sağlamaktadır (Pelton ve Mclean 2000). Özellikle proteinlerin ikincil yapı ve miktarları hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir (Haris ve Severcan 1999; Nilsson 2004; Severcan ve diğ. 2004). FTIR spektroskopisi ayrıca biyolojik çalışmalar açısından lipitlerin diğer biyomoleküllerle etkileşimleri, kanser, diyabet, nörodejenerasyon gibi patolojik durumların tanı ve teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Boyar ve diğ. 2003; Severcan ve diğ. 2005; Toyran ve diğ. 2006; Bozkurt ve diğ. 2007; Toyran ve diğ. 2007; Bozkurt ve diğ. 2010; Severcan ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010; Turker ve diğ. 2011; Bozkurt ve diğ. 2012; Severcan ve Haris 2012). Bu nedenlerle, çalışmamızda hipokampusün incelenmesinde

ve dokularda meydana gelen değişimlerin tespitinde bu teknik kullanılmıştır.

Kızılötesi spektroskopisinin yaygın bir şekilde kullanılmasının altında yatan nedenler çeşitlidir:

- örnek hazırlama işlemlerinin daha kolay olması;
- örneklerin gaz, sıvı ve katı hallerinde incelenebiliyor olması;
- nitel yorumların yapılabiliyor olması ve
- verilerin hızlı bir şekilde elde edilebilmesi.

FTIR spektroskopisi, biyolojik çalışmalar açısından lipitlerin diğer biyomoleküllerle etkileşimleri, proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi, kanser, diyabet gibi patolojik durumların, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların doku ve membran düzeyinde tanım ve teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Mantsch 1984; Liu ve diğ. 1996; Boyar ve Severcan 1997; Fukuyama ve diğ. 1999; Severcan ve diğ. 2000; Ramesh ve diğ. 2002; Toyran ve diğ. 2006; Dogan ve diğ. 2007; Leskovjan ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010; Severcan ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011; Cakmak ve diğ. 2012, Severcan ve Haris 2012).

1.6. ÇALIŞMANIN AMACI

Bağışıklık sistemi ile merkezi sinir sistemi arasındaki ilişki nörobilimdeki en yeni çalışma konuları arasındadır. Organizma, immunolojik veya infeksiyöz bir tehdit algıladığında, sistemik inflamatuvar yanıtı oluşturur. Bu süreç uygun bir şekilde sonlandırılmazsa maladaptif bir karakter kazanır ve birçok klinik patolojinin oluşumundan sorumlu hale gelebilir. Sistemik inflamasyonun seyri sırasında merkezi sinir sistemi tarafından kontrol edildiği bilinen birçok nörobiyolojik olay gelişmektedir. Ateş, uykuya yatkınlık, anoreksi ve hipotalamo-hipofizer-adrenal korteksin aktivasyonu bunlar arasında sayılabilir. Şimdiye kadar obezite, kanser gibi hastalıklarla ilişkisi ortaya konmuş olan inflamasyon, son yıllarda Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir.

Dünya sağlık örgütü 2040 yılı itibari ile nörodejeneratif hastalıkların, şu anda dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık ikinci ölüm nedeni olan kanserin önüne geçeceğini öngörmektedir. Ülkemiz, artan nüfus ve yaş ortalaması göz önüne alındığında bundan yoğun şekilde etkilenecektir. Bu hastalıkların altında yatan temel moleküler mekanizmalar net değildir. Bu nedenle ülkemizde ve dünyada nörodejeneratif hastalıkların tanısı ve tedavisi ile ilgili çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır. Ancak şu ana kadar kullanılan yöntemlerin hemen hemen hepsi teşhis yöntemleridir ve bu hastalıkların etiyojisi ya da patolojisi ile ilgili çok az fikir vermektedir.

Literatürdeki çalışmalar nörodejeneratif hastalıkları sistemik inflamasyonla ilişkilendirmekte fakat sistemik inflamasyonun merkezi sinir sisteminde ne tip moleküler kompozisyonel değişimlere yol açmış olabileceğinden net olarak bahsetmemektedir. Sistemik inflamasyonun merkezi sinir sistemindeki etkisiyle ilgili çalışmalar yeterli değildir; var olanlar da elektrofizyolojik ve geleneksel biyokimyasal tekniklerle gerçekleştirilmiş olup sınırlı derecede bilgi sunmakta, dokuda patolojiye yol açmış olabilecek moleküler, yapısal ve kompozisyonel değişimlere değinmemekte, bununla ilgili yeterli bilgi vermemektedir.

Sistemik inflamasyonun modellenmesi için sıklıkla, gram negatif bakteri duvarının bir komponenti olan lipopolisakkarit (LPS) kullanılır. Daha önce yapılan çalışmalarda, rodentlerde LPS uygulamasından sonra beyin eksitabilitesinin zaman bağımlı olarak değiştiği ve nöbetlere karşı yatkınlığın arttığı gözlenmiştir (Akarsu ve diğ. 2006). Ayrıca, bu değişikliğin LPS tarafından indüklenen termoregülatuar yanıtlarla ilişkili olduğu gözlenmiş ve hipotermi başlangıç döneminde epileptik nöbet eğiliminin arttığı (Akarsu ve diğ. 2012) gösterilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda, sıçanlarda LPS enjeksiyonuyla oluşturulan sistemik inflamasyonun merkezi sinir sistemindeki etkilerini ortaya çıkarmak için hipotermik yanıt sırasında nöronal eksitabiliteyi kontrol eden önemli nöroanatmik alanlardan biri olan hipokampüste meydana getirdiği moleküler değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

FTIR spektroskopisi tekniği kullanarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada;

- sistemik inflamasyonun beynin hipokampus dokusundaki doymuş ve doymamış lipitler, proteinler ve nükleik asitlerin miktarları, yapıları ve fonksiyonları üzerinde meydana getirdiği etkilerin moleküler düzeyde ortaya çıkarılması,

- hipokampüs dokusunu oluşturan hücrelerin membran akışkanlığı ve düzenindeki değişimlerin incelenmesi,
- nöronal hasara yol açtığı bilinen lipit peroksidasyon düzeyinin ortaya çıkarılması,
- sistemik inflamasyonun nöronlardaki lipit ve protein gibi makromoleküllerin dağılımları üzerine etkisinin, değişik makromoleküllerin birbirlerine göre konsantrasyon oranları (lipit/protein, doymamış/doymuş lipit oranı gibi) ile bu parametrelerde meydana gelen değişimlerin gösterilmesi,
- protein ikincil yapısındaki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. SARF MALZEMELER

Potasyum Bromür (KBr) Merck firmasından, Ksilen, Ketamin ve LPS Sigma firmasından temin edilmiştir.

2.2. HAYVAN DENEYLERİ

Çalışma kapsamındaki hayvan deneyleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan, Wistar albino (8-12 haftalık) erkek sıçanlar 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubu ve LPS uygulanan grup olmak üzere 7'şer denek içeren iki grup oluşturuldu.

Çalışmada kullanılan sıçanlar, 7 gün süreyle aynı ortamda ve fiziksel koşullarda (20 ± 1 °C ortam sıcaklığı ve 12 saat karanlık/aydınlık döngüsünde), aynı diyetle beslendi. Bu sürenin sonunda sıçanların periton boşluğuna cerrahi olarak steril koşullarda ve genel anestezi altında telemetrik implantlar yerleştirildi. Bu şekilde sıçanların vücut sıcaklıkları biyotelemetrik yöntemle herhangi bir hareket kısıtlaması olmaksızın takip edilebildi (Akarsu ve Mamuk 2007). Sistemik inflamasyonun oluşturulması için uygulanan işlemler sırasıyla aşağıda verilmiştir;

1. Basamak: Biotelemetrik İmplantasyon Cerrahisi: Cerrahi işlem yapılacak olan ve ağırlıkları 220–280 g arasında değişen erişkin erkek Wistar Albino sıçanlara aseptik koşullarda genel anestezi uygulandı (Ketamin, 80 mg/kg, ip ve Ksilasin 10 mg/kg, ip). Kalibrasyonları yapıp kaplanmış olan telemetrik implantlar sıçanların peritoneal boşluğuna yerleştirildi. Bu şekilde sıçanların vücut sıcaklığının herhangi bir hareket kısıtlaması olmaksızın takip edilmesi amaçlandı. Operasyondan sonra hayvanlar kafeslerine alındı ve kafesler sinyal alıcının üzerine konumlandırıldı. İmplantların çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için verilerin implanttan sinyal alıcı aracılığıyla bilgisayara aktarılıp aktarılmadığına bakıldı. Uyanan hayvanlar deney hayvanı barınağına götürülerek en az 7 gün dinlendirildi.

2. Basamak: Hayvan Denevlerinin Yapılması: 7 gün sonra herhangi bir anormallik görünmeyen hayvanların ağırlık ölçümleri yapılarak denevlere hazır olup olmadıklarına karar verildi. Ağırlıkları operasyon öncesi düzeye ulaşan hayvanların sağlıklı ve deneye uygun olduğu kabul edildi. Bu hayvanlar deney hayvanı barınağından alınıp nropsikofarmakoloji laboratuvarına getirildi ve yaklaşık 2-3 saat boyunca ortama adapte olmaları beklendi. Bu sırada kafesler sinyal alıcıların üzerine konularak veri toplanacak bilgisayara gerekli konfigürasyonlar girildi. Yaklaşık 3 saat sonra hayvanlar ortama adapte ve vücut sıcaklıkları stabilize olduktan sonra deneye başlandı.

1.Deney Grubu (Kontrol): Salin Denevleri: Salin 5 ml/kg hacminde, ip. olarak enjekte edildi. Enjeksiyonlar yapıldıktan 1 saat sonra (hipoterminin giriş kısmına zamansal olarak tekabül eden süre) hayvanlar dekapite edildi. Beyin, soğuk zemin üzerinde kafatasından izole edildi. Çıkarılan beyinler buz kalıp üzerinde -80 °C'deki soğutucuya götürülerek yaklaşık 2-3 dakika bekletildi. Daha nceden +4 °C'deki soğutucuda bekletilen sagittal kesim matriksinde beynin orta hattının 2'şer mm. sağ ve sol tarafından sagittal kesitler alındı. Kesitler alüminyum folyoya ezilmeden sarıldı ve asansörlü portatif sıvı azot tankları içine konuldu. Alınan kesitler, FTIR spektroskopisi çalışmalarında kullanılmak üzere azot tankı içerisinde Düzce Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'ne getirildi ve buradaki -80 °C'deki dondurucuda kullanılacağı zamana kadar saklandı. rnek taşınması sırasında ve denevlerden önce örneklerin tekrar tekrar dondurulup çözünmesinden kaçınıldı.

2.Deney Grubu: Lipopolisakkarit Denevleri: *E. coli* O111:B4 serotipi LPS 250 µg/kg, ip. olmak üzere enjekte edildi. Enjeksiyonlar yapıldıktan sonra hayvanların vücut sıcaklığı hipoterminin giriş kısmına tekabül eden 0,5 °C'lik bir düşüş gösterdiğinde hayvan dekapite edildi. (Periton içi LPS uygulamasından yaklaşık 40-60 dakika sonra vücut sıcaklığı düşmeye başlamakta ve bu akut sistemik inflamasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.) Sıanın beyni yukarıda tarif edildiği gibi çıkarıldıktan sonra kontrol grubundaki hayvanların beyinlerine uygulanan işlemlerin aynılarını bunlara da uygulandı.

2.3. FTIR SPEKTROSKOPİSİ ÇALIŞMALARI

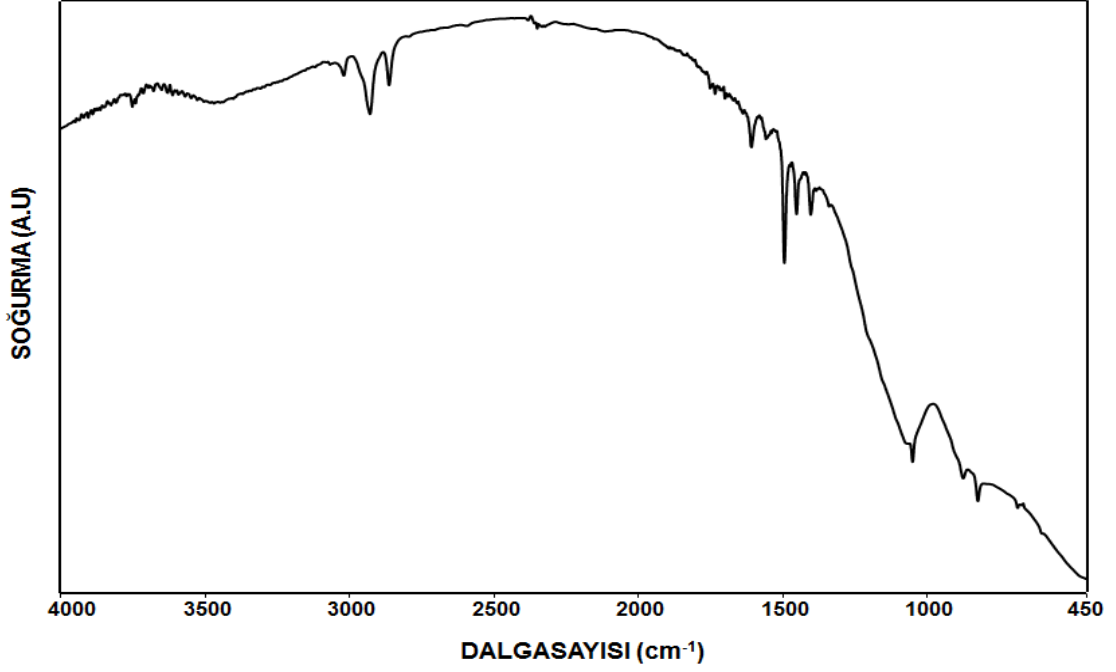
2.3.1. Spektral Verilerin Toplanması

FTIR çalışmalarında kullanılmak üzere sıçan hipokampüs örnekleri aşağıda verilen prosedür takip edilerek hazırlandı:

- -80°C 'deki soğutucudan çıkartılan hipokampüs dokularına, içeriğindeki suyu uzaklaştırmak için 24 saat boyunca Freeze-Drier cihazında dondurarak kurutma işlemi uygulandı.
- Pelet hazırlamak için kullanılacak olan KBr 100 mg halinde tartıldı ve mevcut su buharını uzaklaştırmak için etüv de 24 saat boyunca bekletildi.
- Sıçan hipokampüs dokuları sıvı azot yardımıyla agat havanda toz haline getirildi.
- Toz haline getirilen hipokampüs örneğinden 1 mg tartılarak 100 mg KBr ile agat havanda homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı. 1/100 ağırlık oranında karışım hazırlandı.
- Karışım paslanmaz çelikten özel bir cihaz içinde, hidrolik preste 100 kg/cm^2 'lik bir basınç altında 5 dakika bekletildi.
- Uygulanan basınç sayesinde katı bir KBr diski (yaklaşık 13 mm çapında ve 0,3 mm kalınlığında) elde edildi.

Hazırlanan KBr diskleri örnek tutucusunun içinde FTIR spektroskopisine yerleştirildi. Infrared spektrumları, $4000\text{-}450 \text{ cm}^{-1}$ aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 100 çekim sayısı kullanılarak Perkin Elmer Spectrum Two FTIR spektrometresi ile gerçekleştirildi. Sonuçların güvenilirliğini artırmak için her hipokampüsten 3 pelet hazırlandı yani her örnekten 3 kez çekim yapıldı ve bu 3 çekimden elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak detaylı analizler ve istatistiksel testler bu spektrumlar üzerinde gerçekleştirildi.

Atmosferdeki CO_2 ve H_2O 'tan kaynaklanan soğurma bantları, incelenen doku örneğinin soğurma bantlarını kamufle edebilir. Dolayısıyla, bu atmosferik su buharının etkisini azaltmak amacıyla FTIR spektrometresinden sürekli kuru hava geçirilmektedir. Buna ek olarak, örnek çekimi öncesinde havanın çekimi yapılmakta ve elde edilen spektrum bilgisayar programı aracılığıyla örnek spektrumundan matematiksel olarak çıkarılmaktadır. Sözü edilen hava spektrumu Şekil 2.1.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Atmosferik havanın 4000-450 cm^{-1} bölgesindeki FTIR spektrumu (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (göreceli birim) kısaltılmışıdır.).

2.3.2. FTIR Spektroskopisi Analiz Yöntemleri

FTIR spektroskopisinde örnekler için spektrumlardaki bantların şiddeti veya bantın altında kalan alan, genişlikleri ve konumlarındaki kayma gibi parametrelerdeki değişimlerin analiz edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle çalışılan gruplarda, hipokampus dokusundan elde edilen, normalize edilmemiş ham ortalama spektrumlarından bant dalga sayısı, bant genişliği ve bant alan analizleri yapıldı. Hipokampüste LPS uygulamasına bağlı moleküler konsantrasyonlarda meydana gelen değişimleri saptamak amacıyla her bir molekülü karakterize eden spektral bantların bant alanları hesaplandı. Çünkü spektral banta ait sinyal şiddeti ve/veya alan değerinin artması, adı geçen grubun konsantrasyonunun artması; sinyal şiddeti ve/veya alan değerinin azalması da o grubun konsantrasyonunun azalması anlamına gelmektedir (Freifelder 1982; Alo ve diğ. 1998). Çalışılan tüm örneklerde membran lipidlerinin akışkanlığında meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla lipid kaynaklı CH_2 antisimetrik ve simetrik bantlarının genişlikleri hesaplandı. Ayrıca, yapısal parametreler olan lipid açıl zincir esnekliği hakkında bilgi veren lipid düzeni (order) ve düzensizliği (disorder) hakkında bilgi edinmek için aynı bantların dalga sayısı değerleri analiz edildi

(Cameron ve Charette 1981; Casal ve Mantsch 1984). Moleküllerin konsantrasyonlarındaki birbirlerine göre olan değişimlerini tespit etmek için spektral bant alan oranları da hesaplandı. Gruplar arasındaki spektral değişimleri görsel olarak göstermek amacıyla, her gruba ait örneklerin ortalaması alınarak, baseline düzeltilmesi yapıp normalize edildi. Söz konusu spektral analizler Perkin Elmer Spektrum Two analiz programı ile yapıldı.

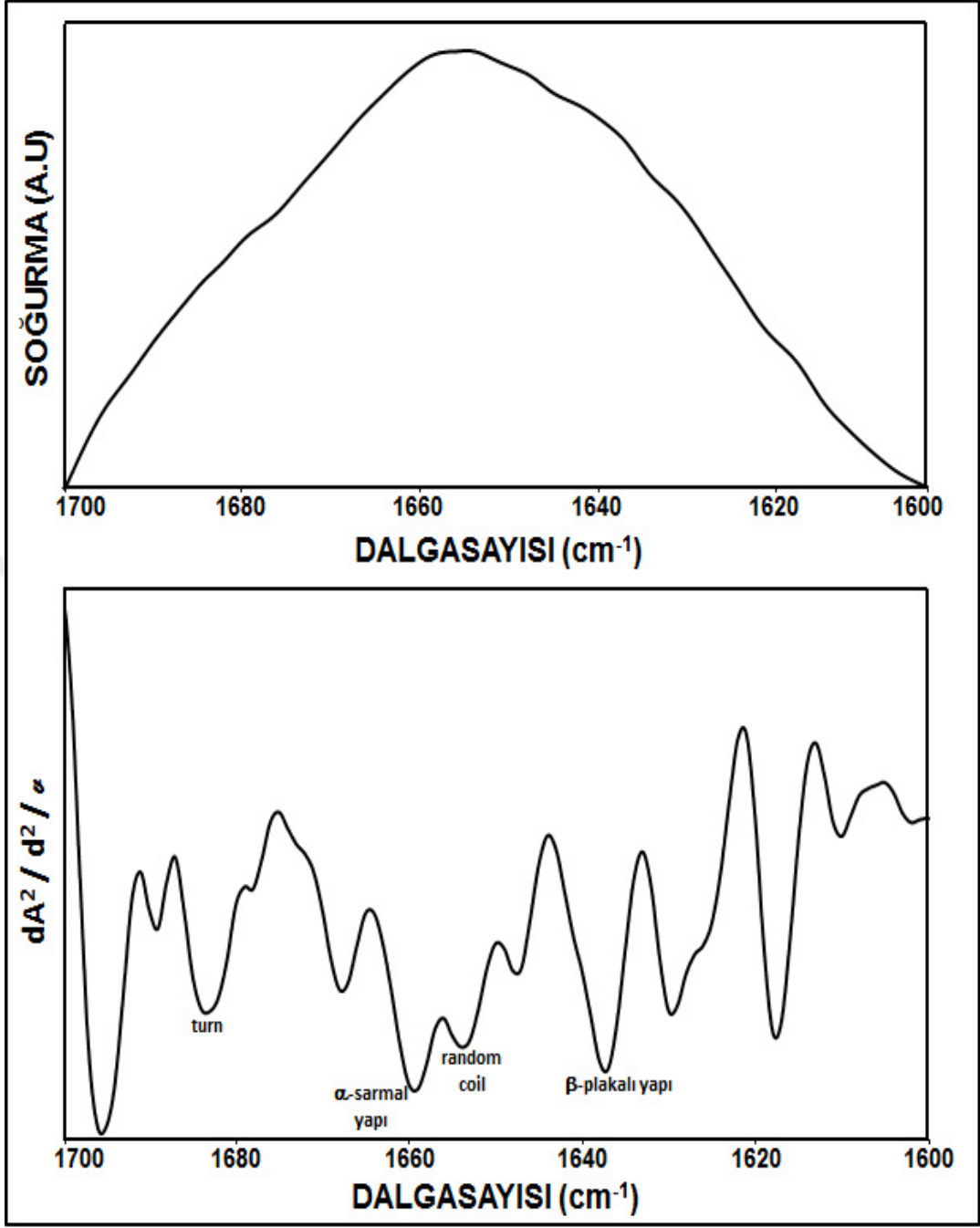
2.3.3. Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA)

Bu çalışmada hiyerarşik kümeleme metodu örneklerin ayrımı için uygulanmıştır. Hiyerarşik kümeleme analizi için OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics, Ettlingen, Germany) programı kullanıldı. Kümeleme analizi için spektrumların ikincil türevi alındı ve analiz 3100-450 cm^{-1} spektral bölgesinde gerçekleştirildi.

Kümeleme analizi bir tür çok değişkenli teknikler grubu olup, temel amacı nesnelere (birimleri) sahip oldukları karakteristik özellikleri baz alarak gruplamaktır. Kümeleme tekniği örnekler ya da değişkenler arasındaki benzerliklerin gösterilmesi ve yorumlanmasına yönelik sıkça kullanılan kemometrik yöntemlerden birisidir. Kümeleme analizi, nesnelere küme içerisinde çok benzer biçimde, kümeler arasında farklı olacak biçimde kümeler. Kümeler arasındaki farklılık heterojenite değerine göre belirlenir. Kümeleme analizi ile benzer örnekler aynı grup altında toplanabilmektedir.

2.3.4. FTIR Spektrumlarından Protein İkincil Yapı Tahmini

FTIR spektrumlarının 1700-1600 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yer alan amid I bantı ayrılmamış bantlar içermektedir ve bu nedenle geniş bir banttır. Bu banta ikincil türev-vektör normalizasyon metodu uygulanarak hipokampüs dokusundaki, protein ikincil yapı değişimleri belirlendi. Şekil 2.2.'te bir hipokampüs doku örneğinde amid I protein bantı ve ikincil türev spektrumu görülmektedir. İkincil türevde bantların tepe konumu minimum olarak yer almaktadır. Bant tanımları şekil üzerinde gösterilmiştir. İkincil türev spektrumu üzerinden okunan bantların sinyal şiddetleri değerleri, protein ikincil yapı değişimleri hakkında göreceli bilgi vermektedir.



Şekil 2.2. Hipokampus dokusunun 1700-1600 cm^{-1} arası örnek soğurma ve ikincil türev spektrumları.

2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

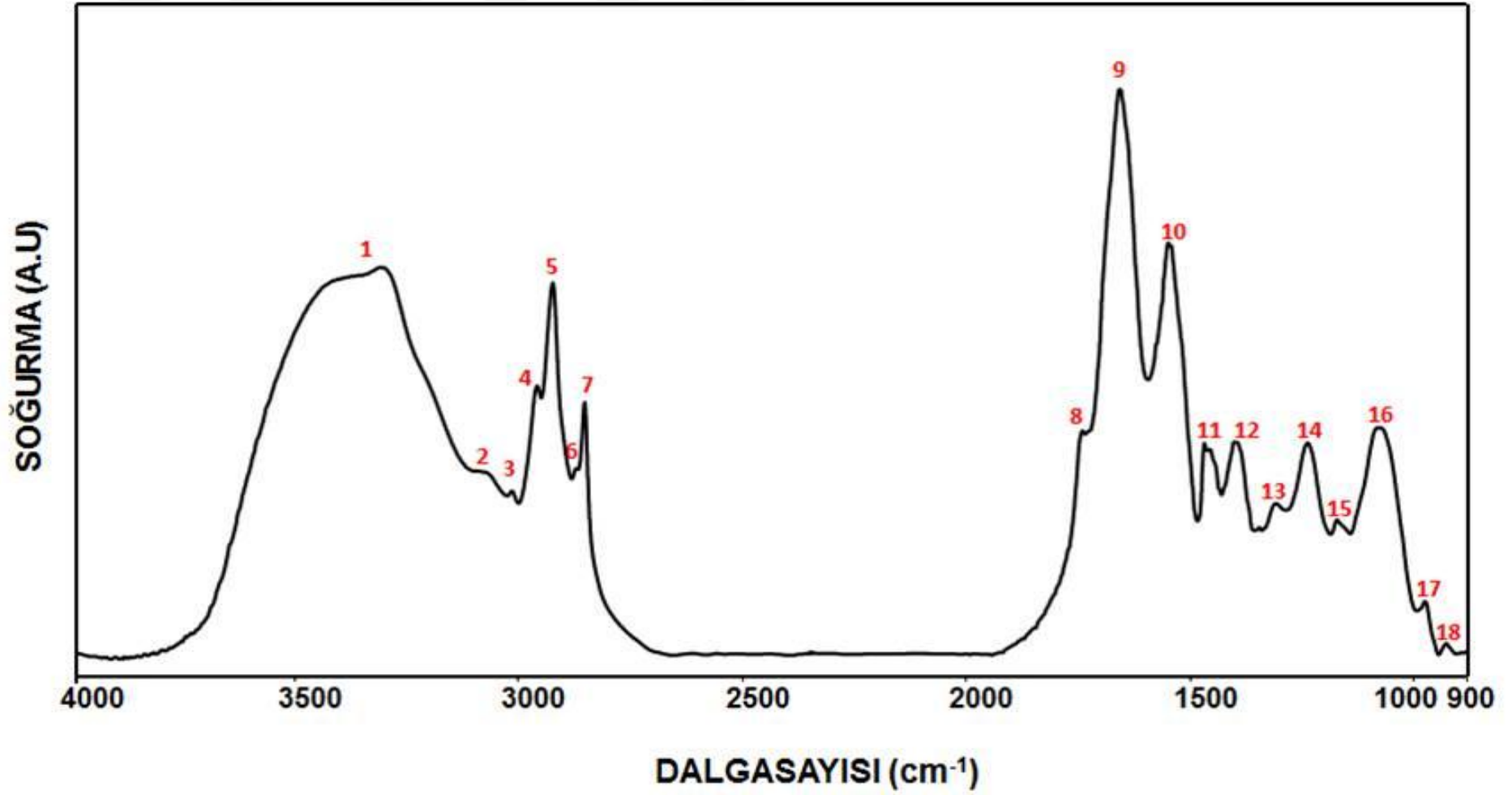
Kontrol ve LPS grupları arasındaki değişimler ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığının hesaplanması için Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ şeklinde belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. ARAŞTIRMA BULGULARI

Moleküllerin değişik dalga boylarındaki titreşim gruplarını görüntüleyerek bu moleküllerin yapısal, fonksiyonel ve dinamik özelliklerinin karakterize edilmesini sağlayan bir teknik olan FTIR spektroskopisi, çalışmamızda kontrol ve LPS uygulanmış sıçan beyin hipokampusundeki makromoleküllerin rölatif miktarlarının ve dinamiğinin tespiti ve yapısal özelliklerinin araştırılması amacıyla kullanılmıştır.

Bir moleküldeki herhangi bir bağ veya bağ grubu FTIR spektrumlarında karakteristik soğurma bantları oluşturur. Dolayısıyla, her bir bant belirli bir bağ ya da bağ grubuna atfedilebilir (Severcan ve Haris 2012). Şekil 3.1.'de bir kontrol spektrumunun 4000-900 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki soğurma bantları numaralandırılarak gösterilmiştir. Bantların literatüre göre tanımları Çizelge 3.1.'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Kontrol sıçan hipokampusünün 4000-900 cm^{-1} bölgesindeki spektrumu (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (göreceli birim) kısaltılmıştır.).

Çizelge 3.1. Sıçan hipokampüsünün IR spektrumundaki başlıca soğurmaları(Mantsch 1984; Watts ve De Pont 1986; Takahashi ve diğ. 1991; Kneipp ve diğ. 2000; Doğan ve diğ. 2007; Bozkurt ve diğ. 2010; Leskovjan ve diğ. 2010; Elibol ve diğ. 2011; Cakmak ve diğ. 2012).

BANT NO	DALGA SAYISI cm⁻¹	AÇIKLAMASI
1	3370	Amid A: N-H gerilme, Çoğunlukla proteinler
2	3069	Amid B: N-H gerilme, Proteinler
3	3014	Olefinik HC=CH titreşim gerilme: Doymamış lipitler
4	2958	CH₃ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler
5	2923	CH₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler
6	2871	CH₃ simetrik gerilme: Çoğunlukla proteinler
7	2851	CH₂ simetrik gerilme: Çoğunlukla lipitler
8	1738	Karbonil (C=O) gerilme: Lipit (Çoğunlukla kolesterol ester ve trigliseritler), fosfolipitler
9	1653	Amid I: Protein (%80 C=O gerilme, %10 N-H bükülme, %10 C-N gerilme)
10	1545	Amid II: Protein (%60 N-H bükülme, %40 C-N gerilme)
11	1461	CH₂ bükülme: Çoğunlukla lipitler
12	1395	COO⁻ simetrik gerilme: Yağ asitleri ve aminoasitlerin yan grupları
13	1306	Amid III: Protein (%40 C-N gerilme, %30 N-H bükülme, %20 C-C gerilme)
14	1236	PO₂ antisimetrik gerilme: Çoğunlukla nükleik asitler, az bir kısmı fosfolipitler
15	1169	CO-O-C antisimetrik gerilme: Lipitler, nükleik asitler
16	1074	PO₂ simetrik gerilme: Nükleik asitler ve fosfolipitler
17	973	C-N⁺-C gerilme: Nükleik asitler, RNA riboz-fosfat ana zincir titreşimleri
18	927	z-form DNA

Spektrumlarda görülen bantların dalga sayısı değeri, bant alanları, bant alan oranları ve bant genişliği hesaplanarak detaylı spektrum analizleri yapılmıştır. Infrared bantlarının sinyal şiddetleri ve bu bantların altında kalan alanlar, ait olduğu fonksiyonel grubun konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir (Freifelder 1982; Takahashi ve diğ. 1991; Liu ve diğ. 2002; Severcan ve diğ. 2005; Cakmak ve diğ. 2006; Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010). Yapılan analizler sonucu elde edilen başlıca fonksiyonel grupların bant alan değerlerindeki değişimler Çizelge 3.2.'te gösterilmiştir.

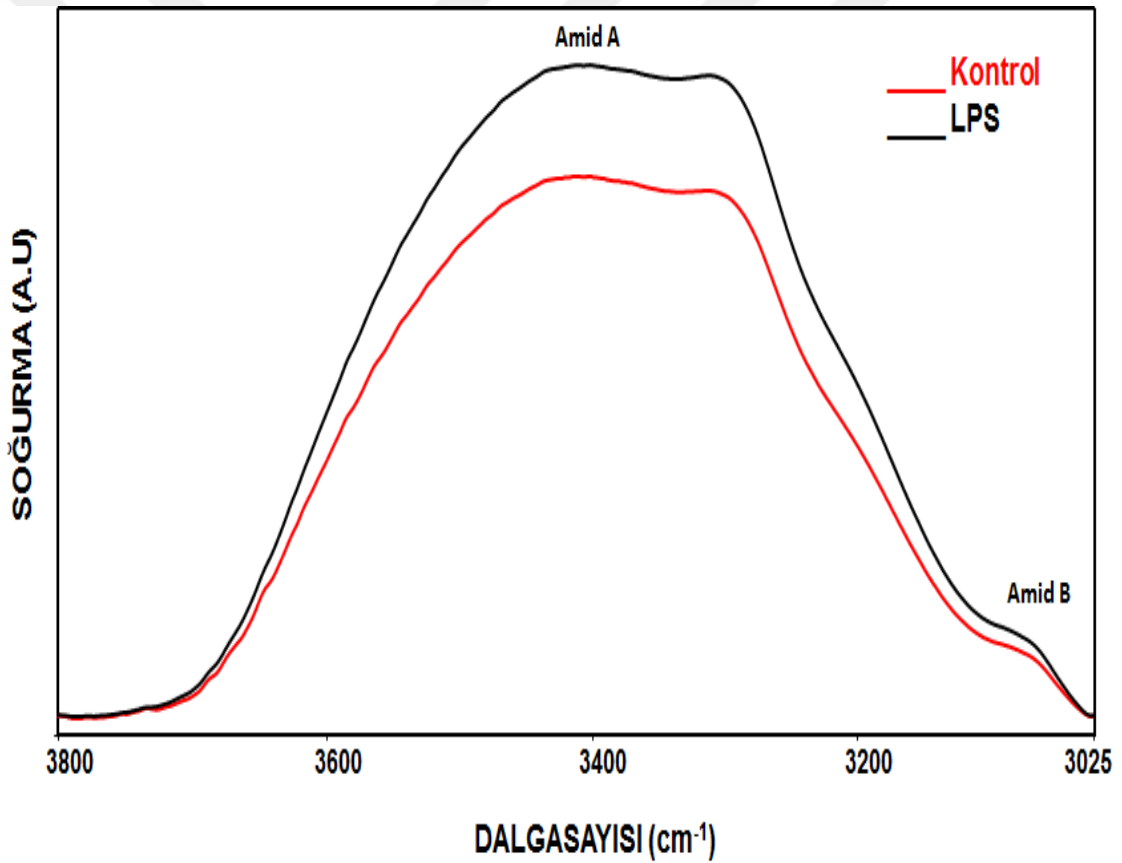


Çizelge 3.2. Kontrol ve LPS gruplarının başlıca fonksiyonel gruplarının alan değerleri
(Değerler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $p < 0,05$ * şeklinde gösterildi.)

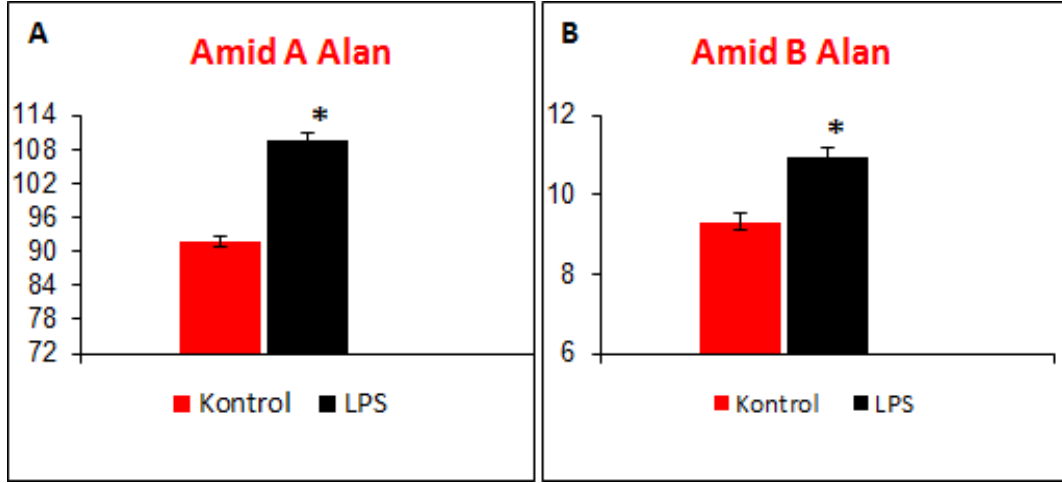
BANT NO	DALGA SAYISI cm^{-1}	KONTROL	LPS
1	3370	91,854 \pm 8,23	109,734 \pm 12,46*
2	3069	9,314 \pm 0,42	10,961 \pm 1,27*
3	3014	0,044 \pm 0,007	0,057 \pm 0,01*
4	2958	2,05 \pm 0,20	2,431 \pm 0,33*
5	2923	5,874 \pm 0,55	7,032 \pm 1,00*
6	2871	0,612 \pm 0,05	0,72 \pm 0,08*
7	2851	1,694 \pm 0,15	2,008 \pm 0,23*
8	1738	1,734 \pm 0,11	2,012 \pm 0,19*
9	1653	26,068 \pm 2,43	31,471 \pm 4,27*
10	1545	16,122 \pm 1,44	19,287 \pm 2,13*
11	1461	4,925 \pm 0,38	5,761 \pm 0,70*
12	1395	6,161 \pm 0,47	7,222 \pm 0,95*
13	1306	2,964 \pm 0,25	3,437 \pm 0,34*
14	1236	8,082 \pm 0,68	9,385 \pm 1,36*
15	1169	2,702 \pm 0,21	3,082 \pm 0,26*
16	1074	11,322 \pm 0,91	12,95 \pm 1,50*
17	973	0,835 \pm 0,05	0,94 \pm 0,09*
18	927	0,097 \pm 0,013	0,117 \pm 0,01*

Her gruptaki bireylerden elde edilen spektrumların ortalamaları alınmış ve analizlere bunlar üzerinden devam edildi. Değişimleri görsel olarak daha açık bir şekilde göstermek için üç spektral bölge (3800–3025 cm^{-1} , 3025–2800 cm^{-1} ve 1800–900 cm^{-1}) seçildi.

Şekil 3.2., kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus dokularının 3800–3025 cm^{-1} bölgesindeki ortalama FTIR spektrumlarını göstermektedir. Bu bölgedeki bantlar N-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan amid A (1 no'lu bant) ve N-H gerilme ve C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan amid B (2 no'lu bant) bantlarıdır ve ağırlıklı olarak sistemdeki proteinler hakkında bilgi vermektedir (Elibol ve diğ. 2011; Aksoy ve diğ. 2012). Şekil 3.3.'te, belirtilen bantların alan değerlerindeki değişimler bar diyagramı olarak gösterilmiştir. Şekil 3.2. ve 3.3.'ten görüldüğü gibi amid A ve amid B bantlarının altında kalan alan LPS uygulanmış grupta istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgu, LPS uygulanmış sıçan hipokampusünde protein miktarında artış olduğu anlamına gelmektedir (Cakmak ve diğ. 2006).

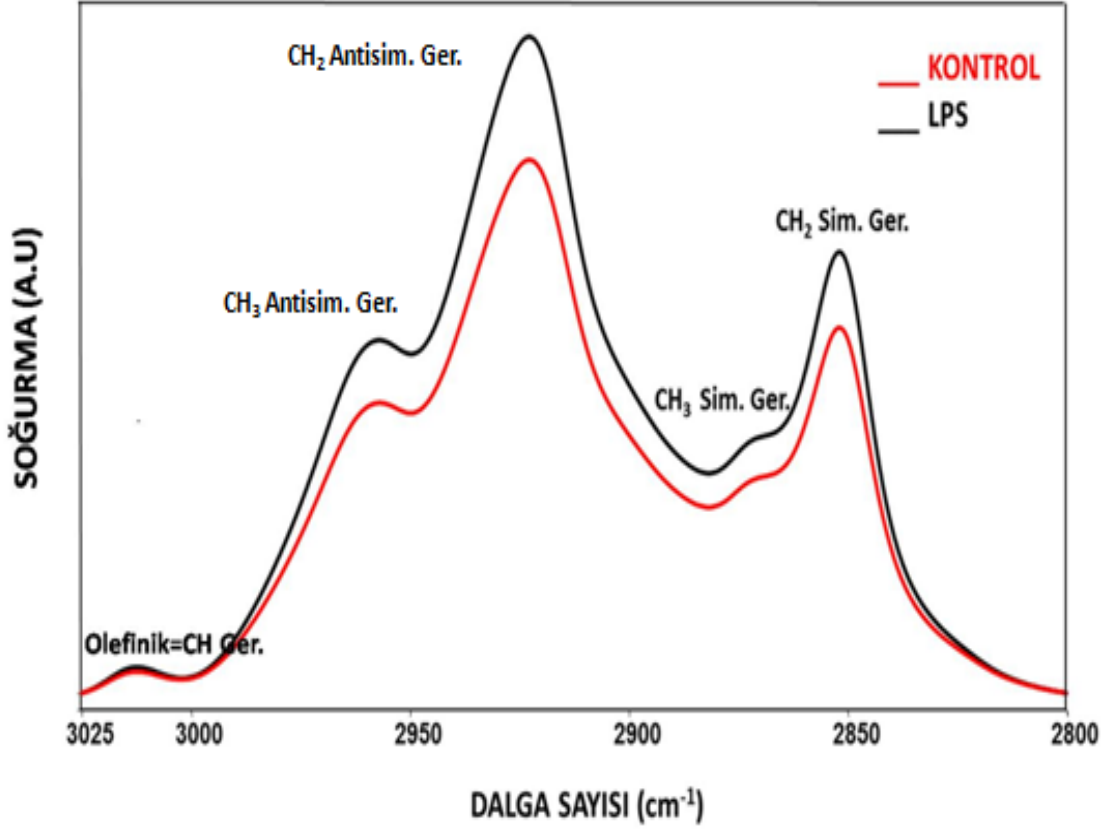


Şekil 3.2. Kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus dokularına ait 3800–3025 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (göreceli birim) kısaltılmışıdır.).



Şekil 3.3. Kontrol ve LPS gruplarının **A)** Amid A **B)** Amid B bantlarının alan değerleri ($p < 0,05^*$).

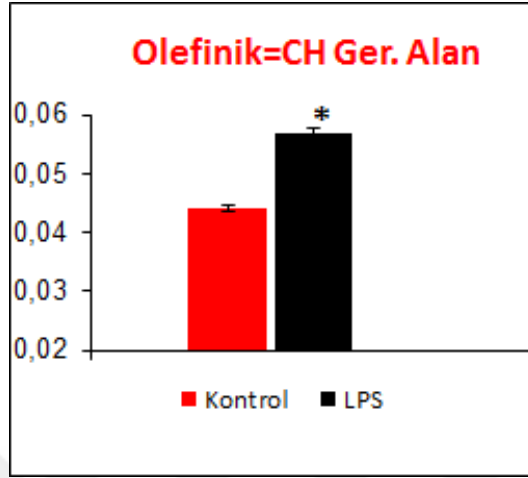
Şekil 3.4., kontrol ve LPS uygulanmış sıçan hipokampus dokularının $3025-2800 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki spektrumlarını göstermektedir. C-H gerilme bölgesi olarak adlandırılan bu bölgedeki bantlar, olefinik $\text{HC}=\text{CH}$ gruplarındaki C-H gerilmelerinin titreşimlerinden (3 no'lu bant), CH_3 antisimetrik gerilme titreşimlerinden (4 no'lu bant), CH_2 antisimetrik gerilme titreşimlerinden (5 no'lu bant), CH_3 simetrik gerilme titreşimlerinden (6 no'lu bant) ve CH_2 simetrik gerilme (7 no'lu bant) titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Watts ve De Pont 1986; Severcan ve diğ. 2000; Severcan ve diğ. 2005; Cakmak ve diğ. 2006; Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010). Bu bölgede bulunan CH_2 antisimetrik, CH_2 simetrik ve CH_3 antisimetrik gerilme titreşimlerinin bant şiddetleri veya bant alanları sistemdeki lipid miktarı ve CH_3 simetrik gerilme titreşimlerinin bant şiddeti ve alanı ise sistemdeki protein miktarı hakkında bilgi vermektedir (Mantsch 1984; Severcan ve diğ. 2000; Cakmak ve diğ. 2011).



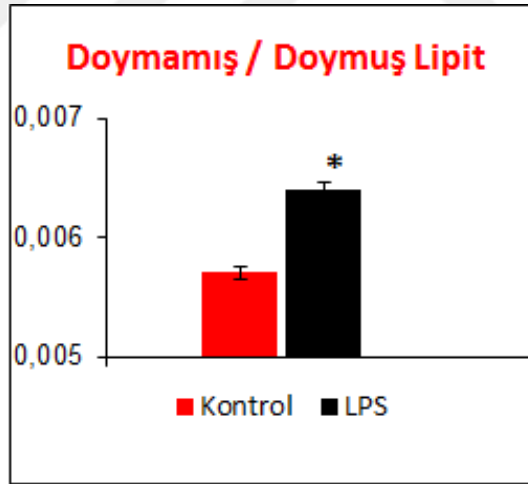
Şekil 3.4. Kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus dokularına ait 3025-2800 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (göreceli birim) kısaltılmışıdır.).

Doymamış yağ asitlerinde bulunan HC=CH gruplarının C-H bağlarındaki gerilme titreşimlerinden kaynaklanan ve 3014 cm^{-1} civarında gözlenen olefinik=CH gerilme bantının sinyal şiddeti ve altında kalan alan hidrokarbon zincirlerinin doymuşluğu hakkında bilgi vermektedir (Takahashi ve diğ. 1991; Melin ve diğ. 2000; Cakmak ve diğ. 2003; Severcan ve diğ. 2005). Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.’ten de görüldüğü gibi bu bantın altında kalan alan LPS uygulanmış grupta anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.05$). Alan değerindeki bu artış, LPS uygulanmış sıçan beyinde doymamış yağ oranının daha fazla olduğunu göstermektedir. Doymamış lipidlerin doymuş lipitlere olan oranları, olefinik bant alanının CH_2 antisimetrik ve simetrik gerilim bant alanları toplamına bölünmesi ile hesaplanmış ve elde edilen değerler Şekil 3.6.’ta verilmiştir. Bu oran doymamış lipid indeksi olarak kullanılabilir (Gasper ve diğ. 2009). Şekilden de görülebileceği gibi, LPS uygulanmış doku, kontrol grubuna göre daha yüksek doymamış lipid indeksine sahiptir. Olefinik bantının altında kalan alan ve doymamış

yağ asidi miktarının doymuş yağ asidi miktarına oranlanması ile görüntülenen doymamışlık indeksi dokulardaki lipit peroksidasyonu oranını tespit etmek amacıyla kullanılabilir (Bruch ve diğ. 1983; Curtis ve diğ. 1984).



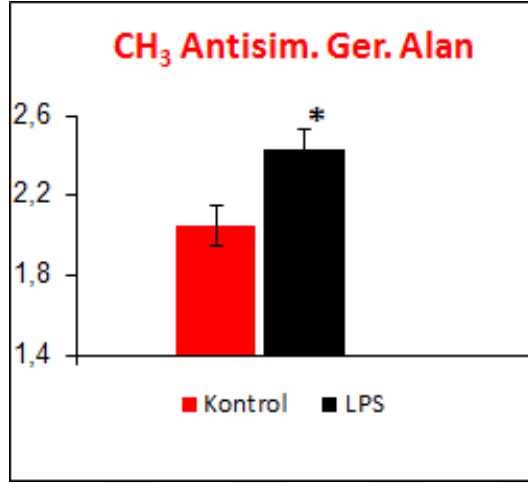
Şekil 3.5. Kontrol ve LPS gruplarının olefinik=CH gerilme bantının alan değerleri ($p<0,05^*$).



Şekil 3.6. Kontrol ve LPS gruplarının doymamış/doymuş lipit alan oranları ($p<0,05^*$).

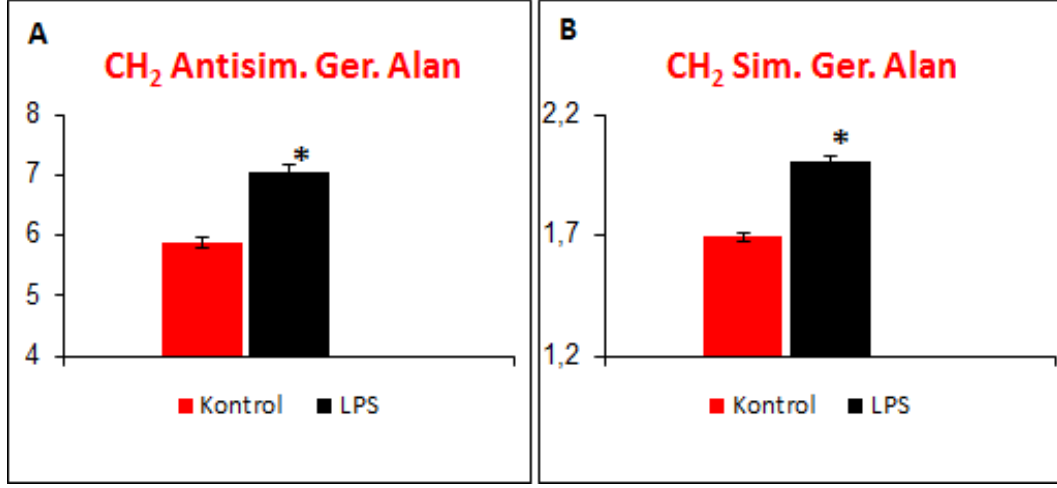
CH₃ antisimetrik gerilme bantı, lipitlerin açıl zincirlerindeki metil gruplarından kaynaklıdır (Takahashi ve diğ. 1991). Kontrol ve LPS gruplarının spektrumları karşılaştırıldığında Şekil 3.4. ve Şekil 3.7.'ten de görülebileceği gibi CH₃ antisimetrik gerilme bantının alan değerinde bir artış anlamlı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu sonuç bize LPS'nin hipokampus membranındaki lipitlerin açıl zincirlerinde bulunan metil

gruplarının sayısında bir artışa sebep olduğunu göstermektedir (Takahashi ve diğ. 1991).

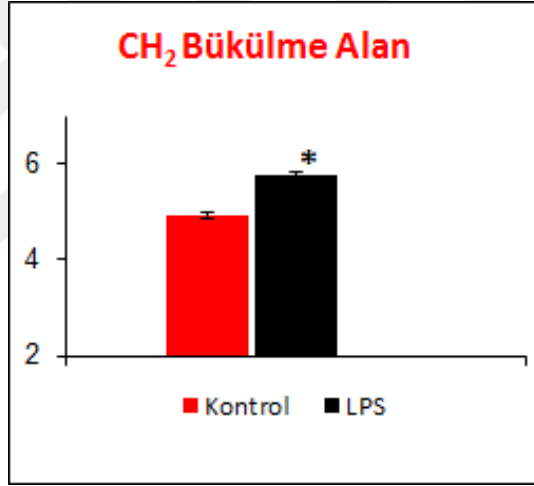


Şekil 3.7. Kontrol ve LPS gruplarının CH₃ antisimetrik gerilme bantının alan değerleri (p<0,05*).

C-H titreşim bölgesinde yer alan doymuş lipitlere ait ana bantların (CH₂ antisimetrik ve CH₂ simetrik gerilim bantları) alan değerleri incelendiğinde Şekil 3.4. ile Şekil 3.8.'ten de görüldüğü üzere, LPS uygulanmış dokuda doymuş lipitlerde kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,05). Bu artış LPS uygulanmış dokuda doymuş lipit miktarının arttığını göstermektedir. Parmak izi bölgesinde yer alan, lipitlerden kaynaklanan bir diğer bant olan 1461 cm⁻¹'deki CH₂ bükülme bantının alan değerindeki değişim de lipit içeriği hakkında bilgi vermektedir. Bu bantın alan değerleri incelendiğinde diğer lipit bantlarından elde edilen sonuçları destekleyici olarak LPS uygulanmış sıçan hipokampus dokusunda kontrole göre anlamlı bir artış görülmüştür (p<0,05) (Şekil 3.9.). Bu sonuç, LPS uygulanmış dokuda kontrole göre doymuş lipit içeriğinde artış olduğu sonucunu desteklemektedir (Bozkurt ve diğ. 2010; Garip ve Severcan 2010; Ozek ve diğ. 2010). Ayrıca Şekil 3.7.'te gösterilen CH₃ antisimetrik gerilim bantının alan değerinin analizinden elde edilen artışta bu sonucu desteklemektedir.

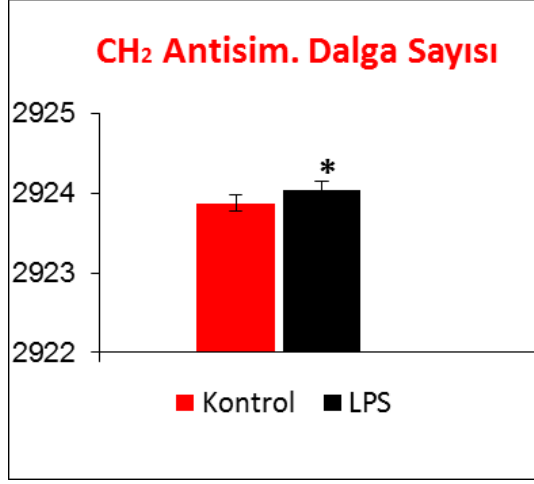


Şekil 3.8. Kontrol ve LPS gruplarının A) CH₂ antisimetrik gerilme bantı B) CH₂ simetrik gerilme bantının alan değerleri (p<0,05*).



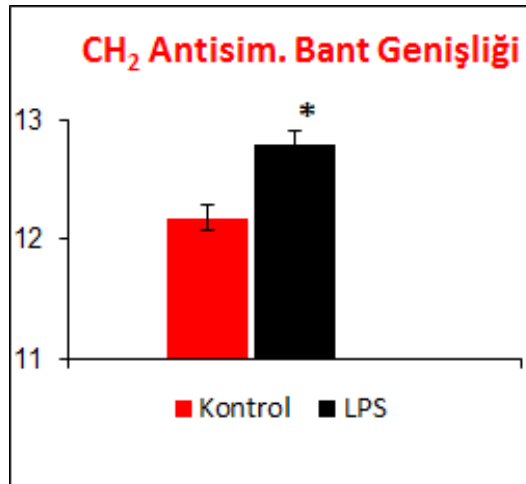
Şekil 3.9. Kontrol ve LPS gruplarının CH₂ bükülme bantının alan değerleri (p<0,05*).

CH₂ antisimetrik ve simetrik bantlarının pozisyonları, lipid açıl zincirlerinin esnekliği yani lipidlerin konformasyonel düzensizlikleri hakkında bilgi vermektedir (Umemura ve diğ. 1980; Casal ve diğ. 1984; Boyar ve Severcan 1997). Şekil 3.10'tan görüldüğü gibi CH₂ antisimetrik bantının dalga sayısında yüksek değerlere doğru bir kayma gözlenmiştir. Bu artış, LPS'nin açıl zincirlerini daha düzensiz hale getirdiği anlamına gelmektedir.



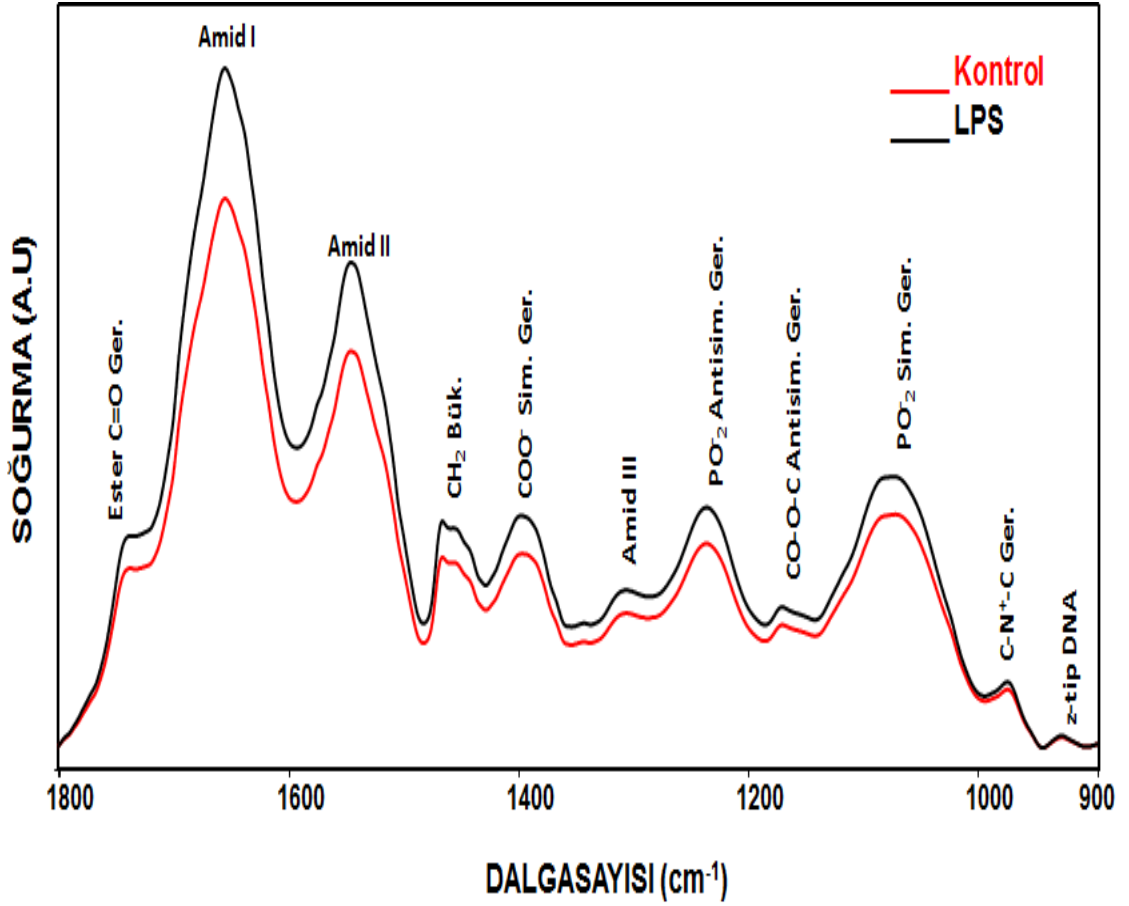
Şekil 3.10. Kontrol ve LPS gruplarının CH₂ antisimetrik gerilim bantının dalga sayısı değerleri ($p < 0,05^*$).

Ayrıca CH₂ antisimetrik gerilim bantının bant genişliğinde meydana gelen değişiklikler sistemin dinamiğiyle ilgili bilgi vermektedir (Severcan ve diğ. 1995; Boyar ve Severcan 1997). Şekil 3.11.'te görüldüğü gibi, yapılan spektral analizlerin sonucunda CH₂ antisimetrik bantının genişliğinin arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu artış LPS uygulanmış sıçan hipokampusunun membran dinamiğinin arttığını göstermektedir.



Şekil 3.11. Kontrol ve LPS gruplarının CH₂ antisimetrik gerilim bantının bant genişlikleri ($p < 0,05^*$).

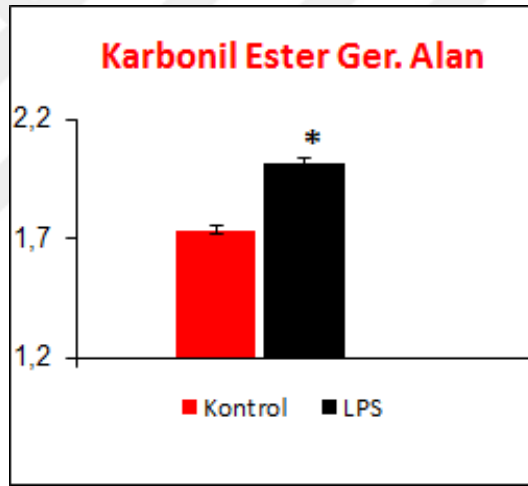
Çalışma kapsamında incelenen $1800-900\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde yer alan bölge, çalışılan sisteme özgü fonksiyonel grup titreşimleri içerdiğinden parmak izi bölgesi olarak adlandırılmaktadır ve kolesterol ester, trigliserit, protein, nükleik asit, karbonhidrat, RNA ve DNA gibi moleküllerden kaynaklanan spektral bantlar içermektedir. Şekil 3.12.'te kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus doku spektrumlarının $1800-900\text{ cm}^{-1}$ bölgesi gösterilmiştir.



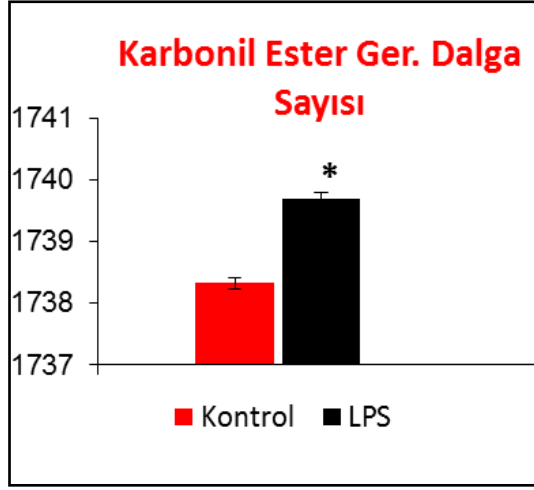
Şekil 3.12. Kontrol ve LPS grubundaki sıçan hipokampus dokularına ait $1800-900\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığındaki spektrumları (Y eksenindeki “A.U” arbitrary unit’in (göreceli birim) kısaltılmışıdır.).

1738 cm^{-1} 'de yer alan C=O ester (karbonil ester) gerilme bantı (8 no'lu bant) ağırlıklı olarak trigliserit ve kolesterol esterlerinden kaynaklanmaktadır (Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010) ve ayrıca membran lipitlerinin polar ve apolar kısımlarının etkileştikleri bölgeler hakkında önemli bilgiler vermektedir (Takahashi ve diğ. 1991;

Kneipp ve diğ. 2000). Dolayısıyla, bu bantın sinyal şiddeti ve/veya alan değerindeki bir değişikliğin lipit miktarı ile doğru orantılıdır (Takahashi ve diğ. 1991; Haris ve Chapman 1996; Haris ve Severcan 1999). Kontrol ve LPS gruplarının spektrumları karşılaştırıldığında Şekil 3.12. ve Şekil 3.13.'te görülebileceği gibi LPS uygulanmış sıçan hipokampusünün karbonil ester bantının alan değeri artmıştır. Bu sonuç, LPS uygulanmış sıçan hipokampuslerinde trigliserit ve kolesterol miktarında bir artış olduğunu göstermektedir. Bu gözlem 3025-2800 cm^{-1} bölgesi sonuçlarında da gözlenen lipit miktarının arttığı yorumunu desteklemektedir. Ayrıca Şekil 3.14.'te görüldüğü gibi bu bantın dalga sayısı değerinde yüksek değerlere doğru bir kayma meydana gelmiştir ($p<0.05$). Bu artış, LPS uygulamasının lipitlerin yapılarında, özellikle membran lipitlerin paketlenmesinde bir farklılık oluşturduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir (Turker 2014).

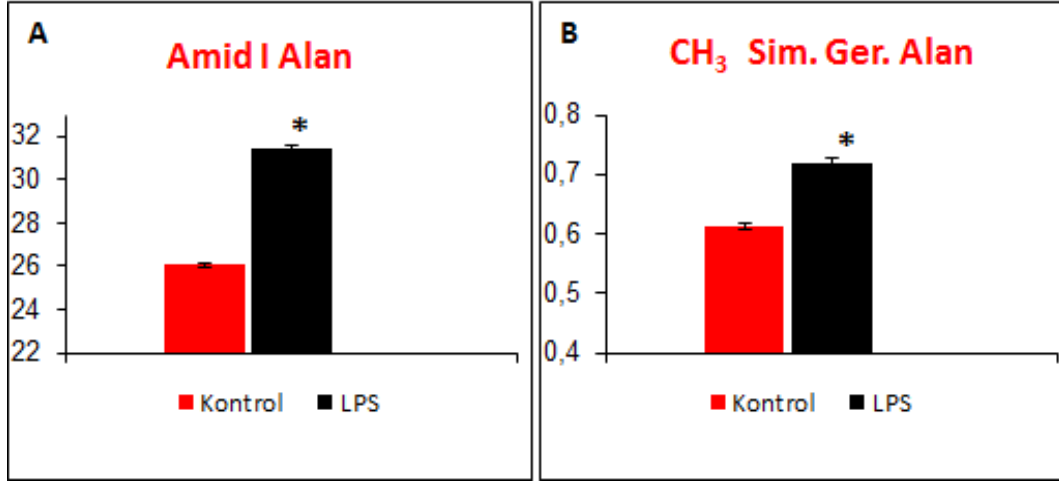


Şekil 3.13. Kontrol ve LPS gruplarının karbonil ester gerilme bantının alan değerleri ($p<0,05^*$).



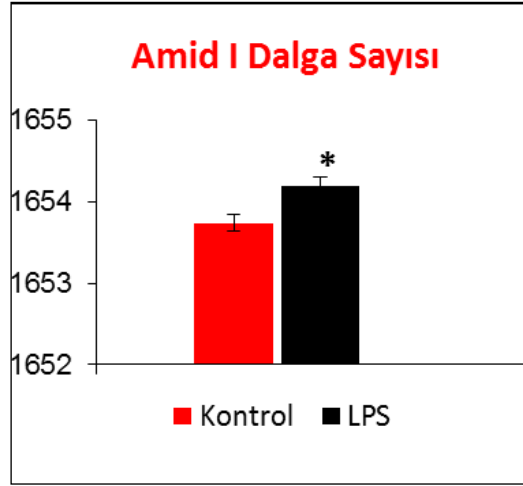
Şekil 3.14. Kontrol ve LPS gruplarının karbonil ester gerilme bantının dalga sayısı değerleri ($p < 0,05^*$).

Parmak izi bölgesinde yer alan 1655 ve 1545 cm^{-1} dalga sayısında gözlemlenen amid I ve amid II bantları protein kaynaklı bantlardır (Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010). Amid I bantı %80 oranında C=O gerilme, %10 oranında C-N gerilme %10 oranında N-H bükülme titreşimlerinden, amid II bantı ise %60 oranında N-H bükülme ve %40 oranında C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Takahashi ve diğ. 1991; Wong ve diğ. 1991; Stuart 1997; Haris ve Severcan 1999; Cakmak ve diğ. 2006; Dogan ve diğ. 2007; Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010). Bu bantlara ilaveten, C-H gerilme bölgesinde, 2871 cm^{-1} de yer alan CH_3 simetrik gerilme bantıda sistemdeki proteinler hakkında bilgi vermektedir. Şekil 3.15.'te görüldüğü gibi amid I ve CH_3 simetrik gerilme bantlarının alan değerlerinde anlamlı artışlar gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu sonuçlar, LPS uygulanmış dokuda protein miktarında artış olduğu anlamına gelmektedir ve amid A ve amid B bantlarının analizinden elde ettiğimiz sonucu desteklemektedir (Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010).

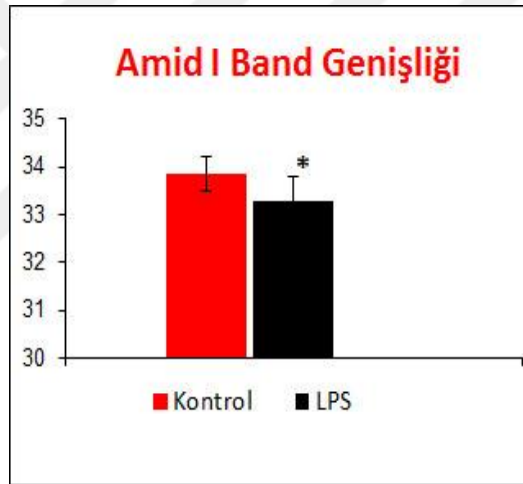


Şekil 3.15. Kontrol ve LPS gruplarının **A)** Amid I bantının **B)** CH₃ simetrik gerilme bantının alan değerleri ($p < 0,05^*$).

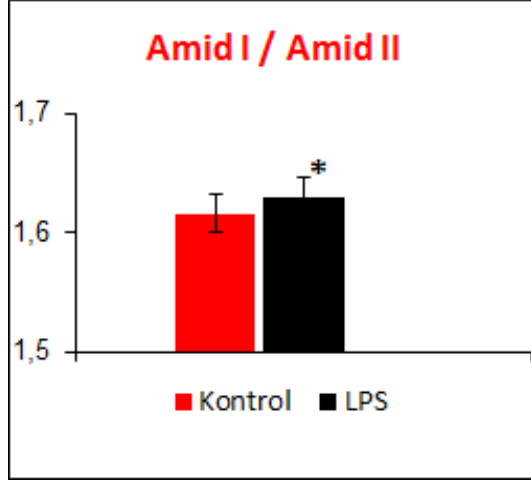
Amid I ve amid II bantlarının bant dalga sayısı değerlerindeki kaymalar protein yapılarında konformasyonel değişimlerin olduğunu gösterir. Bu parametrelere ilave olarak amid I/amid II oranı değişimi de proteinlerde yapısal değişimlerin olduğuna işaret eder (Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011). Şekil 3.16.'ta görüldüğü gibi amid I bantının dalga sayısı yüksek değerlere doğru kaymıştır. Bu kayma proteinlerin konformasyonunda bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Şekil 3.17.'te görüldüğü gibi amid I bantının bant genişliği LPS uygulanmış dokuda azalmıştır. Bu bulgu proteinlerin konformasyonel bir değişime uğradığı sonucunu kuvvetlendirmektedir. Şekil 3.18.'te amid I/amid II oranı verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi LPS uygulanmış grupta bu oran anlamlı derecede artmıştır. Bu değişiklikler LPS uygulamasının proteinlerin yapı, kompozisyon ve konformasyonunda bir takım değişiklikler meydana getirdiğini göstermektedir.



Şekil 3.16. Kontrol ve LPS gruplarının Amid I bantının dalga sayısı değerleri ($p < 0,05^*$).

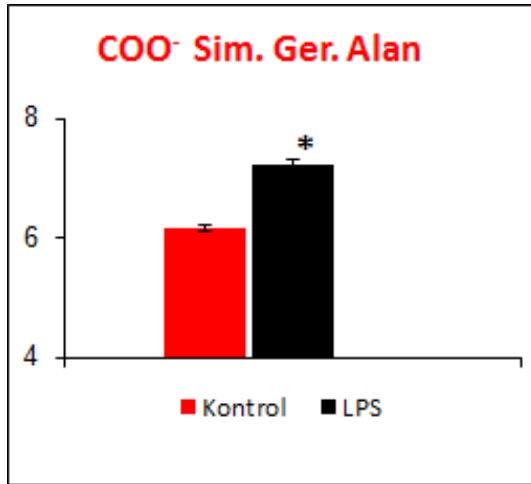


Şekil 3.17. Kontrol ve LPS gruplarının Amid I bantının bant genişlikleri ($p < 0,05^*$).



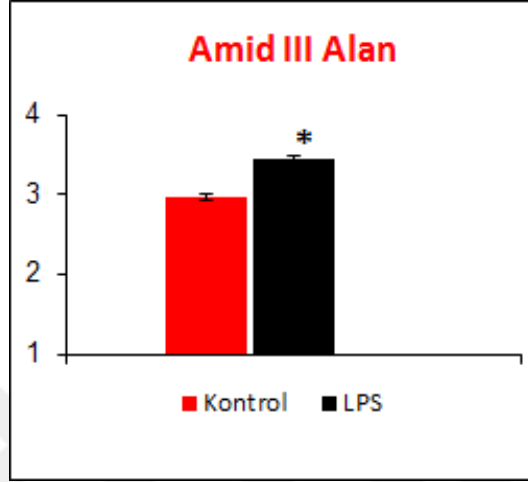
Şekil 3.18. Kontrol ve LPS gruplarının Amid I/Amid II alan oranları ($p < 0,05^*$).

1395 cm^{-1} 'te görülen COO^- simetrik gerilme bantı çoğunlukla yağ asitlerinden ve aminoasitlerden kaynaklanmaktadır (Cakmak ve diğ. 2006; Movasaghi ve diğ. 2008). Şekil 3.19.'ta görüldüğü gibi bu bantın alan değerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu artış daha önceki lipid ve protein bantlarının alan analizlerinden elde edilmiş olan LPS uygulamasının sistemdeki lipid ve protein miktarında artışa sebep olduğu bulgusunu desteklemektedir.



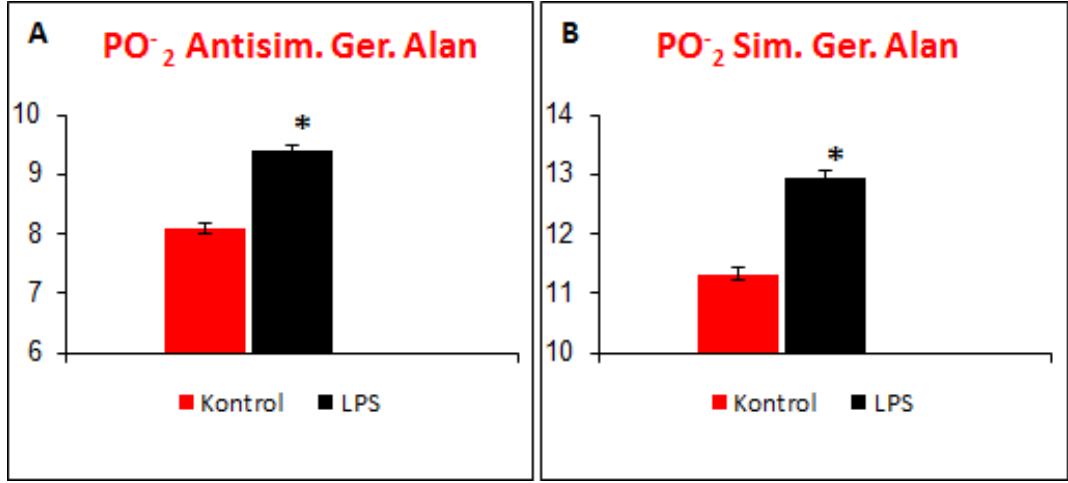
Şekil 3.19. Kontrol ve LPS gruplarının COO^- simetrik gerilme bantının alan değerleri ($p < 0,05^*$).

Benzer şekilde 1306 cm^{-1} 'te gözlenen ve ağırlıklı olarak proteinlerden kaynaklanan bir bant olan amid III bantının alanı Şekil 3.20.'ta görüldüğü gibi LPS uygulanmış dokuda kontrole göre artmıştır ($p<0,05$). Bu artış LPS'nin hipokampus dokusunda protein içeriğinin artışına sebep olduğu bulgusunu desteklemektedir.



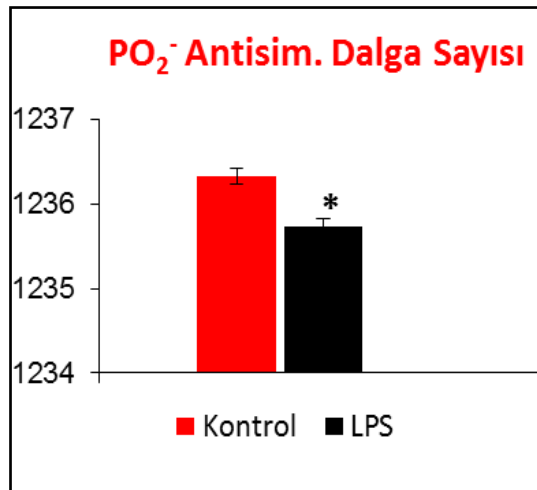
Şekil 3.20. Kontrol ve LPS gruplarının Amid III bantının alan değerleri ($p<0,05^*$).

Kızılötesi spektrumunun $1300-900\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında gözlemlenen bantlar daha çok nükleik asit, fosfolipit ve karbonhidratlar gibi moleküllerin farklı fonksiyonel gruplarının çeşitli titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Cakmak ve diğ. 2006; Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011). Bu bölgede yer alan 1236 cm^{-1} ve 1074 cm^{-1} te yer alan PO_2^- antisimetrik ve simetrik gerilme bantları nükleik asit ve fosfolipit gibi fosfat (PO_2^-) grupları içeren moleküllerin içindeki $\text{P}=\text{O}$ bağının soğurma bantlarından oluşmaktadır (Liquier ve Taillandier 1996; Diem ve diğ. 1999; Cakmak ve diğ. 2006; Bozkurt ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011). Şekil 3.21.'te söz konusu bantlara ait alanlardaki değişimler gösterilmektedir. Şekilden görüldüğü üzere LPS grubunda kontrol grubuna göre her iki bantın alan değerinde anlamlı artışlar elde edildi ($p<0,05$). Bu sonuç, LPS uygulanmış sistemdeki nükleik asit ve membranlarda bulunan fosfolipitlerin miktarlarındaki artışı göstermektedir.



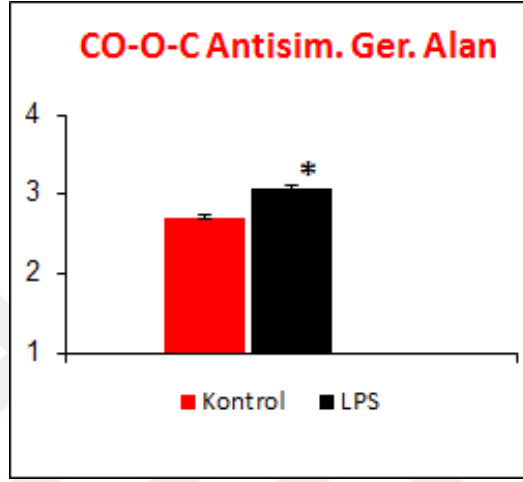
Şekil 3.21. Kontrol ve LPS gruplarının **A)** PO₂⁻ antisimetrik gerilme **B)** PO₂⁻ simetrik gerilme bantlarının alan değerleri (p<0,05*).

PO₂⁻ antisimetrik ve simetrik gerilme bantlarında bant dalga sayısı değerindeki kaymalar nükleik asitlerde ve fosfolipitlerde konformasyonel değişimlerin ve membran lipitlerinin paketlenmesinde değişiklik olduğunu göstermektedir (Banyay ve diğ. 2003; Ozek ve diğ. 2010). Şekil 3.22.'te PO₂⁻ antisimetrik gerilme bantına ait dalga sayısı değişimleri görülmektedir. LPS grubunda söz konusu bantın dalga sayısı değerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi, bu da hipokampus dokusundaki nükleik asit ve fosfolipit yapılarında değişimlerin olduğunu ifade etmektedir.



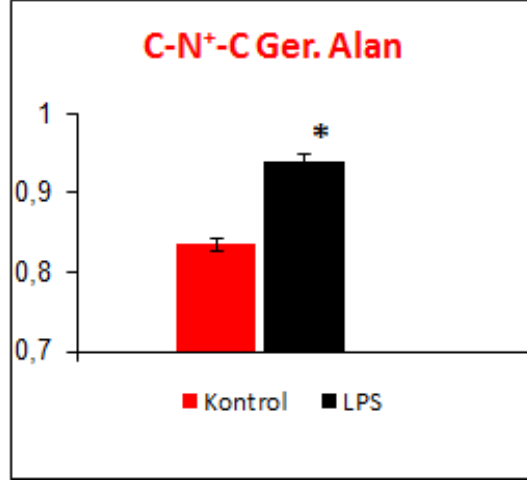
Şekil 3.22. Kontrol ve LPS gruplarının PO₂⁻ antisimetrik gerilme bantının dalga sayısı değerleri (p<0,05*).

1169 cm^{-1} 'te gözlenen CO-O-C antisimetrik gerilme bantı ağırlıklı olarak lipitler ve nükleik asitlerden sinyal almaktadır. Şekil 3.23.'ten görüldüğü gibi bu bantın alan değerinde LPS uygulamasından sonra anlamlı bir artış ortaya çıkmıştır. Bu artış, sistemdeki lipit miktarının önemli derecede arttığı sonucunu desteklemektedir.



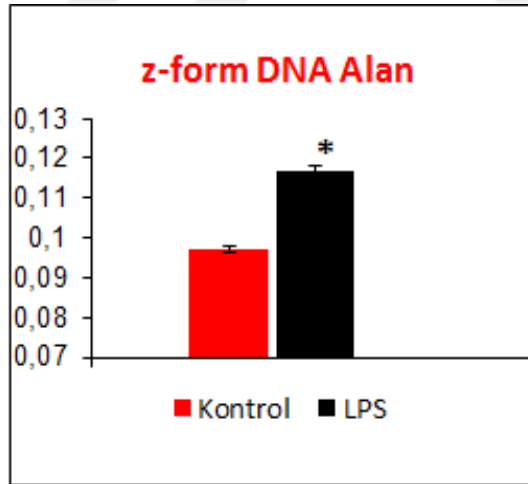
Şekil 3.23. Kontrol ve LPS gruplarının CO-O-C antisimetrik gerilme bantının alan değerleri ($p < 0,05^*$).

972 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen C-N⁺-C gerilme titreşim bantı nükleik asitlerden, özellikle de RNA riboz-fosfat ana zincir titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Chiriboga ve diğ. 2000; Banyay ve diğ. 2003). Şekil 3.24.'te görüldüğü üzere LPS grubuna ait spektrumdaki 972 cm^{-1} bantının alan değerinde kontrol grubuna göre bir artış meydana gelmiştir. Bu sonuca göre, RNA miktarının LPS uygulanmış dokuda daha fazla olduğu ve RNA sentezinin bu grupta daha fazla gerçekleştiği yorumu yapılabilir. Bu durum, LPS grubunda tespit edilen, kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek olan protein miktarını da açıklamaktadır.



Şekil 3.24. Kontrol ve LPS gruplarının C-N⁺-C gerilme titreşim bantının alan değerleri (p<0,05*).

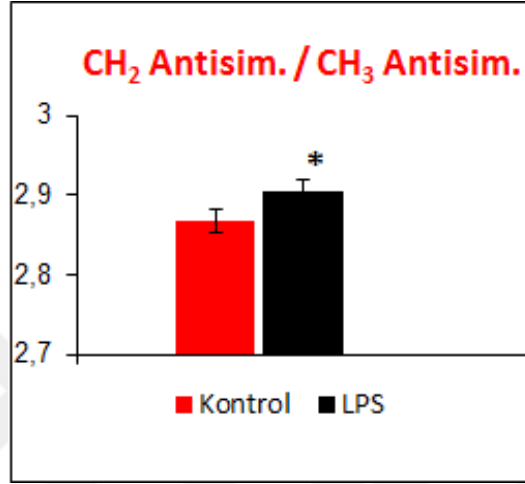
Şekil 3.25., z-form DNA'dan kaynaklanan bir bant olan 927 cm⁻¹'te gözlenen bantın alan değerindeki değişikliği göstermektedir. Şekilden de görülebileceği gibi bu bantın alan değeri LPS uygulanmış dokuda anlamlı derecede artmıştır.



Şekil 3.25. Kontrol ve LPS gruplarının z-form DNA bantının alan değerleri (p<0,05*).

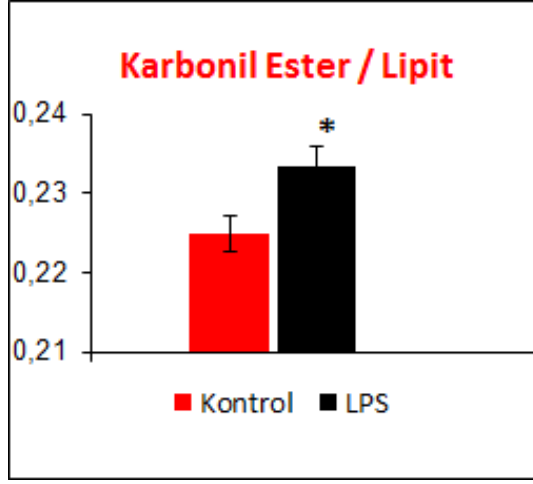
Spektral analizlerde bant alanı, dalga sayısı ve bant genişliği analizlerinin yanında moleküllerin birbirlerine göre bağlı değişimlerini kıyaslamak amacıyla son yıllarda spektral alan oranları da kullanılmaktadır (Cakmak ve diğ. 2012). Örneğin, CH₂ antisimetrik bantının altında kalan alanın CH₃ antisimetrik bantının alanına oranı lipid

zincir uzunluğu hakkında bilgi edinilmek için kullanılmaktadır. Söz konusu orandaki artış zincir uzunluğundaki artışa tekabül etmektedir (Cakmak ve diğ. 2012; Severcan ve Haris 2012). Şekil 3.26.'ta söz konusu bantlara ait alan oranındaki değişim gösterilmektedir. Şekildende görüldüğu üzere LPS grubunda bir artış meydana gelmiştir. Bu artış, LPS grubunda lipit zincir uzunluğundaki artışı göstermektedir.



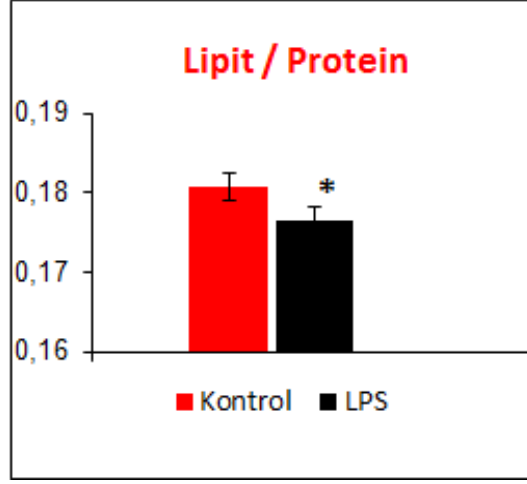
Şekil 3.26. Kontrol ve LPS gruplarının CH₂ antisimetrik/CH₃ antisimetrik bant alan oranları (p<0,05*).

Sistemin karbonil (C=O) fonksiyonel gruplarının durumu hakkında bilgi sahibi olmak için karbonil ester/lipit oranı hesaplanmıştır (Cakmak ve diğ. 2012). Şekil 3.27.'ten görüldüğu gibi bu oran LPS uygulanmış grupta artmıştır. Bu sonuç sistemdeki karbonil miktarının artışı göstermektedir.



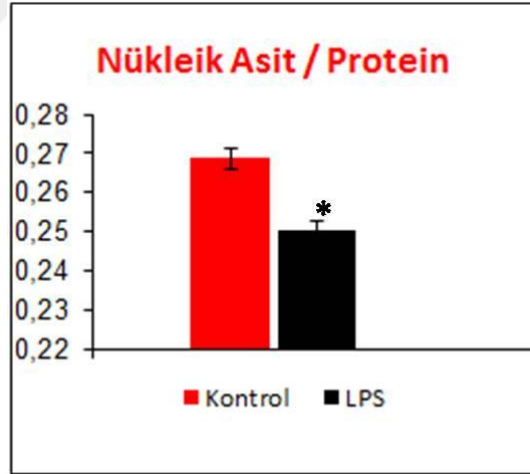
Şekil 3.27. Kontrol ve LPS gruplarının karbonil ester/lipit alan oranları ($p < 0,05^*$).

Çalışılan örneklerde lipit ve protein konsantrasyonlarının birbirine göre değişimlerini kıyaslamak amacıyla lipit ve proteinlerden kaynaklı spektral bantların bant alan oranları kullanılmaktadır (Ozek ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011). Bu oranlar hesaplanırken CH_3 antisimetrik, CH_2 antisimetrik ve CH_2 simetrik gerilme bantları alanlarının toplamı, amid II bantının altında kalan alana bölünmüştür. Şekil 3.28.'ten görüldüğü gibi lipit/protein oranı LPS uygulanmış grupta anlamlı derecede azalmıştır. Şu ana kadar tartışılmış olan analiz sonuçlarına göre hem protein hem de lipit miktarında anlamlı derecede artış gözlenmişti. Bu azalış LPS uygulanmış dokuda meydana gelen protein içeriğindeki artmanın lipit içeriğindeki artmadan daha fazla olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla sistemdeki protein miktarı lipit miktarına göre daha fazla artmıştır. Bu sonuç, sadece proteinlerden kaynaklanan bantlar olarak bilinen amid I ve amid II bantlarındaki artışı da desteklemektedir.



Şekil 3.28. Kontrol ve LPS gruplarının lipit/protein bant alan oranları ($p < 0,05^*$).

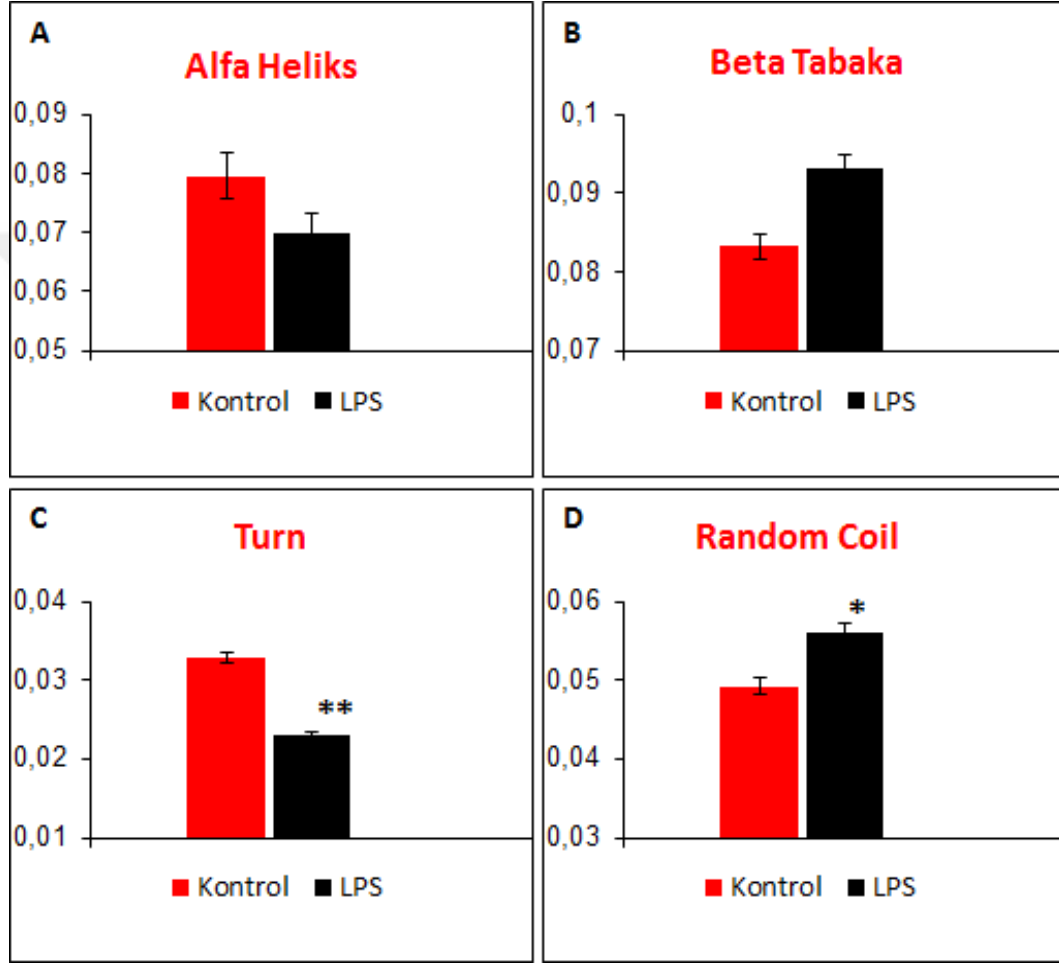
PO_2 simetrik gerilim bant alanının amid I bant alanına bölünmesi ile elde edilen nükleik asit/protein oranında elde edilen değişimler Şekil 3.29.'ta gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği üzere LPS uygulanmış grupta bu oran anlamlı derecede azalmıştır.



Şekil 3.29. Kontrol ve LPS gruplarının nükleik asit/protein bant alan oranları ($p < 0,05^*$).

Çalışmamızda çalışılan gruplarda LPS uygulamasının hipokampus dokusundaki protein ikincil yapılarında meydana gelen değişimleri saptamak amacıyla FTIR spektrumunda sadece proteinlerden kaynaklanan ve $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ aralığında yer alan amid I bantına ikincil türev-vektör normalizasyon metodu uygulandı. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen hipokampus dokusundaki protein ikincil

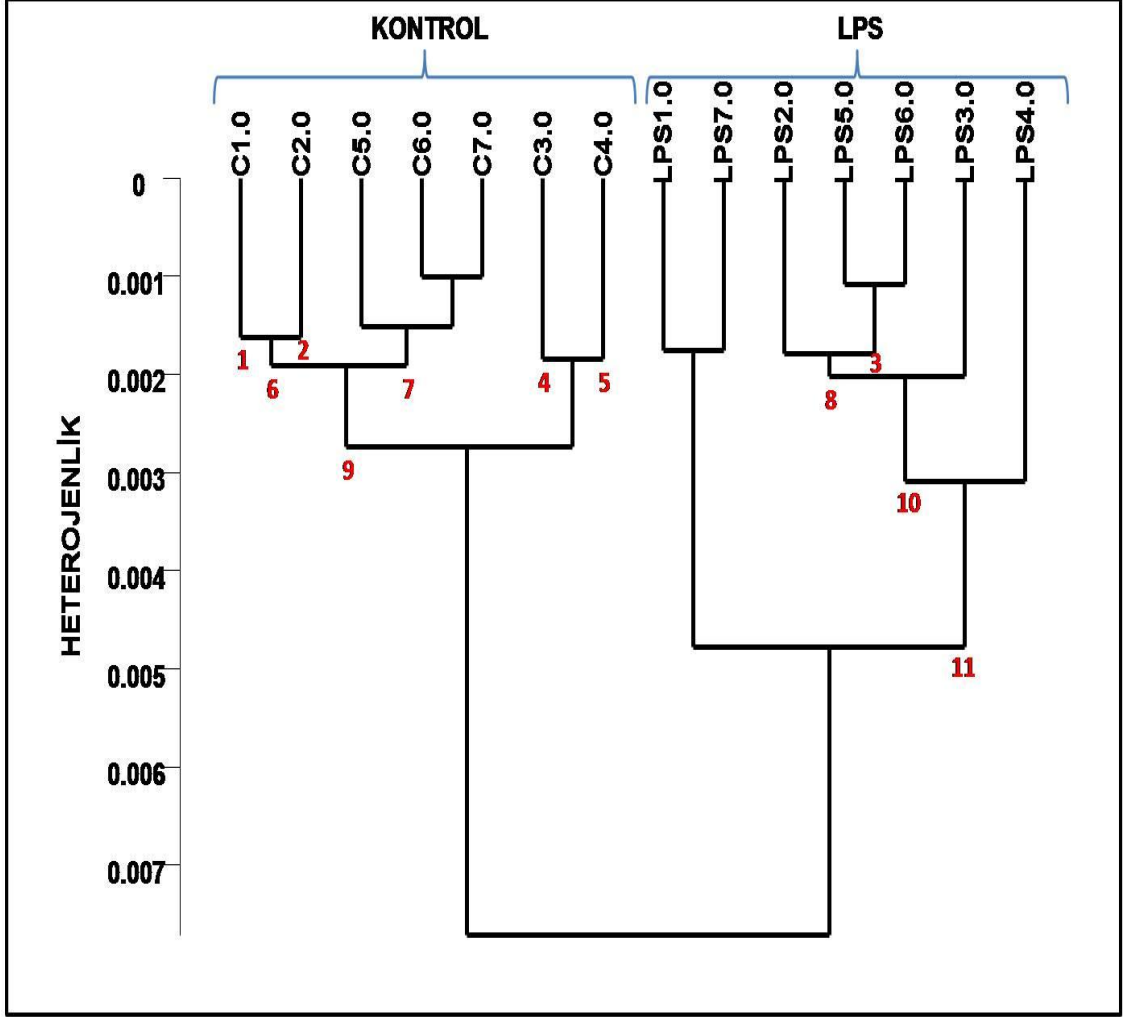
yapıdaki değişimler Şekil 3.30.'te gösterilmektedir. İkincil türevde proteinlerin ikincil yapısından kaynaklanan turn yapıları 1684 cm^{-1} , alfa heliks 1659 cm^{-1} , random coil 1652 cm^{-1} , beta sheet 1637 cm^{-1} 'de ortaya çıkmaktadır. Şekildende görüldüğü gibi LPS uygulanmış sıçan hipokampus dokusunda turn miktarında anlamlı bir azalma, random coil miktarında ise anlamlı bir artış meydana gelmiştir.



Şekil 3.30. İkincil türev vektör normalizasyonu metodu ile elde edilen kontrol ve LPS gruplarının dokularındaki A) Alfa Heliks B) Beta Tabaka C) Turn D) Random Coil proteinlerin ikincil yapı miktarındaki değişimler ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).

Protein ikincil yapılarındaki değişimlerle ilgili sonuçlar, LPS uygulanmış dokuda random coil miktarında artışın olduğunu göstermiştir buda LPS uygulanmış dokulardaki proteinlerde bir miktar denatürasyon meydana gelmiş olabileceğini göstermektedir (Cakmak ve diğ. 2011; Bozkurt ve diğ. 2012).

FTIR spektrumlarına 3100-450 cm^{-1} spektral bölgesinde hiyerarşik kümeleme analizi metodu uygulandı. Şekil 3.31.'ten görüleceği üzere LPS uygulanmış doku, kontrol grubundan başarılı bir şekilde ayrıldı.



Şekil 3.31. Kontrol ve LPS grubundaki bireylere ait hipokampus dokusu spektrumlarına 3100-450 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.

3.2. TARTIŞMA

Birçok metabolik hastalığın kaynağı hücre düzeyindeki bazı işlev bozukluklarıdır (Storlien ve diğ. 1998; Rask-Madsen ve King 2007). Bu işlev bozuklukları, hücre fonksiyonlarını yürüten hücre zarı, iyon kanalları, reseptörler gibi organel ve moleküllerin yapısal ve regülatör bozuklukları ve birbirleri ile etkileşimlerdeki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır (Awayda ve diğ. 2004; Wang ve Zhang 2005; Luneva ve diğ. 2007). Dolayısıyla, dokularda oluşan moleküler düzeydeki değişikliklerin tayini, hastalıkların moleküler mekanizmalarını ve ilerleyişlerini çözümlenmek açısından büyük önem taşımaktadır. Biyolojik moleküllerin fonksiyonları yapılarına bağlıdır. Günümüzde, moleküler kompozisyondaki değişimlerin membranda normal işleyiş için gerekli olan lipit ve protein gibi moleküllerin antisimetrik dağılımını değiştirdiği, bunun da çeşitli fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Örneğin doymamış/doymuş lipit, lipit/protein oranlarındaki değişimin membran kalınlığını ve lipit düzenini diğer bir deyimle membran yapısını değiştirdiği ve bunun da membran akışkanlığı ile ilgili olduğu ve iyon akımları kinetiği ve fonksiyonunu altüst ettiği bilinmektedir (Szalontai ve diğ. 2000; Awayda ve diğ. 2004; Cakmak ve diğ. 2011). Bu nedenle yapısal ve moleküler içeriklerdeki değişimleri belirlemeye yönelik çalışmaların önemi büyüktür. Bu alanda, çalışmada kullanılan FTIR spektroskopisinin önemli bir yeri vardır. FTIR spektroskopisi, biyolojik çalışmalar açısından lipitlerin diğer biyomoleküllerle etkileşimleri, proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi, kanser, diyabet gibi patolojik durumların, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların doku ve membran düzeyinde tanımlanması ve teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Mantsch 1984; Liu ve diğ. 1996; Boyar ve Severcan 1997; Fukuyama ve diğ. 1999; Severcan ve diğ. 2000; Ramesh ve diğ. 2002; Toyran ve diğ. 2006; Dogan ve diğ. 2007; Ozek ve diğ. 2010; Leskovjan ve diğ. 2010; Severcan ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011; Cakmak ve diğ. 2012; Severcan ve Haris 2012).

Çalışma sonuçları, LPS uygulamasının sıçan hipokampusundeki proteinlerin, lipitlerin ve nükleik asitlerin miktarı, yapısı ve içeriğinde önemli değişiklikler meydana getirdiğini ortaya çıkarmıştır.

Kontrol ve LPS uygulanmış gruplara ait hipokampus örneklerindeki biyokimyasal bileşenlere ait değişimleri görmek amacıyla normalize edilmemiş, ham ortalama FTIR spektrumlarından bant alanı, bant genişliği ve dalga sayısı analizleri yapıldı. Söz konusu analizler, ağırlıklı olarak proteinlerden kaynaklanan amid A ve amid B bantlarının yer aldığı ($3800-3025\text{ cm}^{-1}$) bölgesi, lipitlerden kaynaklı bantların bulunduğu C-H gerilme bölgesi ($3025-2800\text{ cm}^{-1}$) ve protein, lipit, karbonhidrat ve nükleik asitlerden kaynaklı bantların bulunduğu parmak izi bölgesinde ($1800-900\text{ cm}^{-1}$) gerçekleştirildi.

FTIR spektroskopisi ile elde edilen spektral bantların alan değerlerindeki değişimler, hipokampus dokusunda sistemik inflamasyona bağlı olarak meydana gelen molekül miktarlarındaki değişimleri saptamak için kullanıldı. Doymamış yağ asitlerinde bulunan HC=CH gruplarının C-H bağlarındaki gerilme titreşimleri, 3014 cm^{-1} civarında gözlenen bir bant oluşumuna neden olur (Mendelsohn ve Mantsch 1986). Bu bantın sinyal şiddeti ve altında kalan alan hidrokarbon zincirlerinin doymamışlığı hakkında bilgi vermektedir (Takahashi ve diğ. 1991; Melin ve diğ. 2000; Cakmak ve diğ. 2003; Severcan ve diğ. 2005; Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011). Analiz sonuçlarımız hipokampus dokusunda doymamış yağ içeriğinde kayda değer biçimde bir artış meydana geldiğini göstermiştir (Şekil 3.5.). Doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonuna karşı daha hassas oldukları bilinmektedir. Bu nedenle, bu bantın altında kalan alan lipit peroksidasyonunun tayini için bir index olarak kullanılabilir (Severcan ve diğ. 2005). Ayrıca doymamışlık indeksi olarak bilinen, bu bantın alanının doymuş lipitlerden kaynaklanan bantların alanına bölünmesiyle elde edilen doymamış/doymuş lipit oranının da LPS uygulanmış grupta önemli miktarda arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.6.). Olefinik=CH bantının alanındaki ve doymamış/doymuş lipit oranındaki artış sistemik inflamasyonun hipokampus dokusunda doymamış yağ asidi konsantrasyonunda artış meydana getirdiğini göstermektedir. Doymamış yağ asidi miktarında gözlenen bu artışın nedeni, artan lipit peroksidasyonu sonucu dokudaki çift bağ içeren lipit peroksidasyon son ürünlerinin artışına bağlı olabilir (Bruch ve diğ. 1983; Curtis ve diğ. 1984; Bozkurt ve diğ. 2010; Severcan ve diğ. 2010; Cakmak ve diğ. 2011).

Lipit peroksidasyonunun çoklu doymamış yağ asitlerinin açıl zincirlerindeki çift bağlarda meydana geldiği (Khouw ve diğ. 1993; Zwart ve diğ. 1999) ve olefinik bağlarının kaybıyla sonuçlandığı (Sills ve diğ. 1994; Moore ve diğ. 1995) bilinmektedir.

Ancak deney sonuçlarımıza göre olefinik gruplarında bir azalma yerine bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç lipid peroksidasyonu reaksiyonları sırasında kaybolan doymamış yağ asidi miktarının lipid peroksidasyon son ürünlerinde bulunan çift bağlar tarafından kompanse edildiğini göstermektedir (Liu ve diğ. 2002; Severcan ve diğ. 2005; Cakmak ve diğ. 2011). Yin ve diğ.'nin (2011) hazırladığı bir derlemede detaylı bir şekilde açıklandığı gibi biyolojik doku ve membranlardaki lipitler serbest radikal kaynaklarıyla muamele edildiklerinde bir dizi oksidasyon reaksiyon zinciri meydana gelir. Çoklu doymamış yağ asitleri bu oksidasyon reaksiyonlarına karşı son derece duyarlıdır (Yin ve diğ. 2011). Lipid peroksidasyonu, doymamış bir lipid ünitesinin moleküler oksijenle birleşmesiyle başlayan ve lipid peroksidasyon son ürünleri olarak bilinen lipid hidroperoksit ve dialkilperoksit gibi bileşiklerin oluşmasıyla sonlanan kompleks bir süreçtir. Eğer bir lipid açıl zinciri birden fazla çift bağ içeriyorsa, lipid peroksidasyonu konjuge dienleri oluşturmak için bu çift bağların yeniden düzenlenmesiyle sonuçlanır. Bunu hidroperoksitlerin parçalanması ve kompleks çoğalma reaksiyonları takip eder ve sonuçta ikincil lipid peroksidasyon ürünleri oluşur (Lamba ve diğ. 1991; Yin ve diğ. 2011). Lipitlerde meydana gelen bu dejeneratif çoğalma reaksiyonlarına alkenler, malondialdehit (MDA) gibi karbonil bileşikleri, lipid aldehytleri ve alkil radikallerini içeren çeşitli son ürünlerin oluşması eşlik eder. Sonuç olarak LPS uygulanmış grubun hipokampus dokusundaki olefinik gruplarının miktarında meydana gelen artış dokuda bu lipid peroksidasyon son ürünlerinin birikmesinden kaynaklanmış olabilir (Zwart ve diğ. 1999; Yin ve diğ. 2011). Hipokampus dokusunda etanol intoksikasyonunun etkilerini FTIR spektroskopisi ile araştıran önceki bir çalışmada, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak lipid peroksidasyon son ürünlerinin artışına bağlı olefinik bant alanı ve doymamış/doymuş lipid oranında artış rapor edilmiştir (Elibol ve diğ. 2011). Severcan ve diğ. (2005) tarafından gerçekleştirilen bir başka FTIR çalışmasında diyabetin sıçanlarda lipid peroksidasyonunu artırdığı olefinik bantındaki artış ile tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca lipid peroksidasyonu son ürünlerinin varlığı, lipid peroksidasyon testi olarak bilinen TBARS (tiobarbiturik asit reaktif madde) testiyle doğrulanmıştır (Severcan ve diğ. 2005).

Lipid peroksidasyonu ile ilgili daha önce rapor edilen sonuçlarda lipid peroksidasyon son ürünlerinde karbonil ester gruplarında bir artış olduğu tespit edilmiştir (Lamba ve diğ. 1991; Lamba ve diğ. 1994; Manda ve diğ. 2007). Bizim deney sonuçlarımız incelendiğinde, LPS uygulanmış grupta karbonil bantının alanının (Şekil 3.13.) ve

karbonil ester/lipit oranının (Şekil 3.27.) arttığı görülmektedir. Bu sonuç, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, LPS enjeksiyonundan sonra hipokampus dokusunda lipit peroksidasyon son ürünlerinin biriktiği ve bu birikim sonucunda olefinik ve karbonil gruplarının arttığı sonucunu desteklemektedir. Benzer şekilde, Cakmak ve diğ. (2012) grubumuz tarafından gerçekleştirilen sıçan beyinde radyoprotektan bir ajan olan amifostinin iyonize edici radyasyona karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı önceki bir başka çalışmada lipit peroksidasyonuna bağlı olarak doymamış/doymuş lipit ve karbonil ester/lipit oranlarında anlamlı derecede artışlar rapor edilmiştir. İnflamatuvar cevabın oluşmasında serbest radikaller ile reaktif oksijen molekülleri de rol almaktadır (Goode ve Webster 1993; Jaeschke 2011). Merkezi sinir sisteminde meydana gelen herhangi bir inflamatuvar yanıt sırasında aktive olan mikrogliaların sitokin, kemokin, nitrik oksit ve reaktif oksijen moleküllerini salgıladıkları bilinmektedir (Noh ve diğ. 2014). Serbest radikaller, reaktif oksijen molekülleri ve reaktif nitrojen molekülleri, normal metabolik olaylar sırasında mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron taşıma sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monositlerin ve nötrofillerin fagositozunda devamlı olarak üretilmektedir. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipit peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahip olmaktadır (Cochrane 1991). Lipit peroksidasyonunun en önemli sebeplerinden biri olan oksidatif stres, dokuda oksidant ve antioksidantlar arasındaki dengenin bozulmasıdır. Bilindiği gibi beyin içerdiği yüksek miktarda doymamış yağ asidi içeriğinden dolayı oksidatif strese karşı son derece duyarlıdır (Skaper ve diğ. 1999). Beyin fosfolipit kompozisyonundaki ve lipit peroksidasyon seviyesindeki değişiklikler beyin yaralanması, hipoksiya, şizofreni ve epilepsi modellerde daha önce rapor edilmiştir (du Bois ve diğ. 2005; Freitas ve diğ. 2005; Kikuchi ve diğ. 2006; Tejada ve diğ. 2006; Tejada ve diğ. 2007; Freitas 2009). Beynin çeşitli bölgelerinde sistemik inflamasyon boyunca LPS uygulaması sonrasında yüksek miktarda serbest radikal üretimi ve lipit peroksidasyon düzeyinin artışı gözlenmiştir. Örneğin, daha önce gerçekleştirilen bazı çalışmalarda oksidatif stresin bir kanıtı olarak LPS enjeksiyonundan sonra beyinde antioksidant kapasitesinde azalma rapor edilmiştir (Suliman 2004; Arsenijevic 2007; Fergar 2010). Czapski ve diğ. (2004) lipit peroksidasyonu gibi oksidatif süreçlerin aktivasyonuna katılan lipooksigenazların LPS enjeksiyonundan sonra gözlendiğini rapor etmiştir.

Lipit kaynaklı CH_3 antisimetrik ile CH_2 antisimetrik ve simetrik gerilme bantlarının yer aldığı C-H gerilme bölgesi analiz edildiğinde, bu bantların alanlarında kontrol

gruplarına göre anlamlı ölçüde artış gözlemlendi (Şekil 3.7. ve 3.8.). Lipit miktarındaki artış, lipit biyosentezindeki artışa karşılık gelmektedir. Bu sonuç CH_2/CH_3 antisimetrik bant alan oranlarındaki artış ile desteklenmektedir. Çünkü söz konusu orandaki artış lipit zincir uzunluğundaki artışa tekabül etmektedir. C-H gerilme bölgesine ilaveten parmak izi bölgesindeki spektral bantlarda da analiz yapılmıştır. Söz konusu bölgede 1461 cm^{-1} 'de yer alan CH_2 bükülme bantının alanı da lipit miktarı hakkında bilgi vermektedir. Bu bantta gözlenen artış (Şekil 3.9.), lipit içeriğinde artış olduğu sonucunu desteklemektedir. Ayrıca yukarıda belirtildiği gibi karbonil ester bantının alanında karbonil ester/lipit oranındaki artışta lipit içeriğindeki artışı gösterir (Şekil 3.27.). Karbonil ester bantının dalga sayısı değerinde gözlenen kayma ise lipitlerde yapısal olarak bir takım değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir (Şekil 3.14.). Lipitlerden kaynaklanan bütün bantların alan değerinde tespit edilmiş olan anlamlı artışlar LPS uygulanmış sıçan hipokampusünde lipit içeriğinde artış olduğunu göstermektedir. Beyin, adipoz dokudan sonra vücutta en fazla lipit içeren dokudur ve nöronal sinyalleşmedeki rollerinden dolayı beyin lipit metabolizması özel bir öneme sahiptir. Bozulmuş lipit metabolizması Alzheimer, Parkinson, MS, Huntington hastalığı, ALS, şizofreni, bipolar bozukluk ve epilepsi gibi birçok hastalıkta rapor edilmiştir (Adibhatla ve Hatcher 2007). Örneğin, Cole-Edwards ve Bazan (2005), epileptik nöbetlerin sinapslarda membran lipitlerinden türeyen yağ asidi birikimine neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca epileptik nöbetlerin limbik yapılarda ve kortikal alanlarda sadece basit nöron kaybına değil, aynı zamanda sinaptik yapılanmanın değişmesine ve yeniden organize olmasına neden olmaktadır (Çakıcı Başak 2013).

CH_2 antisimetrik ve simetrik bantlarının dalga sayılarındaki değişimlerin değerlendirilmesi lipit düzen ve düzensizliği hakkında bilgiler elde etmek için kullanılır (Rodriguea ve diğ. 2009; Severcan ve Haris 2012). LPS uygulanmış hipokampus dokusunda CH_2 antisimetrik bantının dalga sayısı değerinde anlamlı ölçüde artış elde edilmiştir ki (Şekil 3.10.), bu da lipit düzenindeki azalmayı göstermektedir. LPS uygulanmış sıçan hipokampusündeki lipitlerin yapısında gözlenen lipit düzenindeki azalma sistemik inflamasyon tarafından indüklenen oksidatif stresle bağlantılı olabilir. Çalışmamızı destekleyen diğer bir çalışmada, fosfolipitlerdeki oksidatif strese bağlı lipit düzeninin azalması elektron paramanyetik spektroskopisi ile de tespit edilmiştir (Megli ve Sabatini 2004).

CH₂ antisimetrik ve simetrik bantlarına ait bant genişliklerindeki değişimler ise, membran lipitleri akışkanlığında meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla kullanılır (Severcan ve Haris 2012). CH₂ antisimetrik bantının genişliğinde, LPS uygulanmış grupta kontrol grubuna göre artma meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 3.11.). Bant genişliğinde azalma ve artma lipit akışkanlığında azalma ve artmayı işaret etmektedir. Lipit akışkanlığındaki söz konusu değişim örneklere ait lipit kompozisyonundaki, diğer bir ifade ile doymuş yağlar, fosfolipitler ve kolesterol v.b. lipit miktarları ile bunların birbirlerine göre olan bağıl değişimlerinden kaynaklanmış olabilir (Inbar ve diğ. 1977).

FTIR spektroskopisi biyolojik sistemlerdeki proteinlerin lipitlerle birlikte çalışılmasına imkân sağlayan bir tekniktir (Szalontai ve diğ. 2000; Cakmak ve diğ. 2011). 1653 ve 1545 cm⁻¹ de yer alan amid I ve CH₃ antisimetrik bantları proteinlerdeki yapı ve konsantrasyondaki değişimler hakkında bilgiler vermektedir. Söz konusu, bantların bant alanında, LPS grubunda anlamlı ölçüde artma meydana gelmiştir (Şekil 3.15.). Söz konusu bantların analizinden elde edilen hipokampus dokusundaki protein miktarlarındaki artış, protein kaynaklı CH₃ simetrik bant alanındaki artışla da desteklenmektedir. Ayrıca proteinlerden güçlü sinyaller alan amid A, amid B (Şekil 3.3.) ve amid III (Şekil 3.20.) bantlarının alan değerlerinde kaydedilen anlamlı artışlar da LPS uygulanmış gruptaki proteinlerin arttığı sonucunu desteklemektedir. Proteinlerden kaynaklanan bütün bantların alan değerlerinde kaydedilen bu artış hipokampüsteki toplam protein içeriğinin dolayısıyla protein sentezinin arttığını göstermektedir. Sistemik inflamasyon sırasında uyarana karşı başlatılan immün cevabın bir parçası olarak birçok proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1, IL-2 vb.) salgılanmaktadır. Bütün bu sitokinler protein veya polipeptit yapılı olduğundan sistemdeki protein miktarının artışının sebebi bu tarz aracı moleküllerin artışından kaynaklanmış olabilir. Skelly ve diğ.(2013) beyinde makrofajlardan oluşan mikroglialların LPS enjeksiyonuna cevap olarak nükleer faktör kappa B, TNF- α , IL-1 β ve diğer proinflamatuvar proteinlerin arttığını rapor etmiştir. LPS'nin mikroglial hücreleri interlökin-6, TNF- α ve insülin benzeri büyüme faktör 1'i salgılamak üzere aktive ettiği bilinmektedir. Fu ve diğ. (2014), LPS'nin sistemik enjeksiyonunun hipokampus ve özellikle dentat girusta astrogliosis ve TNF, IL-1 ve NF-kB proteinlerinin mRNA seviyelerinde ve protein seviyesinde artışa sebep olduğunu göstermiştir. LPS grubunda amid I bantının dalga sayısı değerinde ve amid I bantının

bant genişliğinde azalma gözlemlendi (Şekil 3.16. ve 3.17.). Bu değişimler LPS enjeksiyonuna bağlı olarak protein yapılarında ve konformasyonlarında önemli değişimlerin olduğunu göstermektedir ki, bu sonuç amid I/amid II alan oranında elde edilen değişimlerle de (Şekil 3.18.) desteklenmektedir (Ozek ve diğ. 2014; Severcan ve Haris 2012). Değişik hastalık durumlarında proteinlerin fonksiyonlarını anlayabilmek için proteinlerin yapısal değişimleri saptamak yeni tedavi yöntemleri geliştirebilmek açısından gereklidir. Örneğin; Alzheimer hastalığının anlaşılabilmesi için beyinde anormal amiloid beta (A β) protein plaklarının ve tau proteininden oluşan nörolif yumaklarının birikiminin ve tespit edilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir (Holmes ve Butchart 2011).

Yapılan protein ikincil yapı analizi çalışmalarında elde edilen sonuçlar hipokampus dokusunda turn (dönme) miktarında azalma ve random coil (tesadüfi kıvrılma) miktarında artış (Şekil 3.30.) olduğunu göstermiştir ki bu da LPS uygulanmış grupta proteinlerde denatürasyonun olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda hipokampus dokusundaki protein ikincil yapılarında meydana gelebilecek değişimlerin tespit edilmesi, makromoleküler yapı ve fonksiyonlardaki değişimlerin belirlenmesi için gereklidir. Şimdiye kadar metabolik rahatsızlıklarla ilgili yapılan çalışmalarda, değişik proteinlerin miktarları ve gen ekspresyonları incelenmiştir (Kim ve diğ. 2004; Deangelis ve diğ. 2005; Qiu ve diğ. 2005; Koza ve diğ. 2006; Charbonneau ve diğ. 2007; Benoit ve diğ. 2009). Protein yapılarındaki ve buna bağlı olarak da fonksiyonlarındaki değişimler, yalnızca gen ekspresyonundaki veya protein sentezindeki farklılaşmalara bağlı değildir. Proteinlerin görevlerini tam olarak yapabilmeleri doğal hallerindeki üç boyutlu yapılarına bağlıdır (Anfinsen 1973). Proteinlerin katlanma aşamasında meydana gelebilecek her türlü hata, proteinlerin farklı ikincil, üçüncül ya da dördüncül yapılarla ulaşmalarına, böylece ilgili proteinlerin işlevlerini yitirmelerine veya farklı işlevlere sahip olmalarına neden olmaktadır (Soto 2001). Bu nedenle, ekspresyon değişikliği olmadan, yalnızca var olan proteinlerin birincil ya da ikincil yapılarının değişmesinin de proteinlerde fonksiyon bozulmalarına yol açabildikleri bilinmektedir. Örneğin, protein konformasyon değişimleri nedeni ile protein fonksiyon kaybı ve çökmesi (agregasyonu) gözlenen Alzheimer, Parkinson, Huntington ya da prion hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklarda çökelen proteinlerin çoğunlukla β -plakalı yapısında olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Blake ve Serpell 1996; Perutz ve diğ. 2002; Jaronic ve diğ. 2004). Serbest radikal üretimindeki artış hücrenin redoks potansiyelini

değiştirerek, proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin ikincil yapısını değiştirebilir (Olivares-Corichi ve diğ. 2005). Fakat protein yapısındaki bu değişiklikler sadece varolan proteinlerin yeniden düzenlenmesinden kaynaklanmayabilir. Sistemik inflamasyon sırasında uyarana cevap olarak meydana gelen yeni proteinlerin sentezlenmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Dahası lipit içeriğinde meydana gelmiş olan değişikliklerden kaynaklanan membran kalınlığında meydana gelen değişiklikler protein konformasyonunda direkt bir etki yaratmış olabilir (Slater ve Huang 2005).

Lipit/protein oranı membran fonksiyonu ile yakından ilişkili olan lipit ve/veya protein antisimetrisindeki değişiklikler hakkında bilgi vermektedir (Bozkurt ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010). Çalışmamızda hem lipit miktarında hem de protein miktarında anlamlı değişiklikler tespit edildiğinden lipit/protein oranında gözlenmiş olan azalma (Şekil 3.28.) LPS uygulanmış sıçan hipokampusünde protein miktarındaki artışın lipit miktarındaki artıştan daha fazla olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca bu azalma LPS uygulanmış hipokampus dokusunun hücre zarlarında lipit antisimetrisinde değişiklik olduğunu göstermektedir. Lipit antisimetrisinde meydana gelen değişikliklerin hücre içi ve hücreler arası iyon konsantrasyonunda ve sonuçta membran fonksiyonunda önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Becker ve diğ. 2003).

1300-900 cm^{-1} bölgesi karbonhidratlar ve nükleik asit ve fosfolipit gibi fosfat grubu taşıyan makromoleküllerden kaynaklanan bantları içermektedir. LPS uygulanmış grupta nükleik asitlerin ana bantları olarak bilinen 972 cm^{-1} ve 927 cm^{-1} 'de ortaya çıkan bantlarda anlamlı derecede artış gözlemlendi (Şekil 3.24. ve 3.25.). Bu bulgu fosfolipitlerden ve karbonhidratlardan da sinyaller alan tamamlayıcı bantlar olarak bilinen PO_2^- antisimetrik ve simetrik (Şekil 3.21.) ve CO-O-C antisimetrik bantlarında (Şekil 3.23.) gözlenen paralel değişiklikler tarafından desteklenmektedir. Nükleik asit miktarında gözlenen bu artışın sebebi sistemik inflamasyon sırasında birçok genin yeni aracı proteinler sentezlemek üzere aktive edilmiş olması olabilir. Literatürde TNF- α , IL-1, IL-2, HMGB1 vb. birçok aracı protein genlerinin sistemik inflamasyona adaptasyon sürecinde reseptörlerinin sayısında artma (up regülasyonları) ile ilgili kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, Czapski ve diğ. (2010) LPS enjeksiyonundan 3 saat sonra iNOS, COX-2 ve TNF α için mRNA seviyesinin arttığını bulmuşlardır (Czapski 2010). Nükleik asit/protein oranında anlamlı bir düşme gözlenmiştir (Şekil 3.29.). Bu düşüş

dokudaki translasyon hızının transkripsiyon hızından daha yüksek olduğunu göstermektedir (Elibol ve diğ. 2015). PO_2^- antisimetrik ve z-form DNA bantının dalga sayısı değerinde gözlenen kayma (Şekil 3.22. ve 3.25.) ise LPS grubundaki nükleik asitlerin konformasyonunda değişiklik olduğunu göstermektedir. Artan nükleik asit içeriği ve nükleik asitlerde gözlenen konformasyon değişikliğinin nedeni LPS uygulanmış grupların hücre çekirdeklerinin morfolojisi, organizasyonu ve mimarisinde meydana gelen değişiklikler olabilir. Örneğin LPS uygulamasından sonra çekirdek/sitoplazma oranı değişmiş olabilir, hücre bölünmesi hızlanmış ve DNA kondansasyonunda azalma meydana gelmiş olabilir (Chiriboga ve diğ. 2000).

Çalışmamızda, hipokampus dokusunun spektral verilere dayalı olarak gerçekleştirilen hiyerarşik kümeleme analizi sonucunda kontrol ve LPS uygulanmış dokular birbirinden başarılı bir şekilde ayrılmıştır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Nörodejeneratif hastalıklar kazanılmış becerilerin kaybı ve ilerleyici mental yıkım ile karakterize edilen sinir sistemi hastalıklarıdır ve gelişmiş toplumlarda yaşam süresinin uzamasıyla görülme sıklıkları da artmaktadır. Sistemik inflamasyonun bu hastalıkların etiyolojisinde bulunduğu bilinmekle birlikte merkezi sinir sisteminde patolojiye yol açmış olabilecek ne gibi moleküler, yapısal ve kompozisyonel değişimlere sebep olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışma, yapısal ve içeriksel biyomoleküler değişimleri inceleyerek merkezi sinir sistemi ile bağışıklık sistemi arasındaki ilişkiyi anlamaya katkıda bulunmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, LPS uygulaması ile oluşturulan sistemik inflamasyonun hipokampus dokusundaki makromoleküllerin yapı ve içeriğinde meydana getirdiği değişiklikler moleküler düzeyde FTIR spektroskopisi tekniği kullanılarak incelenmiştir.

FTIR spektroskopisi tekniği ile doymuş ve doymamış lipit, protein, nükleik asit miktar ve yapısındaki değişimler, doymamış/doymuş yağ, karbonil ester/lipit, lipit/protein, nükleik asit/protein, amid I/II oranı gibi molekül miktarları arasındaki oranlar, membran akışkanlığı ve düzenindeki değişimler, lipit zincir uzunluğundaki ve protein ikincil yapısındaki değişimler araştırılmıştır.

FTIR spektroskopisi sonuçları; LPS uygulamasının sıçan hipokampusundaki lipit, protein ve nükleik asitlerin içerik, yapı ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler meydana getirdiğini ortaya çıkarmıştır. LPS uygulaması, hipokampus dokusundaki lipit, protein ve nükleik asitlerin miktarlarında önemli derecede artışa sebep olmuştur. LPS uygulamasından sonra lipit/protein ve nükleik asit/protein oranında azalma meydana gelmiştir. Lipit/protein oranında gözlenen azalma sistemdeki protein miktarındaki artışın lipit miktarındaki artıştan daha fazla olduğunu, nükleik asit/protein oranındaki azalma ise dokudaki transkripsiyon hızının translasyon hızından daha yüksek olduğunu göstermektedir. LPS uygulaması dokuda lipit peroksidasyon varlığını gösteren bir parametre olan doymamış yağ asidi miktarında ve doymamış/doymuş yağ asidi oranında artış meydana getirmiştir. Doymamış yağ asidi konsantrasyonunda gözlenen bu artışın lipit peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünlerin dokuda birikmesinden kaynaklandığı

düşünölmektedir. Ayrıca LPS uygulanmış grubun hipokampus dokusunda gözlenen karbonil gruplarının ve karbonil ester/lipit oranındaki artışta LPS uygulamasının sistemde lipit peroksidasyonu meydana getirdiğinin bir kanıtıdır. Ayrıca lipit zincir uzunluğunda bir artış tespit edilmiştir. LPS uygulamasının hipokampüsteki nöronların membranlarının düzenini önemli miktarda azalttığı ve membran dinamiğini önemli miktarda artırdığı gözlenmiştir. Yapılan protein ikincil yapı analizi çalışmalarından, elde ettiğimiz sonuçlar, LPS uygulamasından sonra hipokampus dokusunda turn miktarında azalma ve random coil miktarında artışın olduğunu göstermiştir ki bu da LPS uygulanmış grupta proteinlerde denatürasyon olduğunu göstermektedir. Bütün bu değişikliklere protein ve nükleik asitlerde gözlenen konformasyonel değişikliklerde eşlik etmiştir. Bu bulgular ayrıca bize, FTIR spektroskopi tekniğı kullanılarak değişik patolojik sistemler hakkında moleküler düzeyde çok değerli bilgiler elde edilebileceğini açıkça göstermiştir.

Sonuçlarımız, sistemik inflamasyonun merkezi sinir sisteminin önemli bir bileşeni olarak birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkisi açıkça ortaya konmuş olan beynin hipokampus bölgesinde önemli moleküler değişiklikler meydana getirdiğini göstermiştir. Bu nedenle çalışmamız, nörodejeneratif hastalıkların etyopatolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi için ileride gerçekleştirilecek olan çalışmalara ışık tutacaktır. Sonuçlarımız sayesinde Alzheimer, Parkinson, Multiple Sklerozis gibi nörodejeneratif hastalıkların sebepleri ve tedavisine yönelik yeni araştırmalar geliştirilebilecektir.

Bundan sonraki süreçte, çalışmamızda gözlediğimiz değişikliklerle tutarlı bir nörodejeneratif hastalık modeli ekleyerek, nörodejeneratif hastalıkların tanısı ve tedavisine yönelik, yeni çalışmalar gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- Adibhatla R.M. and Hatcher J.F., Role of lipids in brain injury and diseases, *Future Lipidol*, (2007) 2403-422.
- Aghabeigi B., The pathophysiology of the pain., *Br Dent J.*, (1992) 173 91-7.
- Akarsu E.S. and Mamuk S., Seizure susceptibility and electroencephalogram power spectra alterations at various phases of the lipopolysaccharide-induced hypothermic response in biotelemetered rats, *Epilepsy Research*, (2012) 100 20-26.
- Akarsu E.S. and Mamuk S., *Escherichia coli* lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, (2007) 292 R1846–R1850.
- Akarsu E.S., Ozdayi S., Algan E., Ulupinar F., The neuronal excitability time-dependently changes after lipopolysaccharide administration in mice: Possible role of cyclooxygenase-2 induction, *Epilepsy Research*, (2006) 71 181-187.
- Aksoy C. and Severcan F. 2012. Role of vibrational spectroscopy in stem cell research, *Hindawi Publishing Corporation Spectroscopy: An International Journal Volume 27 3*, (2012) 167–184.
- Alcaraz M.J., Fernandez P., Guillen M.I., Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase - 1 pathway. *D Curr Pharm Des.* (2003) 9 2541-51.
- Alo F., Brun P., Conti, C., Giorgini E., Rubini C. and Tosi G., Fourier Transform Spectroscopy, *11th International Conference*, The American Institute of Physics, (1998).
- Amor S., Peferoen L.A.N., Vogel D.Y.S., Breur M., Valk P., Baker D. and Noort J. M., Inflammation in neurodegenerative diseases – an update, *Immunology*, (2013) 142 151–166.
- Andrus P.G. and Strickland R.D., Cancer grading by fourier transform infrared spectroscopy, *Biospectroscopy*, (1998) 37-46.

- Anfinsen C.B., Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, **(1973)** 181 4096 223-230.
- Arsenijevic D., Hernadfalvi N., von Meyenburg C., Onteniente B., Richard D. and Langhans W., Role for nerve growth factor in the in vivo regulation of glutathione in response to LPS in mice, *Eur. Cytokine Netw.* **(2007)** 18 93–101.
- Awayda M.S., Shao W., Guo F., Zeidel M. and Hill W.G., ENaC-membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order, *J. Gen. Physiol.*, **(2004)** 123 709–727.
- Bakırcı S., Deneysel sepsis oluşturulan erişkin sıçanların beyinlerinde nörogenezin incelenmesi, *Uzmanlık Tezi*, Uludağ Üniversitesi, Bursa **(2009)**.
- Banyay M., Sarkar M. and Graslund A., A library of IR bands of nucleic acids in solution, *Biophysical Chemistry*, **(2003)** 104 477–488.
- Barr M.L. and Klernam J.A., *The Human Nervous System*, 5th edition. Philadelphia: J.B., Lippincott Comp, **(1988)** 266-9.
- Bartels A.L. and Leenders K.L., Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease: evidence from animal models to human in vivo studies with [11C]-PK11195 PET, *Mov Disord.* **(2007)** 22 131852-6.
- Becker W.M., Kleinsmith L.J. and Hardin J., Membranes: their structure, function, and chemistry, *In The World of the Cell*, 5th ed., 158–195 [B Wilbur, editor]. San Francisco, CA: Pearson Education, Inc., **(2003)**.
- Bellucci A., Bugiani O. and Ghetti B., Presence of reactive microglia and neuroinflammatory mediators in a case of frontotemporal dementia with P301S mutation, *Neurodegener Dis*, **(2011)** 8 221–9.
- Benoit S.C., Kemp C.J., Elias C.F., Abplanalp W., Herman J.P., Migrenne S., Lefevre A.L., Cruciani Guglielmacci C., Magnan C., Yu F., Niswender K., Irani B.G., Holland W.L. and Clegg D.J., Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents, *The Journal of Clinical Investigation*, **(2009)** 119 9 2577-2589.
- Beutler B., LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfillment, *J Endotoxin Res*, **(2002)** 8 329-335.

- Beutler B., TNF, immunity and inflammatory disease: Lessons of the past decade, *J Investmed* (1995) 43 227-35.
- Bienvenu J., Exploration of cytokines in biological fluids. *CR Seances Soc Biol Fil* (1995) 189 545-55.
- Blake C. and Serpell L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix, *Structure*, (1996) 4 989–998.
- Block M.L., Hong J.S., Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism, *Progress in Neurobiology*, (2005) 76 77–98
- Boeree G.C., The Emotional Nervous System, *General Psychology*, (2009).
- Boyar H. and Severcan F., Oestrogen-phospholipid membrane interactions: an FTIR study, *Journal of Molecular Structure*, (1997) 408 409 269-272.
- Boyar H., Turan B. and Severcan F., FTIR spectroscopic investigation of mineral structure of streptozotocin induced diabetic rat femur and tibia, *Spectroscopy*, (2003) 17 627–633
- Bozkurt O., Bayari S.H., Severcan M., Krafft C., Popp J. and Severcan F., Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium: Fourier transform infrared microspectroscopy and neural network study, *Journal of Biomedical Optics*, (2012) 17 7.
- Bozkurt O., Dincer Bilgin M. and Severcan F., The effect of diabetes mellitus on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue: An FTIR study, *Spectroscopy*, (2007) 21 151–160.
- Bozkurt O., Severcan M. and Severcan F., Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle, *Analyst*, (2010) 135 12 3110-3119.
- Brodal H., *Neurological Anatomy*, 3th edition, Oxford: Oxford University Press. (1981).
- Bruch R.C. and Thayer W.S. Differential effect of lipid peroxidation on membrane

- fluidity as determined by electron spin resonance probes, *Biochim. Biophys. Acta*, **(1983)** 733 216-222.
- Cakmak G., Miller L.M., Zorlu F. and Severcan F., Amifostine, a Radioprotectant Agent, Protects Rat Brain Tissue Lipids against Ionizing Radiation Induced Damage: An FTIR Microspectroscopic Imaging Study, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **(2012)**.
- Cakmak G., Togan I. and Severcan F., 17 β -estradiol induced compositional, structural and functional changes on rainbow trout liver, revealed by FTIR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol, *Aquatic Toxicology*, **(2006)** 77 1 53-63.
- Cakmak G., Togan I. and Severcan F., FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol, *Applied Spectroscopy*, **(2003)** 57 7 835-841.
- Cakmak G., Zorlu F., Severcan M. and Severcan F., Screening of protective effect of amifostine on radiation-induced structural and functional variations in rat liver microsomal membranes by FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, **(2011)** 83 7 2438-2444.
- Cameron P.G. and Charette G.M., Automation of Fourier Transform Infrared of Temperature-Induced Phenomena, *Appl. Spectrosc.*, **(1981)** 35 224.
- Carpenter M.B. and Sutin J., *Human Neuroanatomy*. 8th edition, Baltimore: Williams & Wilkins Pres, **(1983)** 237.
- Casal H.L. and Mantsch H.H., Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy, *Biochim Biophys Acta*, **(1984)** 779 381-401.
- Charbonneau A., Unson C.G. and Lavoie J.M., High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise, *J Physiol*, **(2007)** 579 1 255–267.
- Chiriboga L., Yee H. and Diem M., Infrared spectroscopy of human cells and tissue. Part VII: FT-IR microscopy of DNAase- and RNAase-treated normal, cirrhotic, and neoplastic liver tissue, *Appl Spectrosc.*, **(2000)** 54 480–5.
- Cirino G., Factor Xa as an Interface between coagulation and inflammation, *J Clin Invest*, **(1997)** 99 2446-51.

- Cochrane E. and McCarthy I.D., Rapid effects of parathyroid hormone (1-34) and prostaglandin E2 on bone blood flow and strontium clearance in the rat in vivo, *J Endocrinol.* (1991) 131 3 359-65.
- Cole-Edwards K.K. and Bazan N.G., Lipid signalling in experimental epilepsy, *Neurochem. Res.* (2005) 30 847–853.
- Coleman J.W., Nitric oxide: A regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* (2002) 129 4-10.
- Collins L.M., Acute and chronic inflammation, *Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. WB Saunders Company (1988).
- Collins L.M., Toulouse A., Connor T.J. and Nolan Y.M., Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease, *Neuropharmacology*, (2012) 62 7 2154-68.
- Cooper L.N., Distributed memory in the central nervous system: possible test of assumptions in visual cortex, *The Organisation of The Cerebral Cortex*. 2nd edition, Cambridge. MIT Press, (1981) 479-503.
- Cristofaro P., Opal S.M., Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs*, (2006) 66 15-29.
- Curtis M.T., Gilfor D. and Farber J.L., Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1984) 35 644–649.
- Çakıcı Başak N., Deneysel epilepsi modelinde prolaktin hormon düzeyinin hipokampus üzerine etkisi, *Uzmanlık Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara (2013).
- Çevikbaş U., Temel Patoloji. *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul; (1995) 25-60.
- Damas P., Canivet J.L., de Groote D., Vrindts Y., Albert A., Franchimont P., Lamy M., Sepsis and serum cytokine concentrations, *Crit Care Med*, (1997) 25 3 405-412.
- Deangelis R.A., Markiewski M.M., Taub R. and Lambris J.D., A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappa B inhibitor, I kappa B alpha, *Hepatology*, (2005) 42 1148-1157.
- Diem M., Boydston-White S. and Chiriboga L., Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject, *Applied Spectroscopy*, (1999) 53 148A-161A.

- Dinarelo C.A., Biologic basis for interleukin-1 in disease, *Blood*, 87 (1996) 2095-147.
- Dogan A., Ergen K., Budak F. and Severcan F., Evaluation of disseminated candidiasis on an experimental animal model: An FTIR Study, *Applied Spectroscopy*, (2007) 61 2 199-203.
- Dogan M.D., Ataoglu H. and Akarsu E.S., Characterization of the hypothermic component of LPS-induced dual thermoregulatory response in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, (2002) 72 143-150.
- du Bois T.M., Deng C. and Huang X.F., Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems and schizophrenia, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, (2005) 29 878–888.
- Ferger A.I., Campanelli L., Reimer V., Muth K.N., Merdian I., Ludolph A.C. and Witting A., Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia, *J. Neuroinflammation*, (2010) 7 45–54.
- Freifelder D., Applications to biochemistry and molecular biology, *Physical Chemistry*, Freeman Press, W. H. (Ed), New York, (1982) 145.
- Freitas R.M., Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine, *Neurosci. Lett.* (2009) 462 225–229.
- Freitas R.M., Souza F.C.F., Vasconcelos S.M.M., Viana G.S.B. and Fonteles M.M.F., Fonteles, oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats, *FEBS J.* (2005) 272 1307–1312.
- Fu H.Q., Yang T., Xiao W., Fan L., Wu Y. and Terrando N., et al., Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats, *PLoS ONE* 9:e106331 (2014).
- Fukuyama Y., Yoshida S., Yanagisawa S. and Shimizu M., A Study on the Differences Between Oral Squamous Cell Carcinomas and Normal Oral Mucosae Measured by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biospectroscopy*, (1999) 5 117-126.
- Gabbita S.P., Srivastava M.K., Eslami P., Johnson M.F., Kobritz N.K., Tweedie D., Greig N. H., Zemlan F. P., Sharma S. P. and Harris-White M.E., Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor necrosis factor- α prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Journal of Neuroinflammation*, (2012) 9-99.

- Gangloff M., Gay N.J., MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, (2004) 29 6 294-300.
- Garip S. and Severcan F., Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2010) 52 580-588.
- Garip S., Gozen A.C., Severcan F., Use of fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates", *Food Chemistry*, (2009) 113 4 1301-1307.
- Gasper R., Dewelle J., Kiss R, Mijatovic T. and Goormaghtigh E., IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures, *Biochimica et Biophysica Acta*, (2009) 1788 1263-1270.
- Genç İnan A., Molecular characterization of the effects of valdecoxib on colon cancer cell lines (HT29 & SW620) using ATR-FTIR spectroscopy, *Doktora Tezi*, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara (2014).
- Gerwert K.K., *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*. Hoboken: John Wiley & Sons, (2010).
- Goode H.F. and Webster N.R., Free radicals and antioxidants in sepsis, *Crit Care Med.*, (1993) 21 111770-6.
- Green J.D., The hippocampus, Field J (editor). *Handbook of Physiology*. Washington: American Physiological Society, (1960) 1373-89.
- Guyton A.C. and Hall J.E., *Textbook of Medical Physiology*, Çavuşoğlu H. (Çeviren) 757- 1010-38, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, (1996).
- Haris P. and Severcan F., FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *J. Molecular Catalysis: B (Enzymatic)*, (1999) 7 207-221.
- Haris P.I. and Chapman D., *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, Inc., USA, (1996) 239-278.
- Hart B.L., Biological basis of the behavior of sick animals, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, (1988) 12 123-137.

- Haupt W., Zirngibl H., Stehr A., Reise J., Holzheimer R.G. and Hohenberger W., Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in septic patients and the regulatory effect of plasma, *Eur J Surg.*, **(1999)** 165 2 95-100.
- Hill K.E., Zollinger L.V., Watt H.E., Carlson N.G., Rose J.W., Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage. *J. Neuroimmunol.*, **(2004)** 151 171–179.
- Holmes C. and Butchart J., Systemic inflammation and Alzheimer's disease, *Biochem Soc Trans.*, **(2011)** 39 4 898-901.
- Inbar M., Goldman R., Inbar L., Bursuker I., Goldman B., Akstein E., Segal P., Ipp E. and Ben-Bassat I., Fluidity difference of membrane lipids in human normal and leukemic lymphocytes as controlled by serum components, *Cancer Research*, **(1977)** 37 3037-3041.
- Jack R.S., Fan X., Bernheiden M., Rune G., Ehlers M., Weber A., Kirsch G., Mentel R., Fürll B., Freudenberg M., Schmitz G., Stelter F., Schütt C., Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature*, **(1997)** 389 742-5.
- Jaeschke H., Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts, *J Gastroenterol Hepatol*, **(2011)** 26 1 173-179.
- Jaroniec C.P., MacPhee C.E., Bajaj V.S., McMahon M.T., Dobson C.M. and Griffin R.G., High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci USA*, **(2004)** 101 711–716.
- Jellinger K.A., The pathology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **(2001)** 86 55–72
- Kagan J.C., Medzhitov R., Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, **(2006)** 125 943-55.
- Kandel E.R., Cellular insights into behavior and learning. In: The Harvey Lectures, New York: *Academic Press Inc.* **(1979)** 73 19-92.
- Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessel T.M., *Principles of Neural Science*. 4th edition, New York: Mc Graww-Hill Comp. **(2000)** 1233.

- Kang J.Y., Lee J.O., Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem*, (2011) 80 917-41.
- Kawai T. and Akira S., The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: up date on Toll-like receptors, *Nat Immunol*. (2010) 11 373-84.
- Kawai T., Akira S., Toll- like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, (2011) 34 637-50.
- Khouw A.S., Parthasarathy S. and Witztum J.L., Radioiodination of low density lipoprotein initiates lipid peroxidation: Protection by use of antioxidants, *J. Lipid Res.*, (1993) 34 1483-1496.
- Kikuchi Y., Kakeya T., Nakajima O., Sakai A., Ikeda H., Yamaguchi N., Yamazaki T., Tanamoto K., Matsuda H., Sawada J. and Takatori K., Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein, *FEBS J*. (2006) 275 2965–2976.
- Kim S., Sohn I., Ahn J., Lee K., Lee, Y.S. and Lee Y.S., Hepatic gene expression profile in long-term high-fat diet-induced obesity mouse model, *Gene*, (2004) 340 99–109.
- Kitchens R.L., Wang P.Y. and Munford R.S., Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways, *J Immunol*, (1998) 161 5534 45 109
- Klainer P.H, Mongillo B., Hypothermia. In: Harwood-Nuss A.L., Linden C.H., Luten R.C., Shepherd S.M., Wolfson A.B. (Eds.). *The Clinical Practice of Emergency Medicine*, 2nd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, (1996) 1470- 1473.
- Kluger M.J., Fever: role of pyrogens and cryogens, *Physiol. Rev.* 71, (1991) 93-127.
- Kneipp J., Lasch P., Baldauf E., Beekes M. and Naumann D., Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, *BBA*, (2000) 1501 189-199.
- Koc Okudur S., Ratlarda hipokampus ve subventriküler zonda hücre sel senesens üzerine kurkuminin etkisi, *Uzmanlık Tezi*, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir (2013).
- Koza R.A., Nikonova L., Hogan J., Rim J.S., Mendoza T., Faulk C., Skaf J. and Kozak

- L.P., Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice, *PLoS Genetics*, (2006) 2 5 769-780.
- Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L., Robbins Basic Pathology, *Saunders*, (2003).
- Kummer M.P., Hermes M., Delekarte A., Hammerschmidt T., Kumar K., Terwel D., Walter J., Pape H.C., König S., Roeber S., Jessen F., Klockgether T., Korte M., Heneka M.T., Nitration of Tyrosine 10 Critically Enhances Amyloid β Aggregation and Plaque Formation, *Neuron*, Volume 71, Issue 5 (2011) 833–844.
- Kunkel S.L., Chemokines and their role in human disease, *Agents Actions*; 46 (Suppl): (1995) 11.
- Kuralay F., Çavdar Z., İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg.* (2006) 16 3 143-152
- Kushner I. and Rzewnicki D.L., The acute phase response. In: Mackowiak, P.A. (Ed.), *Fever: Basic Mechanisms and Treatment*, Lippincott-Raven, Philadelphia, (1997) 165-176.
- Lamba O.P., Borchman D. and Garner W.H., Spectral characterization of lipid peroxidation in rabbit lens membranes induced by hydrogen peroxide in the presence of Fe^{2+}/Fe^{3+} cations: A sitespecific catalyzed oxidation, *Free Radical Biol Med.*, (1994) 10 591-601.
- Lamba O.P., Lal S., Yappert M.C., Lou M.F. and Borchman D., Spectroscopic detection of lipid peroxidation products and structural changes in a sphingomyelin model system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, (1991) 1081 181-187.
- Leskovjan A.C., Kretlow A. and Miller L.M., Fourier transform infrared imaging showing reduced unsaturated lipid content in the hippocampus of a mouse model of Alzheimer's disease, *Anal Chem*, (2010) 82 2711-2716.
- Liquier J. and Taillandier E., Infrared spectroscopy of nucleic acids, *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, Inc., USA, pp. (1996) 131-158.
- Liu K.Z., Bose R. and Mantsch H.H., Infrared spectroscopic study of diabetic platelets, *Vib. Spectrosc.*, (2002) 28 131–136.

- Liu K.Z., Jackson M., Sowa M.G., Haisong J.U., Dixon I.M.C. and Mantsch H.H., Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy, *Biochimi. Biophys. Acta (BBA)- Mol. Basis. Dis.*, **(1996)** 1315 2 73-77.
- Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S., LPS/TLR4 signal Transduction pathway. *Cytokine*, **(2008)** 42 145-51
- Lucin K.M. and Wyss-Coray T., Immune activation in brain aging and neurodegeneration: Too much or too little?, *Neuron*, **(2009)** 64 110–122.
- Luneva O.G., Brazhe N.A., Maksimova N.V., Rodnenkov O.V., Parshina E.Y., Bryzgalova N.Y., Maksimov G.V., Rubin B., Orlov S.N. and Chazov E.I., Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: Role of augmented plasma cholesterol, *Pathophysiology*, **(2007)** 14 41-46.
- Maetzler W., Berg D., Synofzik M., Autoantibodies against amyloid and glial derived antigens are increased in serum and cerebrospinal fluid of Lewy body-associated dementias, *J Alzheimers Dis.*, **(2011)** 26 171–9.
- Majno G. and Joris I., *Cells, Tissues and Disease*, Oxford Univ. Press, **(2004)**.
- Majno G., *The healing hand: Man and Wound In The Ancient World*, Cambridge: Harvard University Press, **(1975)**.
- Manda K., Ueno M., Moritake T. and Anzai K., A-lipoic acid attenuates x-irradiation-induced oxidative stress in mice, *Cell Biol. Toxicol.*, **(2007)** 23 129–137.
- Mantsch H.H., Biological application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A study of phase transitions in biomembranes, *J. Mol. Structure*, **(1984)** 113 201-212.
- Marcelli A.C., Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy. *Biotechnology Advances*, **(2012)** 1390-404.
- Margdius H.S., Kallikreins and kinnins: Some answered questions about system characteristics and roles in human disease, *Hypertension*, **(1995)** 26 221-9.
- Mc Allister A.K. and Patterson P.H., Introduction to special issue on neuroimmunology in brain development and disease, *Dev Neurobiol.*, **(2012)** 72

10 1269-71.

- Mc Allister A.K. and Van de Water J., Breaking boundaries in neural-immune interactions, *Neuron*, (2009) 64 9–12.
- Megli F.M. and Sabatini K., Mitochondrial phospholipid bilayer structure is ruined after liver oxidative injury in vivo, *FEBS Lett.* (2004) 573 1-3 68-72.
- Melin A.M., Perromat A. And Deleris G., Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: In vivo toxicity of carbon tetrachloride on rat liver, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, (2000) 57 160-168.
- Mendelsohn R. and Mantsch H.H., Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction, *Progress in Protein-Lipid Interactions*, Volume 2, Elsevier Science Publishers, Netherlands, (1986) 103-147.
- Moore D.J., Sills R.H. and Mendelsohn R., Peroxidation of erythrocytes: Ftir spectroscopy studies of extracted lipids, isolated membranes, and intact cells, *Biospectroscopy*, (1995) 133-140.
- Morgan B.P., Physiology and pathophysiology of complement: Progress and trends, *Crit Rev Clin lab Sc.* (1995) 32265-98.
- Mosley R.L., Hutter-Saunders J. A. and Stone D.K., Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a009381 (2012).
- Movasaghi Z., Rehman S. and Rehman I.U., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues, *Appl Spectrosc Rev*, (2008) 43 134-179.
- Mullington J.M., Hinze-Selch D., Pollmavher T. Mediators of inflammation. *Ann N Y Acad Sci.*, (2001) 933 201-10.
- Nilsson M.R., Techniques to study amyloid fibril formation in vitro, *Investigating Protein Folding*, Misfolding and nonnative states: experimental and theoretical methods, (2004) 34 1 151–160.
- Noh H., Jeon J., Seo H., Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain, *Neurochemistry International*, (2014) 69 35–40.
- Nolte J., *The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy*. 2nd edition,

Toronto: C V Mosby Company (1988).

- Olivares-Corichi I.M., Ceballos G., Medina-Santillan R., Medina-Navarro R., Guzman-Grenfell, A.M. and Hicks, J.J., Oxidation by reactive oxygen species (ROS) alters the structure of human insulin and decreases the insulin-dependent D-glucose-C14 utilization by human adipose tissue, *Front Biosci*, (2005) 10 3127-31.
- Ozek N.S., Bal I.B., Sara Y., Onur R. and Severcan F., Structural and functional characterization of simvastatin-induced myotoxicity in different skeletal muscles, *Biochimica et Biophysica Acta* (2014) 1840 406–415.
- Ozek N.S., Tuna, S., Erson-Bensan A.E. and Severcan F., Characterization of micro RNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy, *Analyst*, (2010) 135 (12) 3094-102.
- Özdemir P.S., Lipopolisakkarit uygulanan sıçanların karaciğerinde tempol'ün rolü, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul (2014).
- Özüçelik D.N., Çevresel aciller, *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, (2002) 32133-146.
- Park E.J., Barbul A., Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American J Surgery*, (2004) 187 11S-6S.
- Pekin E., Enstrümental Analiz, *Paradigma Akademi Yayınları*, (2013) 68-75.
- Pelton J.T. and Mclean L.R., Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure, *Analytical Biochemistry*, (2000) 277 2 167-176.
- Perry, V.H., The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease, *Brain Behav Immun*, (2004) 18 5 407-13.
- Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J. and Lesk A., Amyloid fibers are water-filled nanotubes, *Proc Natl Acad Sci USA*, (2002) 99 5591–5595.
- Pinckard R.N., Structural and (patho) pyhsiological diversity of PAF, *Clin Rev Allergy* (1994) 12 329-59.
- Qiu L., List E.O. and Kopchick J.J.; Differentially expressed proteins in the pancreas of diet-induced diabetic mice, *Mol Cell Proteomics*, (2005) 4 9 1311-8.

- Ramesh J., Kapelushnik J., Mordehai J., Moser A., Huleihel M. and Erukhimovitch V., Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (2002) 51 251-261.
- Rask-Madsen C. and King G.L., Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes, *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, (2007) 3 1 46–56.
- Reitsma P.H., Branger J., Van Den Blink B., Weijer S., van der Poll T., Meijers J.C., Procoagulant protein levels are differentially increased during human endotoxemia. *J Thromb Haemost*, (2003) 1 1019-23.
- Rigas, B.M., Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra. *Proc. Nati. Acad. Sci*, (1990) 8140-8144.
- Rizk M., Witte M., Barbul A., Nitric Oxide and Wound Healing. *World J Surg* (2004) 28 301-6.
- Rose J.W., Hill K.E., Watt H.E., Carlson N.G., Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J. Neuroimmunol.* (2004) 149 40–49.
- Rothwell N., Allan S. and Toulmond S., The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications, *J Clin Invest*; (1997) 10011 2648-52.
- Sari A.N., Belma Korkmaz B., Serin M.S., Kacan M., Unsal D., Buharalioglu C.K., Sahan Firat S., Manthathi V.L., Falck J.R., Malik K.U., Tunctan B., Effects of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, on lipopolysaccharide-induced changes in MyD88/TAK1/IKKb/I κ B-a/NF- κ B pathway and circulating miR-150, miR-223, and miR-297 levels in a rat model of septic shock. *Inflamm. Res*, (2014) 63 741-56 112
- Schonrock L.M., Kuhlmann T., Adler S., Bitsch A., Bruck W., Identification of glial cell proliferation in early multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* (1998) 24 320–330.
- Schumann R.R., Leong S.R., Flaggs G.W., Gray P.W., Wright S.D., Mathison J.C., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Structure and function of lipopolysaccharide binding

- protein. *Science*, (1990) 249 1429-31.
- Selkoe D.J., Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of the alzheimer's disease, *Trends Neurosci* (1993) 16 403- 9.
- Sessle B.J., New insights into peripheral chemical mediators of pain and inflammation. *J Orofac Pain* (2001) 15 1-5.
- Severcan F. and Haris P.I. (eds), Applications of Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening, *IOS Press*, Amsterdam, Nederlands, Pp. (2012) 105-9
- Severcan F., Kazanci N., Baykal U. and Uzer S., IR and Turbidity Studies of Vitamin E-Cholesterol-Phospholipid Membrane Interactions, *Bioscience Reports*, (1995) Vol. 15, No. 4.
- Severcan F., Bozkurt O., Gurbanov, R. and Gorgulu G., FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model, *J. Biophoton.* 3, no 8–9 (2010) 621–631.
- Severcan F., Sahin I. and Kazanci N., Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Biochim Biophys Acta.*, (2005) 1668 2 215-222.
- Severcan F., Toyran N., Kaptan N. and Turan B., FTIR study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C-H region, *Talanta*, (2000) 53 55-59.
- Severcan M., Severcan F., and Haris P.I., Estimation of protein secondary structure from FTIR spectra using neural Networks, *Journal of Molecular Structure*, (2001).
- Severcan M., Severcan, F. and Haris I.P., Using artificially generated spectral data to improve protein secondary structure prediction from FTIR spectra of proteins, *Analytical Biochemistry*, (2004) 332 2 238-244.
- Sies H., Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochemistry* (1993) 215 213-9.
- Sills R.H., Moore D.J. and Mendelsohn R., Erythrocyte peroxidation: Quantitation by fourier transform infrared spectroscopy, *Anal. Biochem.*, (1994) 218 118-123.
- Skaper S.D., Floreani M., Ceccon M., Facci L. and Giusti P. 1999. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin, *Ann N Y Acad Sci.*; (1999) 890 107-18.

- Skelly D.T., Hennessy E., Dansereau M.A. and Cunningham C., A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1B, TNF-a and IL-6 challenges in C57BL/6 mice, *PLoS One* 8, (2013) e69123.
- Songur A., Akpolat N., Kus I., Aslan Ozen O., Zararsiz I. and Sarsilmaz M., The effects of the inhaled formaldehyde during the early postnatal period in the hippocampus of rats: a morphological and immunohistochemical study, *Neuroscience Research Communications*,(2003) 33 3 168-178.
- Songur A., Özen O.A. and Sarsılmaz M., Hipokampus, *T Klin Tıp Bilimleri* (2001) 21 427-31.
- Songur A., Sıçanlarda solunan formaldehitin postnatal gelişim sürecinde formatio hippocampi üzerine etkilerinin morfolojik olarak incelenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ (2001).
- Soto C., Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy, *Federation of European Biochemical Societies(FEBS)*, (2001) 498 204-207.
- Storlien L.H., Hulbert A.J. and Else P.L., Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, (1998) 1 6 559-563.
- Stuart B., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, John Wiley and Sons, Ltd., England (1997).
- Szalontai B., Nishiyama Y., Gombos Z. and Murata N., Membrane dynamics as seen by fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio, *Biochim Biophys Acta.*, (2000) 1509 409-419.
- Takahashi H., French S.M. and Wong P.T.T., Alteration in hepatic lipids and proteins by chronic ethanol intake: A high pressure Fourier transform infrared spectroscopic study on alcoholic liver disease in the rat, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, (1991) 15 219-223.
- Takeuchi O., Akira S., Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, (2010) 140 805-20.
- Taner D., *Fonksiyonel Nöroanatomi*, 2. Baskı, Ankara: METU Pres, (1999) 231.

- Tejada F.R., Nagy P.I., Xu M., Wu C., Katz T., Dorsey J., Rieman M., Lawlor E., Warriar M. and Messer W.S., Design and synthesis of novel derivatives of the muscarinic agonist tetra(ethylene glycol)(3-methoxy-1,2,5-thiadiazol-4-yl) [3-(1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyrid-3-yl)-1,2,5-thiadiazol-4-yl] ether (CDD-0304): effects of structural modifications on the binding and activity at muscarinic receptor subtypes and chimeras, *J Med Chem.*, **(2006)** 14 49 25 7518-31.
- Tejada S., Sureda A., Roca C., Gamundí A. and Esteban S., Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine, *Brain Res Bull*; **(2007)** 71 4 372-5.
- Temiz M., Sıçanlarda lipopolisakkaridin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyona MTOR 'nin katkısının araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Mersin Üniversitesi, Mersin **(2014)**.
- Terzioglu E., İnflamasyonun immünolojik özellikleri, *ANKEM Derg.*, **(2004)** 18 (Ek 2) 156-157.
- Thomson L.M. and Sutherland R.J., Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation, *Brain Res Bull*, **(2005)** 671-2 24-9.
- Tobias P.S., Soldau K., Gegner J.A., Mintz D., Ulevitch R.J., Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem*, **(1995)** 270 10482-8.
- Town T., Tan J., Flavell R.A., T-cells in Alzheimer's disease, *Neuromolecular Med.* **(2005)** 7 255-64.
- Toyran N. and Severcan F., Competitive effect of Vitamin D2 and Ca²⁺ on phospholipids model membranes: an FT-IR study, *Chem. Phys. Lipids*. **(2003)** 123 165-176.
- Toyran N. Turan B. and Severcan F., Selenium Alters The Lipid Content And Protein Profile of Rat Heart: An FTIR Microspectroscopic Study, *Archives of Biochemistry And Biophysics.*, **(2007)** 458 2 184-193.
- Toyran N., Lasch P., Naumann D., Turan B., Severcan F., Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study, *Biochem J.*, **(2006)** 397 3 427-36.

- Turker S., Wassall S., Stillwell W., *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, (2011) 2 379-386.
- Turker S., Ilbay G., Severcan M. and Severcan F., Investigation of Compositional, Structural, and Dynamical Changes of Pentylenetetrazol-Induced Seizures on a Rat Brain by FT-IR Spectroscopy, *Anal. Chem.*, (2014) 86 1395–1403.
- Turkoglu A.O., Formaldehitin sıçan hipokampusunda meydana getirdiği değişiklikler ve buna kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) etkisi, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Elazığ (2005).
- Ulevitch R.J. and Tobias P.S., Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin, *Annu Rev Immunol*, (1995) 13 437-57.
- Umemura J., Cameron D.G. and Mantsch H.H.A., Fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine, *Biochim Biophys Acta*, (1980) 602 32-44.
- Waage A., Production and clearance of tumor necrosis factor in rats exposed to endotoxin and dexamethasone, *Clin Immunol Immunopathol*, (1987) 453 348-55.
- Walsh M.J., Singh M.N., Pollock H.M., Cooper L.J., German M.J., Stringfellow H.F., Fullwood N.J., Paraskeva E., Martin-Hirsch P. L. and Martin F.L., ATR microspectroscopy with multivariate analysis segregates grades of exfoliative cervical cytology, *Biochem Biophys Res Commun*, (2007) 352 213-219.
- Wang J. and Zhang G.J., Influence of membrane physical state on lysosomal potassium ion permeability, *Cell Biology International*, (2005) 29 393-401.
- Ward P.A., Oxygen radicals, inflammation and tissue injury, *Free Radic Biol Med* 5 (1998) 403.
- Watts A. and De Pont J.J.H.H.M., Progress in protein–lipid interactions, vol. 2, Amsterdam, (1986) 103–147.
- Weissman G., Inflammation: Historical perspectives. In: Gallin J.I., et al (eds). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed. New York: Raven Press, (1992) 5-13.
- Wong P.T.T., Wong R.K., Caputo T.A., Godwin T.A. and Rigas B., Infrared

- spectroscopy of exfoliated human cervical cells: Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1991) 88 10988-10992.
- Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* (1990) 249 1431-3.
- Yılmaz E., Üst batin ameliyatı yapılan hastalarda hipotermiyi önlemek için ameliyat esnasında ısıtıcı blanket kullanımının etkisinin incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir (1997).
- Yin L.H. and Xu N.A., Porter, *Chem. Rev.* (2011) 111 5944–5972.
- Zhuang H., Littleton-Kearney M.T., Dore S., Characterization of heme oxygenase in adult rodent platelets. *Curr Neurovasc Res*, (2005) 2 163-8.
- Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M. and Vermeulen N.P.E., Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radical Biol. Med.*, (1999) 26 202–226.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :KAYA Yıldray
Uyruğu :T.C.
Doğum tarihi ve yeri :21.05.1991 / Kocaeli
Telefon :0 (538) 363 1123
E-posta :yildiray593@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Düzce Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Kocaeli Endüstri Meslek Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2008-2009	Unilever	İnsan Kaynakları
2012	Seka Devlet Hastanesi	Mikrobiyoloji - Biyokimya Stajı

Yabancı Dil

İngilizce (ÜDS/KPDS/TOEFL :)

Bildiriler

1. Cakmak G., Kaya Y., Mamuk S., Akarsu E. S. ve Severcan F. “Lipopolisakkarit Enjeksiyonuyla Oluşturulan Hipotermi Sırasında Sıçan Hipokampusündeki Moleküler Değişikliklerin Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ile İncelenmesi” 27. Ulusal Biyofizik Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2015, Malatya, TURKEY