



**SEREBRAL İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI  
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA OTOFAJİ ÜZERİNE  
MELATONİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ümit YILMAZ**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Süleyman SANDAL  
Doktora Tezi – 2020**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEREBRAL İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN  
SIÇANLARDA OTOFAJİ ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Ümit YILMAZ**

**Fizyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Süleyman SANDAL**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-  
2019-1970 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2020**

# İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| ÖZET .....  | vi   |
| ABSTRACT.....   | vii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....  | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....   | x    |
| TABLolar DİZİNİ.....  | xiii |
| 1. GİRİŞ .....  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....   | 4    |
| 2.1. Beynin Kanlanması .....  | 4    |
| 2.2. Willis Poligonu.....   | 5    |
| 2.3. İnme.....  | 7    |
| 2.3.1. İnmenin Epidemiyolojisi .....  | 8    |
| 2.3.2. İnmenin Risk Faktörleri.....   | 8    |
| 2.3.2.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri.....                                    | 9    |
| 2.3.2.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri.....                                    | 11   |
| 2.4. Serebral İskemi.....   | 13   |
| 2.5. Serebral İskemi ve Penumbra Alanı .....                                      | 13   |
| 2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarı .....  | 15   |
| 2.7. Hücre Ölümü .....  | 18   |
| 2.8. Otofaji.....   | 18   |
| 2.8.1. Beclin-1, LC-I/II ve P62.....  | 23   |
| 2.8.2. Serebral İskemi ve Otofaji.....  | 25   |
| 2.9. Melatonin.....   | 27   |
| 2.9.1. Melatoninin Sentezi ve Salgılanması .....                                  | 28   |
| 2.9.2. Melatoninin Fizyolojik Etkileri .....                                      | 31   |
| 2.9.3. Melatonin, Serebral İskemi ve Otofaji İlişkisi .....                       | 32   |
| 3. MATERYAL VE METOT .....  | 34   |
| 3.1. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi .....                            | 34   |
| 3.2. Deney Hayvanlarının Rasgele Gruplara Yerleştirilmesi ve Körleme Yöntemi .... | 34   |
| 3.3. Deney Grupları ve Deney Tasarımı.....  | 35   |
| 3.4. Melatonin Çözeltilisinin Hazırlanması .....                                  | 36   |
| 3.5. Hayvanların Anesteziye Alınması ve Cerrahi Operasyonlara Hazırlanması .....  | 37   |
| 3.6. Sham Serebral İskemi ve Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması .....        | 38   |

|  |    |
|--|----|
| 3.7. Nörolojik Defisit Skorlama ve Davranış Testleri.....  | 42 |
| 3.7.1.Nörolojik Defisit Skorlama .....   | 42 |
| 3.7.2.Rotarod Testi .....  | 45 |
| 3.7.3.Yapışkan Çıkarma Testi .....   | 46 |
| 3.8. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması .....                                   | 47 |
| 3.9. Analizlerin Yapılması.....  | 48 |
| 3.9.1.Beyin Dokularında TTC Boyama İle İnfarkt Alanının Gösterilmesi .....                               | 48 |
| 3.9.2.Western Blot Yöntemi İle Beclin-1, LC3-I/II ve p62 Proteinlerinin Seviyelerinin Belirlenmesi ..... | 49 |
| 3.9.2.1. Protein İzolasyonu .....  | 49 |
| 3.9.2.2. Protein Miktar Tayini .....   | 50 |
| 3.9.2.3. SDS Jelin Hazırlanması .....  | 50 |
| 3.9.3.İmmünofloresan Yöntemi İle Beclin-1, LC3 ve p62 Proteinlerinin Seviyelerinin Belirlenmesi .....    | 57 |
| 3.9.4.Transmisyon Elektron Mikroskop Yöntemi İle Beyin Dokularının İncelenmesi.....                      | 58 |
| 3.10. İstatistiksel Analizler.....   | 60 |
| 4. BULGULAR.....   | 62 |
| 4.1. Melatoninin Nörolojik Defisit Skoru, Rotarod ve Yapışkan Çıkarma Test Süreleri Üzerine Etkisi ..... | 62 |
| 4.1.1.Melatoninin Nörolojik Defisit Skoru Üzerine Etkisi .....   | 62 |
| 4.1.2.Melatoninin Rotarod Test Süresi Üzerine Etkisi.....  | 63 |
| 4.1.3.Melatoninin Yapışkan Çıkarma Test Süresi Üzerine Etkisi.....                                       | 65 |
| 4.2. Melatoninin İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi.....   | 67 |
| 4.3. Melatoninin Beclin-1, LC3-I/II, p62 ve Cleaved Caspase-3 Protein seviyeleri Üzerine Etkisi .....    | 70 |
| 4.3.1.Melatoninin Beclin-1 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi.....  | 70 |
| 4.3.2.Melatoninin LC3-II Protein Seviyesi Üzerine Etkisi .....   | 72 |
| 4.3.3.Melatoninin p62 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi .....  | 74 |
| 4.3.4.Melatoninin Cleaved Caspase-3 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi.....                                 | 76 |
| 4.4. Melatoninin Beclin-1, LC3-I/II, p62 ve Cleaved Caspase-3 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi .....  | 78 |
| 4.4.1.Melatoninin Beclin-1 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi .....                                     | 78 |
| 4.4.2.Melatoninin LC3 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi .....  | 80 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.4.3. Melatoninin p62 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi .....  | 83  |
| 4.4.4. Melatoninin Cleaved Caspase-3 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi.....   | 86  |
| 4.5. Melatoninin Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları Üzerine Etkisi .....  | 89  |
| 5. TARTIŞMA .....   | 99  |
| 5.1. Melatoninin Nörolojik Defisit Skoru, Rotarod Test Süresi, Yapışkan Çıkarma<br>Test Süresi ve İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi..... | 99  |
| 5.2. Melatoninin Otofaji Üzerine Etkisi .....   | 103 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....  | 107 |
| KAYNAKLAR .....   | 109 |
| EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ .....   | 125 |
| EK 2. ÖZGEÇMİŞ.....   | 126 |



## TEŐEKKÜR

TDK-2019-1970 nolu doktora tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teőekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim sürecinde tez çalışmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL'a sonsuz teőekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen bölümümün tüm öğretim üyelerine teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yapımı sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜL'e ve öğretim elemanı Arş. Gör. Semir GÜL'e, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR'a ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cemil ÇOLAK'a teőekkürlerimi sunarım.

Asistanlık sürecini beraber geçirdiğim, tez çalışmamın deneyleri sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen, değerli mesai arkadaşım İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş. Gör. Dr. Kevser TANBEK'e teőekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve en büyük destekçim olan başta eşim Nesibe YILMAZ ve biricik oğlum Tuğrul Mete YILMAZ olmak üzere hayatımın her alanında benden desteğini esirgemeyen kıymetli aileme en kalbi dileklerle sevgi ve saygılarımı sunar, teőekkür ederim.

**Ümit YILMAZ**

## ÖZET

### Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Otofaji Üzerine Melatoninin Etkilerinin Araştırılması

**Amaç:** Bu tez çalışması ile Sİ/reperfüzyon modelinde melatonin uygulamasının otofaji, nörolojik defisit skoru, rotarod ve yapışkan çıkarma test süreleri üzerine olan etkisi açıklanması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada 105 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı ve sıçanlar Sham Sİ, Sİ3, Sİ3+EtOH, Sİ3+Mel, Sİ7, Sİ7+EtOH ve Sİ7+Mel olmak üzere 7 gruba ayrıldı (n=15). Sham Sİ grubundaki sıçanlarda Sİ oluşturulmadı. Sham Sİ grubu hariç tüm gruplara 90 dk'lık Sİ oluşturuldu. Sİ3 grubundaki sıçanlara 3 gün Sİ7 grubundaki sıçanlara 7 gün reperfüzyon sağlandı ancak bu gruplara melatonin ve etanol (çözücü) uygulanmadı. Sİ3+Mel grubundaki sıçanlara 3 günlük, Sİ7+Mel grubundaki sıçanlara 7 günlük reperfüzyon süresince intraperitoneal olarak melatonin (10 mg/kg) uygulandı. Sİ3+EtOH ve Sİ7+EtOH grubundakilere ise aynı hacimde etanol uygulandı. Tüm gruplara reperfüzyon süresince nörolojik defisit skorlama, rotarod ve yapışkan çıkarma testi uygulandı. Reperfüzyon sürelerinin sonunda gruplar dekapite edilerek beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokularından Beclin-1, LC3, p62 ve caspase-3 protein seviyeleri Western Blot ve immunofloresan yöntemi ile belirlendi. Ayrıca beyin dokusu transmisyon elektron mikrobi (TEM) ile incelendi.

**Bulgular:** Sİ7+Mel grubunun reperfüzyonun 5. gününden itibaren Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre rotarod test süresinin yüksek olduğu, yapışkan çıkarma test süresinin ise düşük olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). Gruplar infarkt alanı bakımından karşılaştırıldığında melatonin uygulamasının infarkt alanını azalttığı belirlendi ( $p<0.05$ ). Sİ3+Mel grubunun Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre Beclin-1 ve LC3 protein seviyesi ve pozitif hücre sayısının arttığı, p62 ve cleaved caspase-3 protein seviyesi ve pozitif hücre sayısının ise azaldığı bulundu ( $p<0.05$ ). Sİ7+Mel grubunun da Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre, Beclin-1 ve LC3 protein seviyesi ve pozitif hücre sayısının arttığı, p62 ve cleaved caspase-3 protein seviyesi ve pozitif hücre sayısının ise azaldığı bulundu ( $p<0.05$ ). TEM bulgularına göre melatonin gruplarının nöronlarındaki hasarın kısmen düzeldiği belirlenmiştir.

**Sonuç:** Sonuçlarımıza göre melatonin uygulaması rotarod ve yapışkan çıkarma testleri üzerine olan etkisini 5. günden itibaren göstermeye başlamaktadır. Ayrıca sonuçlarımız melatonin uygulamasının Sİ'de apoptozu inhibe edip, otofajik proteinlerin sentezini uyararak koruyucu rol oynadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Serebral iskemi, otofaji, melatonin, nörolojik defisit skorlama, rotarod testi, yapışkan çıkarma testi

## ABSTRACT

### Investigation of the Effects of Melatonin on Autophagy in Rats with Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury

**Aim:** In this thesis study, it is aimed to explain the effect of melatonin administration on autophagy, neurological deficit score, rotarod and adhesive removal test duration in the CI/reperfusion model.

**Material and Method:** In this study, 105 male Wistar Albino rats were used and the rats were divided into 7 groups as Sham CI, CI3, CI3+EtOH, CI3+Mel, CI7, CI7+EtOH and CI7+Mel (n=15). CI was not induced in the rats in the Sham CI group. A 90-min CI was induced in all groups except the Sham CI group. The rats in the CI3 group were reperused for 3 days and rats in the CI7 group for 7 days, but melatonin and ethanol (solvent) were not administered. Melatonin (10 mg/kg) was administered intraperitoneally to the rats in the CI3+Mel group for 3 days and to the rats in the CI7+Mel group for 7 days. The same volume of ethanol was applied to the CI3+EtOH and CI7+EtOH groups. Neurological deficit scoring, rotarod and adhesive removal test were performed to all groups during reperfusion. At the end of the reperfusion periods, the groups were decapitated and their brain tissues were taken. The Beclin-1, LC3, p62 and caspase-3 protein levels were determined from the brain tissues by Western Blot and immunofluorescence method. In addition, penumbra areas were examined by TEM.

**Results:** From the 5th day of reperfusion, it was determined that the rotarod test time was higher, and the adhesive removal test time was lower in CI7+Mel group compared to the CI7 and CI7+EtOH groups ( $p<0.05$ ). Groups were compared in terms of infarct area, it was determined that melatonin administration decreased the infarct area ( $p<0.05$ ). CI3+Mel group compared to CI3 and CI3+EtOH groups, Beclin-1 and LC3 protein levels and number of positive cells increased, p62 and cleaved caspase-3 protein levels and number of positive cells was found to decrease ( $p<0.05$ ). CI7+Mel group compared to CI7 and CI7+EtOH groups, Beclin-1 and LC3 protein levels and number of positive cells increased, p62 and cleaved caspase-3 protein levels and number of positive cells was found to decrease ( $p<0.05$ ). According to the TEM findings, it was determined that the damage in the neurons of the melatonin groups was partially recovered.

**Conclusion:** According to our results, melatonin application begins to show its effect on rotarod and adhesive removal tests from the 5th day. In addition, our results show that melatonin administration plays a protective role in CI by inhibiting apoptosis and stimulating the synthesis of autophagic proteins.

**Keywords:** Cerebral ischemia, autophagy, melatonin, neurological deficit score, rotarod test, adhesive removal test



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>µg</b>                         | : Mikrogram                                      |
| <b>µl</b>                         | : Mikrolitre                                     |
| <b>ADP</b>                        | : Adenozin difosfat                              |
| <b>AMP</b>                        | : Adenozin monofosfat                            |
| <b>APS</b>                        | : Amonyum Persülfat                              |
| <b>Atg</b>                        | : Otofaji ile ilişkili gen                       |
| <b>ATP</b>                        | : Adenozin trifosfat                             |
| <b>BCA</b>                        | : Bikinkoninik Asit                              |
| <b>BSA</b>                        | : Bovine Serum Albümin                           |
| <b>cAMP</b>                       | : Siklik adenozin monofosfat                     |
| <b>cDNA</b>                       | : Komplementer deoksiribo nükleik asit           |
| <b>DAPI</b>                       | : Diamidin-2-Fenilindol Dihidroklorid            |
| <b>DNA</b>                        | : Deoksiribo nükleik asit                        |
| <b>FE</b>                         | : Fosfatidil etanolamin                          |
| <b>g</b>                          | : Gram   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit                              |
| <b>HSC70</b>                      | : Heat Shock Cognate 70                          |
| <b>kg</b>                         | : Kilogram                                       |
| <b>LAMP-2</b>                     | : Lysosomal Associated Membrane Protein-2        |
| <b>LC3</b>                        | : Microtubule-associated protein-1 light chain 3 |
| <b>LIR</b>                        | : LC3 ile etkileşen bölge                        |
| <b>MAP-LC3</b>                    | : Microtubule associated protein 1 (MAP1)-LC3    |
| <b>mg</b>                         | : Miligram                                       |
| <b>ml</b>                         | : Mililitre                                      |
| <b>mm</b>                         | : Milimetre                                      |
| <b>NAD<sup>+</sup></b>            | : Nikotinamid adenin dinükleotid                 |
| <b>ng</b>                         | : Nanogram                                       |
| <b>NO</b>                         | : Nitrik oksit                                   |
| <b>NOS</b>                        | : Nitrik oksit sentaz                            |
| <b>NBR1</b>                       | : Neighbor of BRCA1 gene 1 protein               |
| <b>PARP-1</b>                     | : Poli (ADP-riboz) polimeraz-1                   |

**PAS** : Pre-otofagozomal yapı  
**PI3K-III** : Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz  
**SD** : Standart sapma  
**SDS** : Sodyum Dodesil Sülfat  
**UBA** : Ubikitin Bağlanma Domaini



## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b>Şekil No</b>  | <b>Sayfa No</b> |
|--|-----------------|
| Şekil 2.1. Serebrumun beslenmesi.....  | 5               |
| Şekil 2.2. Willis poligonu .....   | 6               |
| Şekil 2.3. İnsan (A) ve Sıçanda (B) Willis Poligonunun karşılaştırılması .....       | 7               |
| Şekil 2.4. Makrootofajinin basamakları .....   | 19              |
| Şekil 2.5. Hücresel enerjinin ve homeostazisin düzenlenmesinde otofajinin rolü ..... | 21              |
| Şekil 2.6. Makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji .....               | 22              |
| Şekil 2.7. Nöronlarda otofaji .....  | 26              |
| Şekil 2.8. Melatoninin kimyasal yapısı .....   | 27              |
| Şekil 2.9. Melatonin sentez basamakları .....  | 29              |
| Şekil 2.10. Melatonin sekresyonunun fizyolojisi .....                                | 30              |
| Şekil 3.1. Deney dizaynı.....  | 36              |
| Şekil 3.2. Hayvaların cerrahi operasyona hazırlanması .....                          | 37              |
| Şekil 3.3. Middle serebral arterin tıkanmasının şematik görüntüsü .....              | 38              |
| Şekil 3.4. Karotid arterlerin ve nervus vagusun izole edilmesi .....                 | 39              |
| Şekil 3.5. Serebral iskemi modelinin oluşturulması .....                             | 40              |
| Şekil 3.6. Serebral iskemi ve reperfüzyon süreci .....                               | 41              |
| Şekil 3.7. Cerrahi operasyona son verilmesi .....                                    | 42              |
| Şekil 3.8. Nörolojik defisit skorlama.....   | 43              |
| Şekil 3.9. Hayvanların Nörolojik Muayeneleri .....                                   | 45              |
| Şekil 3.10. Sıçanlara rotarod testinin yaptırılması.....                             | 46              |
| Şekil 3.11. Sıçanlara yapışkan çıkarma testinin yaptırılması .....                   | 47              |
| Şekil 3.12. Beyin dokusunun çıkarılması .....  | 48              |
| Şekil 3.13. İnfarkt alanının hesaplanması.....                                       | 49              |
| Şekil 3.14. Jelin hazırlanması .....   | 51              |
| Şekil 3.15. Proteinlerin elektroforez işlemi .....                                   | 52              |
| Şekil 3.16. Jelden membrana transfer işlemi.....                                     | 53              |
| Şekil 3.17. Bloklama işlemi.....   | 54              |
| Şekil 3.18. Primer antikor ile inkübasyon .....                                      | 55              |
| Şekil 3.19. Sekonder antikor ile inkübasyon .....                                    | 56              |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 3.20. Membranın görüntülenmesi .....   | 57 |
| Şekil 3.21. Kesitlerde immüno Floresan incelemelerin gerçekleştirildiği alan.....                                    | 58 |
| Şekil 4.1. Melatoninin nörolojik defisit skoru üzerine etkisi .....  | 63 |
| Şekil 4.2. Melatoninin rotarod test süresi üzerine etkisi.....   | 65 |
| Şekil 4.3. Melatoninin yapışkan çıkarma test süresi üzerine etkisi .....   | 67 |
| Şekil 4.4. Melatoninin infarkt alanı üzerine etkisi.....   | 69 |
| Şekil 4.5. Melatoninin Beclin-1/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi .....                                | 71 |
| Şekil 4.6. Melatoninin LC3-II/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi .....                                  | 73 |
| Şekil 4.7. Melatoninin p62/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi .....                                     | 75 |
| Şekil 4.8. Melatoninin cleaved caspase-3/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi .....                       | 77 |
| Şekil 4.9. Grupların ipsilateral korteks alanındaki Beclin-1 proteininin immüno Floresan görüntüleri .....           | 79 |
| Şekil 4.10. Melatoninin Beclin-1 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi.....  | 80 |
| Şekil 4.11. Grupların ipsilateral korteks alanındaki LC3 proteininin immüno Floresan görüntüleri .....               | 82 |
| Şekil 4.12. Melatoninin LC3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi .....  | 83 |
| Şekil 4.13. Grupların ipsilateral korteks alanındaki p62 proteininin immüno Floresan görüntüleri .....               | 85 |
| Şekil 4.14. Melatoninin p62 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi.....   | 86 |
| Şekil 4.15. Grupların ipsilateral korteks alanındaki cleaved caspase-3 proteininin immüno Floresan görüntüleri ..... | 88 |
| Şekil 4.16. Melatoninin cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi.....                                   | 89 |
| Şekil 4.17. Sham Sİ grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü .....  | 90 |
| Şekil 4.18. Sİ3 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü .....  | 91 |
| Şekil 4.19. Sİ3 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü .....  | 91 |
| Şekil 4.20. Sİ3 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü .....  | 92 |
| Şekil 4.21. Sİ3+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.....  | 92 |
| Şekil 4.22. Sİ3+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.....  | 93 |
| Şekil 4.23. Sİ3+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.....   | 94 |
| Şekil 4.24. Sİ3+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.....   | 94 |
| Şekil 4.25. Sİ7 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü .....  | 95 |
| Şekil 4.26. Sİ7 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü .....  | 96 |
| Şekil 4.27. Sİ7+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.....  | 96 |
| Şekil 4.28. Sİ7+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü.....  | 97 |

**Şekil 4.29.** Sİ7+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü..... 98

**Şekil 4.30.** Sİ7+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü..... 98



## TABLolar DİZİNİ

| <b>Tablo No</b>  | <b>Sayfa No</b> |
|--|-----------------|
| <b>Tablo 3.1.</b> % 10'luk running jelin hazırlanması.....   | 51              |
| <b>Tablo 3.2.</b> % 5'lik stacking jelin hazırlanması.....   | 51              |
| <b>Tablo 3.3.</b> Elektron mikroskopik takip basamaklarında kullanılan solüsyonlar .....             | 59              |
| <b>Tablo 3.4.</b> Elektron mikroskop doku takip prosedürü.....                                       | 60              |
| <b>Tablo 3.5.</b> Elektron mikroskop grid boyama (Kontrastlama) prosedürü .....                      | 60              |
| <b>Tablo 4.1.</b> Melatoninin nörolojik defisit skoru üzerine etkisi .....                           | 62              |
| <b>Tablo 4.2.</b> Melatoninin rotarod test süresi üzerine etkisi .....                               | 64              |
| <b>Tablo 4.3.</b> Melatoninin yapışkan çıkarma test süresi üzerine etkisi .....                      | 66              |
| <b>Tablo 4.4.</b> Melatoninin infarkt alanı üzerine etkisi .....                                     | 68              |
| <b>Tablo 4.5.</b> Melatoninin Beclin-1/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi .....         | 70              |
| <b>Tablo 4.6.</b> Melatoninin LC3-II/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi.....            | 72              |
| <b>Tablo 4.7.</b> Melatoninin p62/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi.....               | 74              |
| <b>Tablo 4.8.</b> Melatoninin cleaved caspase-3/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi..... | 76              |
| <b>Tablo 4.9.</b> Melatoninin Beclin-1 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi .....                     | 78              |
| <b>Tablo 4.10.</b> Melatoninin LC3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi .....                         | 81              |
| <b>Tablo 4.11.</b> Melatoninin p62 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi .....                         | 84              |
| <b>Tablo 4.12.</b> Melatoninin cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi .....           | 87              |

# 1. GİRİŞ

İnme, beyin damarlarında oluşan tıkanıklık ya da kanamaların beynin bir bölgesini veya tamamını geçici ya da kalıcı olarak etkilemesidir (1). En yaygın nörolojik hastalık olan inme tüm dünyada ikinci ölüm nedeni ve edinilmiş engelliliğin temel sebebidir (2). Denge, hareket, konuşma, yutma, idrara çıkma ve defekasyonu da içeren geniş bir nörolojik bozukluk yelpazesi oluşturan inme, sağlık sistemi için de ağır bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Tüm inme vakalarının % 85'lik kısmını iskemik inme (serebral iske mi) ve % 15'lik kısmını da hemorajik inme oluşturmaktadır (3). Serebral iske mi, beyni besleyen bir damarın veya damarların tıkanması sonucunda, beynin bir bölümünde veya tamamında, kan akımının aniden kesildiği anda oluşan oksijen ve glikoz yoksunluğu ile sonuçlanan metabolik stresin aşırı bir formu olarak tanımlanmaktadır (4). Reperfüzyon ise iske miyi önlemek ve iske miye uğrayan dokulara veya organlara yeniden kan akımını sağlamak amacı ile iske mi sonrasında doku ya da organların geliştirdiği mekanizmalar sonucu iskemik bölgenin yeniden oksijenlenmesi olayıdır. İske miye uğramış dokuların/organların reperfüzyonu, paradoksal olarak yalnızca iske mi sonucunda oluşan hasardan çok daha fazla bir hasara yol açmaktadır (5). Serebral iskemide beyin kan akımındaki azalmanın en fazla olduğu ve hücrelerin dakikalar içerisinde nekroz ile geri dönüşümsüz olarak zedelendiği bölge kor (çekirdek) olarak adlandırılır. Kor alanının çevresi ise penumbra alanı olarak adlandırılır ve bu bölgedeki hücrelerde kollateral kan akımı ile sağlanan ATP varlığından dolayı morfolojik ve biyokimyasal bütünlük korunur (6, 7). Penumbra alanındaki ölüm travmadan saatler/günler sonra yavaş yavaş yayılır. Bu nedenle penumbra alanındaki hasarlı hücreleri kurtarmak için çok kısa ancak değerli bir zaman dilimi vardır ve uygun bir tedaviyle bazı hasarlı hücreler otofaji ile hayatta kalabilirler.

Araştırmacılar ve klinisyenler serebral iske mi çalışmalarında özellikle iskemik penumbra üzerine odaklanmaktadır çünkü otofajik hücrelerin enerji metabolizması bu alanda korunmaktadır ve iskemik hasardan iyileşme olasılığı vardır. Bu durum iskemik penumbradaki otofajik hücreleri inme tedavisi için çok önemli hedef haline getirmektedir (8, 9). Otofaji, hücre içerisinde birikmiş proteinlerin, karbohidratların, lipidlerin, ribozomal RNA'ların, hasarlanmış organellerin ve çevresindeki sitoplazmanın otofagozom olarak adlandırılan kesecikler ile çevrilmesi ve bu keseciklerin lizozom ile

birleşip (otofagolizozom) lizozom enzimleri ile sindirildiği mekanizmadır. Otofaji, bu sayede esansiyel besinleri ve sitoplazmik bileşenleri hücreye geri kazandırarak ve ATP kaynaklarını koruyarak hücre sağkalımını destekleyen koruyucu bir rol oynar (10, 11). Otofajide en önemli/kritik adım otofagozom olarak adlandırılan keseciğin oluşumu ve bu keseciğe hedef organel ve proteinlerin seçici bir şekilde alınmasıdır. Bu süreçte Beclin-1, Microtubule-associated protein-1 light chain 3 (LC3) ve p62 proteinleri anahtar rol oynar. Beclin-1 otofagozomal membranın oluşumunda, LC3 proteini otofagozom zarının uzaması ve kapanmasında, p62 ise hücre içindeki hasarlı organelleri sağlam olanlardan ayrılıp, sindirime uğrayacak hedeflerin (organellerin ya da proteinlerin) otofagozom tarafından tanınmasını ve seçici bir şekilde çevrelenmesini sağlayan proteindir. Bu nedenle bu üç protein otofaji aktivasyonunun belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (10, 12-15).

Serebral iskemiden sonra nöronların kaderi, hücre sağkalımı ile ölüm sinyalleri arasındaki denge ile belirlenir (16). Bazal seviyedeki otofaji hücrel homeostazisin devamı ve olumsuz şartlara uyum sağlama için gerekli bir süreçtir (17). Ancak otofajinin inhibisyonu beyinde iskemik hasarı indüklerken, aşırı artmış otofaji de hücre ölümünü artırabilmekte ve böylece nöronal ölüme neden olabilmektedir (10). Yani uygun otofajik aktivite nöroprotektif iken, aşırı otofaji sıklıkla hücreyi ölüme götürmektedir (8). Bu hassas denge nedeniyle serebral iskemide otofajinin rolü hala tam olarak aydınlatılmamış ve anlaşılammıştır (10).

Günümüzde inme için belirlenmiş tek klinik tedavi yöntemi rekombinant doku tipi plazminojen aktivatör tedavisidir. Fakat müdahale süresinin kısıtlı olması ve yüksek hemoraji riski sebebiyle hastaların yalnızca % 3 ila % 5'i gibi çok az bir kısmı bu tedaviyi alma şansı bulmaktadır. Bu nedenle de hem deneysel hem de klinik birçok araştırma ile serebral iskemi için yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (18, 19). Son zamanlarda serebral iskemi çalışmalarında melatoninin koruyucu olarak rol oynayabileceği ileri sürülmüş ve melatoninin serebral iskemide hangi moleküler mekanizmaları indüklediğine dair çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (2). Pineal bezden üretilen bir hormon olan melatonin, beyinde iskemik hasar sonucu oluşan DNA hasarını ve infarkt hacmini azaltan, fizyolojik aktiviteye sahip güçlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü nöroprotektif bir ajan olarak tanımlanmaktadır (20). Melatoninin, travmatik beyin hasarında (21, 22), nörotoksisitede (23), travmatik optik nöropatide (24) ve subaraknoid hemorajide (25, 26) otofajiyi indükleyerek koruyucu rol oynadığı belirtilmiştir. Ancak son yıllarda serebral iskemide otofaji ile melatonin ilişkisi yeni yeni



irdelenmeye başlanmış olup, literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar arasında da fikir birliği söz konusu değildir.

Mevcut tez çalışması ile cevaplanmaya çalışılan ana soru, serebral iskemi sonrasında gruplara 3 ve 7 gün boyunca ekzojen melatonin verildiğinde, otofajinin penumbra alanındaki serebral iskemi/reperfüzyon hasarını artırıcı ya da azaltıcı etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır. Ayrıca bu tez çalışması ile aşağıdaki soruların da cevabı bulunmaya çalışılmıştır:

- 1- Otofajinin artışı/azalışı penumbra alanındaki nöronların sağkalımını nasıl etkiler?
- 2- Serebral iskemi sonrasında 3 ve 7 gün ekzojen melatonin verildiğinde artan veya azalan otofajinin motor koordinasyon, sensorimotor defisit ve motor fonksiyon üzerine etkisi nasıl olacaktır?

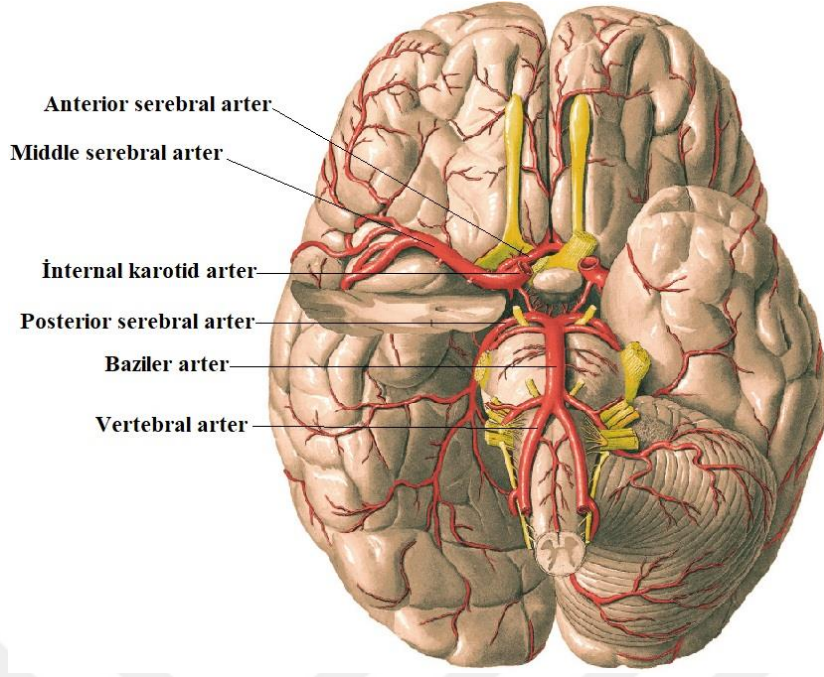
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Beynin Kanlanması

Beyin vücut ağırlığının yaklaşık % 2-3'ünü oluşturmasına rağmen vücutta metabolik olarak en aktif organlardan birisidir (27). Nöron ve glia hücreleri, membran potansiyellerinin devamlılığını sağlamak, aksoplazma oluşturmak, nörotransmitter sentezlemek, nörotransmitter depolamak ve hasar gören yapılarını sürekli olarak yenilemek zorundadırlar. Bundan dolayı beyin, vücudumuzdaki diğer organlara nazaran daha fazla oksijen ve enerji gereksinimi duymaktadır (28). Bu yüksek metabolik aktiviteyi sağlayabilmek için zengin bir kan akımına gereksinim duyan beynin beslenmesi çok önemlidir. Kalp debisinin yaklaşık % 15'ini alan beyin, tüm vücuda dağıtılan oksijenin de yaklaşık % 20'sini kullanmaktadır (27).

Beyne gelen kan akımı miktarı, 100 gr beyin dokusu için ifade edilmektedir. Yüz gr beyin dokusu için beyin kan akımı miktarı dakikada yaklaşık 50 ml'dir. Gri cevherde serebral kan akımı ortalama 70-80 ml/100 gr/dakika iken, beyaz cevherde 20 ml/100 gr/dakikadır (29). Ayrıca 100 gram beyin dokusu dakikada 3.5 ml oksijen ve 5.6 mg glikoz tüketir (30, 31). Beyne gelen kan akımının basıncı sabit bir aralıkta tutulmaya çalışılır ve bu mekanizmaya da serebral otonöregülasyon denir. Serebral kan akımının otonöregülasyonu ise arteriyel basınç ortalama 70-160 mm Hg arasında olduğunda işlevseldir (29).

Beyin arteriyel kan akımı, köklerini arkus aortadan alan dört ana damardan sağlanır. Bu arterler, beynin ön bölgesinde sağ internal karotis ve sol internal karotis olarak karotis sistemini, arka bölgesinde ise sağ vertebral arter ve sol vertebral arter olarak vertebrobaziller sistemini oluştururlar. Serebrumun kanlanması anterior serebral arter, middle serebral arter ve posterior serebral arter olmak üzere üç damardan sağlanmaktadır (Şekil 2.1). Serebellar kan akımı ise posterior inferior serebellar arter, superior serebellar arter ve anterior inferior serebellar arterler tarafından sağlanmaktadır (32, 33).

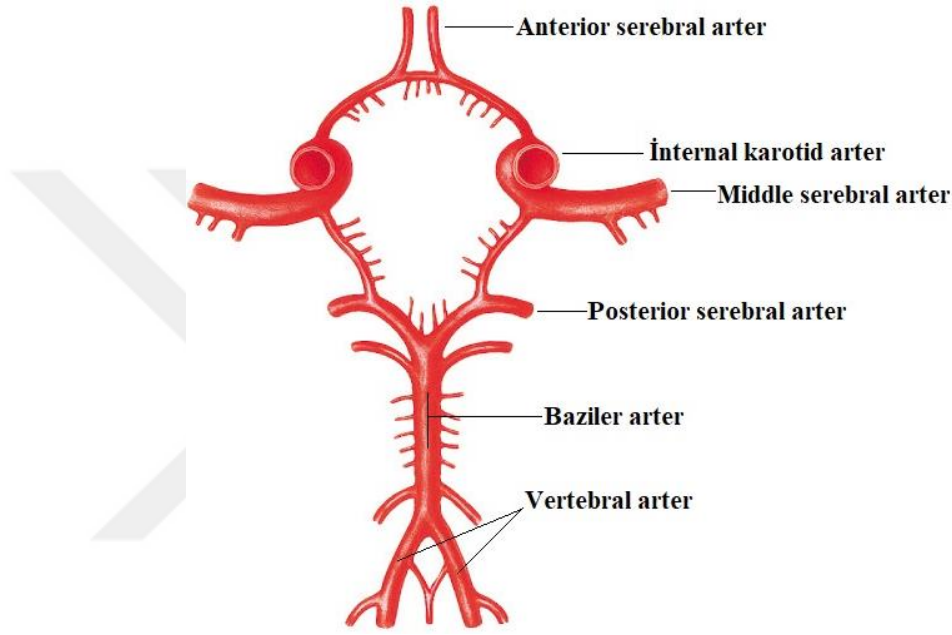


**Şekil 2.1.** Serebrumun beslenmesi (34)

## 2.2. Willis Poligonu

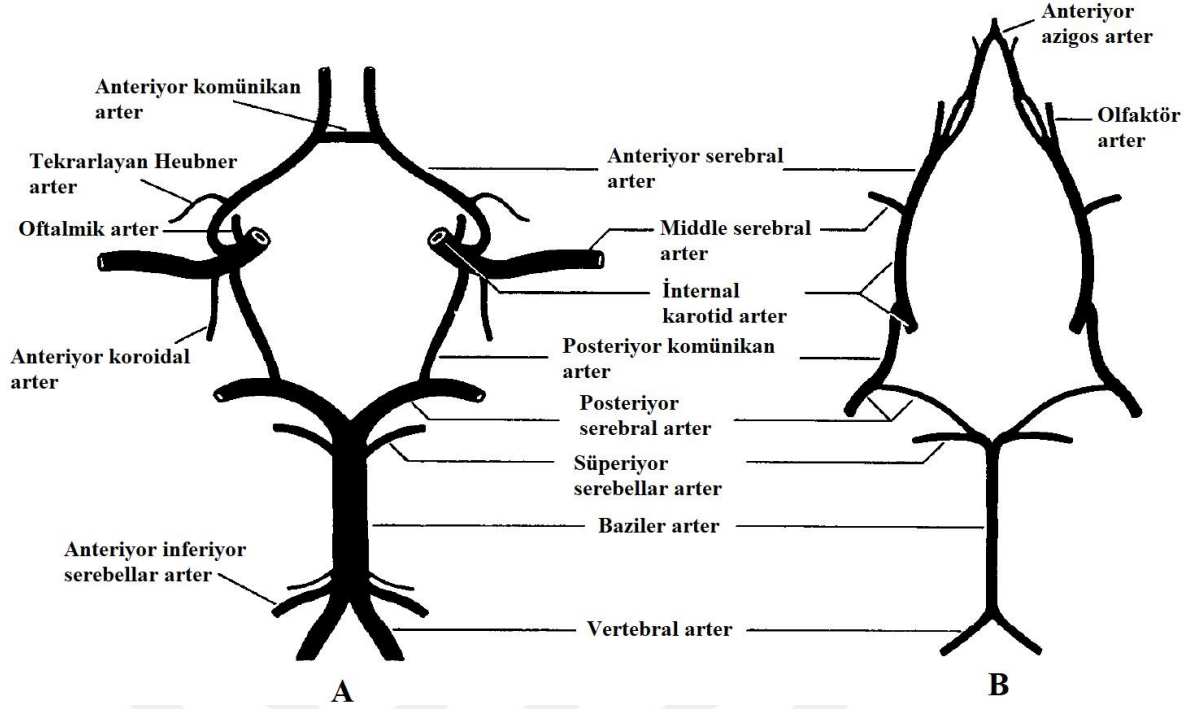
Circulus arteriosus cerebri (Willis poligonu), 1664 yılında Thomas Willis tarafından tanımlanmıştır ve kendi ismi ile de anılmaktadır. Willis poligonu bir arter çokgeni olup, beynin tabanında cisterna interpeduncularis'de, infundibulum ile optik kiazma etrafında internal karotid arter ve baziler arterin dalları ile bu dallar arasındaki anastomozların oluşturduğu bir damar halkasıdır (Şekil 2.2). İnternal karotid arterden dallanan anterior serebral arter, frontal lobun ve pariyetal lobun medial kısmını, bazal gangliyonların anterior kısmını ve anterior internal kapsülü beslemektedir. Karotis sistemde yer alan middle serebral arter, kortikal olarak frontal lobun ve pariyetal lobun lateralini, temporal lobun anteriorunu ve lateralini, globus pallidus, putamen ve internal kapsülün beslenmesini sağlar. Bu arterlerden ayrılan perforan dallar ise diensefalon, internal kapsül ve bazal gangliyonlar gibi beynin derin kısımlarında yer alan oluşumların arteriyel dolaşımını sağlarlar. Baziler arterden dallanan posterior serebral arter, temporal lobun posteriorunu ve medialini, oksipital lobu ve talamusun beslenmesini sağlar. Vertebrobaziler sistemden ayrılan diğer dallar da, spinal kord, beyin sapı, serebellum, talamus, internal kapsül ve bazal gangliyonların beslenmesini sağlarlar. Willis poligonunun fonksiyonu beyni iskemiden korumaktır. Willis poligonu iki taraftan gelen

kanın beynin çeşitli parçalarına eşit olarak dağıtılmasını sağlar. Beyne gelen arterlerin bir tanesi tıkanıp zaman bu halka sayesinde beynin her tarafı beslenebilir. İnternal karotid arter tıkanırsa vertebral arter yolu ile vertebral arter tıkanırsa internal karotid arter yolu ile Willis poligonu dolmasını sağlar. Böylece beyin kansız kalmaz. Bazen posterior kommunikan arter çok ince olabilir, bu durumda büyük dallardan biri tıkanıpında o taraf yeterli kan alamaz. İnternal karotid arteri tek taraflı bağlamak gerektiğinde bu durum gözönünde bulundurulmalıdır (35, 36).



**Şekil 2.2.** Willis poligonu (34)

İnsanlarda Willis poligonu esas olarak anterior serebral arterler, posterior kommunikan arterler ve posterior serebral arterlerden oluşurken, sıçanlarda ise insandan farklı olarak internal karotid arterler de Willis poligonunun yapısına katılmaktadır (Şekil 2.3.) (37). Anterior kommunikan arterler insanlarda bulunurken sıçanlarda bulunmamaktadır ancak olfaktor arterler de sıçanlarda belirgin iken insanlarda bulunmamaktadır. Ayrıca insanlarda olduğu gibi sıçanlarda da middle serebral arterler talamus ve bazal gangliyonları beslemektedir (38).



**Şekil 2.3.** İnsan (A) ve Sıçanda (B) Willis Poligonunun karşılaştırılması (37)

### 2.3. İnme

İnme, Dünya Sağlık Örgütü tarafından "vasküler kaynaklı sorunlar dışında belirgin bir sebep olmadan, semptomlarının 24 saat veya daha uzun sürdüğü veya mortalite ile sonuçlandığı, beyin fonksiyonlarının fokal (veya global) rahatsızlıklarının klinik bulgularının hızla gelişmesi" olarak tanımlanmaktadır (39). İnme, serebral dolaşımında hemoraji veya iskemi sonucu ortaya çıkan motor kontrol ve duyu kaybı, denge bozukluğu, konuşma ve bilişsel fonksiyon kayıpları gibi klinik tablolarla karakterize bir hastalıktır (40).

Bilişsel ve motor fonksiyon bozukluklarına, nörodejeneratif hastalıklara ve hatta ani ölümlere neden olabilen inme, dünya genelinde mortalite ve morbiditenin önde gelen bir nedenidir (41). Dünya çapında her yıl 17 milyon insan inme geçirmekte (42) ve bu insanların 5 milyonu engelli kalmaktadır (43). Ayrıca inme, yetişkin bireylerde görülen en sık ölüm nedenleri sıralamasında ikinci sıradadır ve dünya genelinde her yıl 5 milyondan fazla ölümden sorumludur (39).

Beyin fizyolojisi ve kan akımı, inmede önemli rol oynayan iki süreçtir. İskemik inmeler trombüs oluşumu, emboli veya ateroskleroz gibi nedenlerle serebral arterlerin

tıkalı olmasından kaynaklanır. Hemorajik inmeler ise intraserebral kanama (uzun süreli artmış kan basıncı, hipertansiyon) ve subaraknoid kanama nedeniyle oluşmaktadır (42). Tüm inme vakalarının % 85'lik kısmını iskemik inme (serebral iskemik) ve % 15'lik kısmını da hemorajik inme oluşturmaktadır (3).

### **2.3.1. İnmenin Epidemiyolojisi**

Dünya genelinde, 80 milyondan fazla insan felç geçirmiştir ve yaşamı boyunca her altı kişiden biri de inme geçirmektedir. Her yıl 5.8 milyon kişi inmeden hayatını kaybetmektedir (44) ve bu vakalarında yarısı düşük gelirli ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmektedir (45). Genel olarak, inme insidansı ve mortalite eğilimleri Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere ve Kanada gibi yüksek gelirli ülkeler için son on yılda azalmıştır (46). Ülkemizde ise Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2018 yılında yayınladığı ölüm nedenleri istatistik raporuna göre 1. sırada dolaşım sistemi hastalıkları, 2. sırada kanser ve 3. sırada solunum sistemi hastalıkları yer almaktadır (47). İnmenin de dolaşım sistemi hastalıkları içerisinde iskemik kalp hastalığından sonra 2. sırada yer alan serebrovasküler hastalıklar 2018 yılında ülkemizde 36 280 kişinin ölümüne neden olmuştur (47) ve % 5.9 özürlülük oranıyla da tüm özürlülük bırakan durumlar içerisinde 3. sırada yer almaktadır (48).

### **2.3.2. İnmenin Risk Faktörleri**

Tedavi edildiğinde inme sıklığının azalacağı ön görülen risk faktörleri “kesinleşmiş risk faktörleri” olarak ele alınırken, diğer risk faktörleri ile arasında daha az nedensellik bulunan risk faktörleri ise “kesinleşmemiş risk faktörleri” olarak incelenmektedir. Risk faktörlerini diğer bir inceleme şekli ise risk faktörünün kalıtsal olmasına göre bir kısmının da çevresel ve bireyin yaşam tarzı ile ilişkili olmasına göre yapılmaktadır. İnme için risk faktörleri bu özellikleri bakımından ele alındığında “değiştirilemeyen risk faktörleri” ve “değiştirilebilir risk faktörleri” olarak sınıflandırılmaktadır (49).

İnme için değiştirilemeyen risk faktörleri (risk belirteçleri olarak da bilinir) yaş, cinsiyet, ırk-etnik köken ve genetikdir. İnme için değiştirilebilir risk faktörleri ise hipertansiyon atriyal fibrilasyon, koroner arter hastalığı, diyabet, dislipidemi, obezite, sedanter yaşam, alkol tüketimi ve sigara içmek gibi durumlardır (50).

### 2.3.2.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Değiştirilemeyen risk faktörleri bulunan bireyler en yüksek inme riskine sahip kişilerdir (49) ve bu faktörler:

**Yaş:** İnme her yaş grubundaki bireyleri etkileyebilen ancak insidansı ve prevalansı yaşla birlikte keskin bir şekilde artan bir hastalıktır. Gerçekten de, yaş iskemik inme dahil tüm inme tipleri için değiştirilemeyen en önemli risk faktörüdür. Elli beş yaşından sonra her 10 yılda bir hem erkeklerde hem de kadınlarda inme riski iki katına çıkmaktadır. Raporlar, inmelerin % 75-89'unun 65 yaşın üzerindeki bireylerde meydana geldiğini göstermektedir. Bu inme vakalarının % 50'si 70 yaş ve üzerindeki yaş grubunda görülürken, yaklaşık % 25'i ise 85 yaş ve 85 yaş üstü bireylerde görölmektedir (51).

2025 yılına gelindiğinde, 60 yaşın üzerindeki küresel nüfusun 1,2 milyara yükseleceği tahmin edilmektedir ki bu sayı 1995'te 60 yaşın üzerindeki insan sayısının neredeyse tam iki katıdır. Ayrıca resmi kayıtların başlamasından bu yana ilk kez, 2050 yılına kadar küresel anlamda yaşlı birey sayısı ( $\geq 65$  yaş), gençlerin ( $< 65$  yaş) sayısını aşacaktır. Yaşlı popülasyondaki bu büyüme, yaşlanmanın inme üzerine etkisi ile birlikte, bu hastalığın insidansının ve ekonomik maliyetinin artacağını düşündürmektedir (51). Bir rapor, dünya genelinde inme vakalarının 2030 yılına kadar 23 milyona çıkacağını ve inme sonucu ölüm oranının yılda 7.8 milyona ulaşacağını belirtmektedir (52).

**Cinsiyet:** Dünyanın çeşitli yerlerinde yapılan çalışmalarda, inme insidansı, prevalansı, mortalitesi ve sonuçları bakımından karşılaştırıldığında cinsiyetler arasında anlamlı fark olduğu gösterilmiştir (53). Cinsiyetin inme riski ile ilişkisi yaşa bağlıdır. Genç yaşlarda kadınlar erkeklere göre daha yüksek inme riskine sahipken, daha ileri yaşlarda erkekler için göreceli risk biraz daha yüksektir (50). Bir çalışmada 45-54 yaş aralığındaki kadınlarda benzer yaş dilimindeki erkeklere göre daha yüksek inme prevalansı olduğu (53), başka bir çalışmada ise 80 yaşın altındaki hastalarda iskemik inme riskinin erkeklerde kadınlardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte inmeli çok yaşlı hastaların (80 yaş üstü) kadın olduğu belirtilmiştir ve bu bulgu muhtemelen cinsiyetler arasındaki hayatta kalma farkı veya risk altındaki kadınların hayatlarında erkeklerden daha geç felç geçirme eğilimi ile açıklanmaktadır (51).

İnme vakalarının üçte birinin 65 yaşın altında olduğu ancak kadınlarda artan yaşla birlikte inme insidansındaki keskin artış hızla yaşlanan nüfus ve kadınların erkeklere kıyasla daha uzun ömürlü olmasıyla açıklanmaktadır. Kadınlarda menopoza öncesi inme, özellikle eklampsili ve çoğul gebeliklerde, hamilelik ve doğum sonrası dönemde çok tahrip edici bir durumdur. Oral kontraseptifler ve inme arasındaki ilişkiyi incelemeye yönelik yapılan çok sayıda çalışmada, düşük östrojen içeriğine sahip oral kontraseptiflerin iskemik inme riskini iki katına çıkardığı, yüksek östrojen içeriği olan oral kontraseptiflerin ise inme riskini 4 kat arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca geçici iskemik atakların ve migrenlerin kadınlarda iskemik inme riskini arttırdığı ve her iki risk faktörüne sahip bireylerde iskemik inme riskinin çok daha yüksek olduğu belirtilmiştir (53).

**Etnik Köken/İrk:** Geçici iskemik atak prevalansında ve inme mortalitesinde yaygın ırksal ve etnik çeşitlilik bulunmaktadır. Geçici iskemik atak insidansının kırsal alanlarda kentsel nüfusa göre önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (54).

İnmenin ırksal farklılıklar gösterdiği artık yapılan çok sayıda çalışma ile iyice anlaşılmıştır. Yapılan birçok çalışmaya göre inme insidansı beyaz bireylere göre siyah bireylerde yaklaşık iki kat daha fazladır (50, 55). Sacco ve arkadaşları yaptığı çalışmada inme insidansının beyaz bireylere göre siyah bireylerde 2.4 kat, beyaz bireylere göre Hispantik bireylerde 1.6 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (56).

**Genetik:** Genetik faktörler, aynı zamanda ebeveyn öyküsü ve aile öyküsü olarak da bilinir ve inme riskini artıran değiştirilemeyen risk faktörleridir. İnme için diğer risk faktörlerinde olduğu gibi, inmenin genetik riskleri de yaşa, cinsiyete ve ırka göre değişiklik göstermektedir (50).

Genetik değişkenlik çeşitli potansiyel mekanizmalar aracılığıyla inme riskine katkıda bulunabilmektedir. İlk olarak, spesifik nadir tek gen bozuklukları, inmenin birincil nedeni olduğu bireysel ailesel sendromlara katkıda bulunabilir (örneğin, subkortikal enfarktlar ve lökoensefalopati ile serebral otozomal dominant arteriyopati veya CADASIL). İkincisi, tek gen bozuklukları içerisinde inmenin de olduğu çok sistemli bir hastalığa neden olabilir (örneğin, orak hücre anemisi). Üçüncüsü, genetik polimorfizmlerin bazı yaygın varyantları inme riski ile ilişkilendirilmiştir, ancak bu tür polimorfizmlerin bireysel katkısının çok hafif olduğu kabul edilir (örneğin, 9p21'deki varyantlar). Dördüncü olarak, atriyal fibrilasyon, diyabet ve hipertansiyon gibi geleneksel inme risk faktörlerinin genetik nedenlerinin de inme riskini etkileyebilmesidir (50).



### 2.3.2.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri

İnme için değiştirilebilir risk faktörleri çok önemlidir, çünkü bu faktörleri azaltmaya yönelik müdahale stratejileri daha sonra inme riskini azaltabilmektedir. Risk faktörlerinin erken tanımlanması ve değiştirilmesi kaçınılmazdır. İnme için değiştirilebilir risk faktörleri ayrıca tıbbi koşullara ve davranışsal risk faktörlerine ayrılabilir. Hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi ve sigara içmek gibi inmeye neden olan birçok “geleneksel” risk faktörünün rolü artık iyi bilinmektedir. Yeni veya “ortaya çıkan” risk faktörlerinin araştırılması, aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (50).

**Hipertansiyon:** Hipertansiyon, inme için en önemli değiştirilebilir risk faktörüdür ve kan basıncı ile inme riski arasında güçlü, doğrudan, doğrusal ve sürekli bir ilişki bulunmaktadır (50). Sistolik, diyastolik veya her iki kan basıncı değerleri, yüksek olduklarında inme oluşumuna katkıda bulunabilir. Büyük ölçekli prospektif kohort çalışmalarında, hasta ve doktorlar tarafından genellikle göz ardı edilen görel kan basıncı yükselmelerinin de riski artırabileceği gözlenmiştir: sistolik ve diyastolik kan basıncı değerlerinin 140-160/90-94 olmasının inme riskini yaklaşık 1.5 kat, 160/95’in üstünde olmasının ise inme riskini 3-4 arttırdığı bildirilmiştir (55).

**Koroner arter hastalığı:** Koroner arter hastalığı olan bireylerde, koroner arter hastalığı olmayan bireylere göre inme riski iki kat daha fazladır. Sol ventrikül hipertrofili koroner arter hastalığı olan bireylerde inme riski 3 kat, konjestif kalp yetmezliği olan koroner arter hastalığı olan bireylerde ise inme riski 4 kat daha yüksektir. Miyokard enfarktüsünden 5 yıl sonra inme oranının % 8.1 olduğu ifade edilmiştir. Yaşlı hastalarda veya kardiyak ejeksiyon fraksiyonu % 28’den az olan hastalarda ise inme riskinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (46).

**Diyabet:** İnme için bağımsız bir risk faktörü olan diyabet, inme riskini 2 kat arttırmaktadır ve inme, diyabet hastalarının ölümlerinin yaklaşık % 20’sinden sorumludur. İnme geçiren diyabetik hastalar genellikle genç yaşlarındadırlar ve ne yazık ki, diyabet hastalarında yalnızca glisemik kontrol, davranış değişikliği ve tıbbi müdahale ile yoğun müdahalelerin yapılması da inme riskini azaltmamaktadır (50). Kişinin diyabet olmadan önceki insülin direncinin inme riskini arttırdığı ve diyabetik olmayan bireylerde

açlık insülin seviyelerinin yükselmesinin inme riskinin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (46).

**Yaşam Tarzı:** Obezite, sigara içme, alkol tüketimi, diyet, ilaçların kötüye kullanımı ve hareketsiz yaşam inme için değiştirilebilir yaşam tarzı risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Ayrıca kokain, eroin, amfetaminler, lizerjik asit dietilamid, fensiklidin ve esrar gibi uyuşturucu kullanımının iskemik inme insidansını arttırdığı bilinmektedir. Uyku düzeni ile inme arasındaki ilişki incelendiğinde, genç erkeklerde genellikle kısa uyku süresinin, yaşlı hastalarda ise auralı gündüz uyku migreni ve obstrüktif uyku apnesinin inme için potansiyel risk faktörü olduğu belirtilmiştir. Sağlıksız yaşam tarzı yalnızca yüksek inme riski ile değil, aynı zamanda inme sonrası yüksek mortalite ile de ilişkilidir. Örneğin obezite, sigara içme, aşırı alkol tüketimi, sağlıksız beslenme ve hareketsiz yaşam gibi durumlardan kaçınmanın geçici iskemik atak prevalansını önemli ölçüde azaltabildiği ifade edilmiştir (53).

Alkol tüketiminin artması doza bağlı bir şekilde hemorajik inme riski ile ilişkilidir. Bununla birlikte, alkol tüketiminin iskemik inme riski üzerindeki etkisini değerlendiren çalışmalar tutarlı sonuçlar göstermemiştir. Örneğin bazı çalışmalar hafif-tomoderat içmenin (günde 1-2 içecek) iskemik inme riski üzerinde koruyucu bir etkisine işaret etmektedir. İnme vakalarının yaklaşık % 18'i aktif sigara içenlerde gözlenmektedir. Sigara içmenin inme riskini 1.5 kat arttırdığı, ağır ve hafif sigara içenler arasında da daha yüksek inme riski ile doz-yanıt ilişkisi olduğu belirtilmiştir. Daha önceden sigara içimi ile ilişkili inme riskinin, ilerleyen zamanlarda bırakma nedeniyle önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir ve inme riskinin sigara bırakılmasından 5 yıl sonra sigara içmeyenler düzeyinde olduğu rapor edilmiştir. Sigara içen eşi olan kadınların, sigara içmeyen eşi olan kadınlara göre daha yüksek iskemik inme riski (göreceli risk, 4.8) bulunmaktadır. Ayrıca sigara içmek oral kontraseptiflerin inme riski üzerindeki etkisini arttırmaktadır, örneğin hem sigara içen hem de oral kontraseptif kullanan kişilerde inme riskinin 7 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Gözlemsel veriler fiziksel aktivitenin daha düşük inme riski ile ilişkili olduğunu gösterirken, sedanter yaşamın da daha yüksek inme riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Yüksek derecede aktif olan bireylerin düşük derecede aktif olan bireylere göre % 27 daha düşük inme veya mortalite riski yaşadıkları belirtilmiştir (46).

## 2.4. Serebral İskemi

Serebral iskemi, beyni besleyen bir damarın veya damarların tıkanması sonucunda, beynin bir bölümünde veya tamamında, kan akımının aniden kesildiği anda oluşan oksijen ve glikoz yoksunluğu ile sonuçlanan metabolik stresin aşırı bir formu olarak tanımlanmaktadır (4).

Serebral kan akımının belirli bir alana yetersiz gelmesi durumunda, kan akımının yetersizliğinin derecesine ve süresine bağlı olarak dokuda geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz iskemik olaylar ortaya çıkar (57). Serebral kan akımı, 30 ml/100 gr'a kadar azaldığında serebral otonöregülasyon mekanizmaları devreye girer ve herhangi bir nörolojik iskemik semptom oluşmaz, ancak bu değer 20-30 ml/100 gr'a kadar azaldığında geçici iskemik ataklar, 20 ml/100 gr'ın altına düştüğünde ise iskemik infarktler oluşmaya başlar (58). Serebral kan akımı seviyesi, iskeminin daha orta seviyelerde olduğu durumlarda (10-20 ml/100 gr/dk gibi) iskemi durumunun başlangıcından sonra saatler içerisinde ilgili alan iskemiden geri döndürülebilir ancak serebral kan akımı 10 ml/100 gr/dk'nın altına düştüğünde yani kanlanmanın çok azaldığı durumlarda dakikalar içerisinde ilgili alanda infarkt oluşmaya başlar. Serebral kan akımı seviyesi 10 ml/100 gr/dk değerinin altına düşene kadar hücre depolarizasyonu gözlenmez ve bu durum iskemik değişiklikler için gerçek anlamda iki eşik değere dikkat çekmektedir. Birinci eşik değer elektriksel fonksiyon kaybı ile sonuçlanan serebral kan akımı seviyesinin 15-20 ml/100 gr/dk'ya düşmesi, ikinci eşik değer ise hücre depolarizasyonu ile sonuçlanan 10 ml/100 gr/dk'ya düşmesidir (57).

## 2.5. Serebral İskemi ve Penumbra Alanı

İskemik dokunun kaderini belirleyen en önemli etkenler iskeminin şiddeti ve iskeminin süresidir. Beyin dokusunun iskemiye olan toleransı oldukça azdır ve beyne gelen bütün damarlarda kan akımı durduğu zaman (global serebral iskemide) beynin iskemiye hassas bölgelerinde yaklaşık 6-8 dakika içerisinde kalıcı hasar meydana gelmeye başlar. Bir serebral arter tıkanmış zaman (fokal serebral iskemide) ise arterin kan götürdüğü alanın merkezi bölgesindeki kan dolaşımı kritik seviyenin altına iner ve geri dönüşümsüz zedelenme saatler, hatta bazen günler içerisinde meydana gelir. Bu durumun sebebi tıkanan damarın kan götürdüğü alanda beyin kan dolaşımının kollateral damarlarla nispeten sürdürülebilir olmasıdır. İnsan beyninde eğer bir damar tıkanır, 13

belirli bir alanda kan dolaşımı kritik düzeyin altına iner ve bu alanda doku nekrozu gelişmeye başlar. Nekrotik alan iskemik çekirdek (core) olarak isimlendirilir ve iskemik çekirdekten uzaklaştıkça kollateral damarlar tarafından beslenen ve artış gösteren ve değişik kan akımı alanları bulunur. İskemiye maruz kalan bu bölgelerde hemen infarkt alan oluşmaz fakat bu iskemi durumu düzeltilemezse bu alanların birkaç saat gibi süre zarfında nekroza gitme olasılığı çok yüksektir (28, 59). İskemik çekirdeği çevreleyen bölgelerin kan dolaşımı, nöronların işlevini ve canlılığını devam ettirebilmesi için yeterli olmayabilir (28). Serebral arter tıkanıklığında infarkt dokusunun çevresinde yer alan kan dolaşımının azaldığı fakat geri dönüşümsüz (kalıcı) hasarın daha oluşmadığı, kısa sürede reperfüzyon gerçekleşmesi durumunda kurtarılabilir bu beyin dokusu alanına “penumbra” denilmektedir (40). İskemik çekirdek bölgesinde kan akımı  $<7$  ml/100 gr/dk, penumbra alanındaki kan akımı ise yaklaşık 7-17 ml/100 gr/dk arasında değişmektedir (60).

Astrup ve ark. (61) 1977 yılında elektriksel aktivite ölçümünün, bir primat beyinde fokal iskeminin indüklenmesinden sonra işlevsiz fakat henüz ölmemiş bölgeleri ortaya çıkardığını bildirdiler ve penumbra alanını fokal iskemiden sonra hasar görmüş fakat henüz ölmemiş bir beyin dokusu alanı olarak tanımladılar. Dinamik özellikte olan penumbra alanı, tedavi edilmeyip kendi haline bırakıldığında kısa bir süre sonra infarkt dokusuna katılmaktadır. İskemik çekirdekte enerji kaynaklarının tükenmesi nedeniyle iyon pompaları iflas ederken, penumbra bölgesinde elektriksel aktivite yitirilse bile hücre zararının bütünlüğü/işlevselliği korunmaktadır. Bu durum penumbra alanını deneysel ve klinik tedavi çalışmalarında hedef alınan “kurtarılacak bölge” yapmaktadır ve penumbra alanı güncel tedavi planlamalarının odak noktasını oluşturmaktadır. Bazı çalışmalarda ilerleyici hasarın 24 saate kadar sürdüğü ve reperfüzyon ile geri döndürülebildiği ifade edilmiştir. Bu durum penumbra alanının dinamik bir bölge olduğu ve tedavi edilmezse çok kısa bir zaman zarfında geri dönüşümsüz doku hasarının oluşacağı anlamına gelmektedir (28).

Penumbra alanındaki hücreler, her ne kadar serebral iskemi sonrasında başlayan iyonik düzensizliğe karşı hayatta kalmaya çalışsalar da genellikle apoptoz ile hücre ölüm yolunu tercih etmektedirler (62, 63). Bu alandaki hücreler sınırlı düzeyde olan glikozdan faydalanmaya çalışırlar ve hücre içi sinyal iletim kaskadlarından özellikle hücre sağ kalımıyla ilişkili sinyal iletim kaskadları aracılığıyla hayatta kalmaya çalışırlar (64-66). Serebral iskeminin ilk aşamasında beyin belirli bir bölgesini besleyen kan akımının kesilmesi, beyin o bölgesinde enerjinin tükenmesine ve meydana gelen enerji

yoksunluğunun da bu alandaki sinir ve destek hücrelerinin (glia hücreleri) membran potansiyelini yitirmesine ve bu hücrelerin depolarize durumda kalmasına neden olmaktadır. Bu durum depolarize durumdaki hücrelerden eksitator bir nörotransmitter olan glutamatın sinaptik aralığa ve hücre dışı ortama salıverilmesiyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca bu hücrelerde enerjinin tükenmesi sebebiyle glutamatın hücrelere geri alım mekanizmaları da fonksiyonunu yitirirler ve hücrelerarası ortamda çok fazla miktarda glutamat birikir ve bu durum inme patolojisinde glutamat eksitotoksitesisi olarak adlandırılır (67, 68).

Postsinaptik nöronların glutamatla uyarılmasıyla pozitif yüklü iyonlar hücre içine girmeye başlar ve hücre içine giren  $\text{Na}^+$  iyonları da membran potansiyelini değiştirip postsinaptik nöronun hızlıca depolarizasyonuna neden olur. Bu durum depolarize durumdaki nöronlardan ekstrasellüler ortama yeniden glutamat ve potasyum iyonlarının salıverilmesiyle sonuçlanır (63). Böylece iskeminin olduğu bölgeden periferde doğru yayılan uyarılara ve hasar alanının çevresinde meydana gelen depolarizasyona yol açar. Bu durum çok az miktarda kalan enerji ile hasar görmüş alanın etrafında hayatta kalmak için çabalayan sinir hücrelerinin enerji gereksiniminin daha fazla artmasına ve bu hücrelerin ölümüne yol açar. Son yıllarda inme sonrasında meydana gelen hücre ölümlerinin yaklaşık %20'sinin bu uyarı dalgaları nedeniyle olduğu bildirilmektedir (69, 70). Hücre içerisine  $\text{Na}^+$  iyonunun girmesi, hücre dışından hücre içerisine  $\text{Cl}^-$  iyonlarının girişine neden olur. Hücre içinde artan  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonları,  $\text{NaCl}$  oluşumuna ve hücre dışından hücre içerisine su girişine neden olur. Hücrelerin su almasıyla birlikte hacimleri artar ve buna bağlı olarak sitotoksik beyin ödemi gelişir. Glutamat nörotoksitesisi sonrasında biriken  $\text{Ca}^{+2}$ 'un aktifleştirdiği enzimler hücre zarının degradasyonunda rol oynayan enzimleri uyararak hücre zarının hasarlanmasına neden olur. Bunlara ek olarak, hücre içerisinde yükselen  $\text{Ca}^{+2}$  düzeyi serbest oksijen radikallerinin de artışına neden olur (71). Bunları takiben inflamasyonun uyarılmasıyla beraber lökosit infiltrasyonu ve mikroglia aktivasyonu başlar (72). Ayrıca hücre içerisinde biriken  $\text{Ca}^{+2}$ , nitrik oksit enzimleri ile birlikte mitokondri ve DNA'ya hasar vererek apoptoz ile hücrenin ölümüne sebep olur (68).

## 2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

İskemi kelimesi, Yunancadan köken alan engelleme anlamına gelen “iskho” ve kan anlamına gelen “hàima” kelimelerinin birleşmesi sonucu oluşmuştur (73). İskemi,

doku veya organlara giden kan akımının pıhtı veya mekanik etkenler gibi nedenlerle azalmasına bağlı olarak bu doku veya organların yetersiz perfüzyonu nedeniyle oksijen ve yaşam için gerekli besinleri alamaması/yoksun kalması şeklinde tanımlanmaktadır (73, 74).

Hücrelerin fonksiyonlarını düzgün bir şekilde devam ettirebilmesi için oksijen olmazsa olmazlardan bir tanesidir ve iskemi hipoksinin en sık görülme durumudur. İskeminin yoğunluğu, süresi, hücre ve organ tiplerinin metabolik gereksinimleri iskemi hasarının şiddetini belirleyen faktörlerden bazılarıdır (74). İskemi sırasında meydana gelen hücrenin enerji depolarının boşalması ve yeterince oksijen taşınamaması sebebiyle oluşan hipoksinin, hücresel fonksiyonlarını bozması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücrenin ölümüne neden olmaktadır (75).

İskemiye uğrayan dokuya hücrenin yenilenmesi ve zararlı metabolitlerin uzaklaştırılması için yeniden kan akımı gerekir. Reperfüzyon, iskemiye önlemek ve kan akımını yeniden sağlamak amacı ile iskemiye maruz kalan doku yada organların geliştirdiği mekanizmalar sonucu iskemik alanın yeniden kanlanması ve oksijen miktarının artması olarak tanımlanır (76). Reperfüzyon sonucunda dokuda serbest oksijen radikalleri artar, endotel hücreleri hasarlanır, kompleman sistemi aktifleşir, polimorfonükleer lökositlerin göçü başlar ve meydana gelen bu faktörler aslında dokuda iskemi hasarından daha fazla hasara yol açar. İskemi sonrası doku ve organların reperfüzyonu, doku ve organlarda yalnızca iskemi sonucunda meydana gelen hasara göre daha ağır bir hasara neden olur ve bu hasar iskemi/reperfüzyon hasarı olarak adlandırılır (77, 78).

İskemiden dolayı hipoksiye maruz kalan hücrelerde oksidatif fosforilasyona bağlı olarak ATP üretimi yavaşlar ya da durur. Fakat hücreler tarafından ATP tüketilmeye devam eder ve ATP'de AMP ve adenezine parçalanır. Adenezin hücre dışına diffüze olur ve sonucunda inozin ve hipoksantin oluşur. Hipoksik durumda ksantin dehidrogenaz enzimi aktifleşemez, dolayısıyla hipoksantin ksantin oksidaz ile metabolize olur ve ksantin oluşur. Tüm bu reaksiyonlar sonucunda ortaya serbest oksijen radikalleri çıkar. Sodyum-potasyum pompaları da ATP sentezinin bozulması ile durur ve böylece hücrenin elektrolit dengesi de bozulmuş olur. Hücre içerisine kalsiyum iyonlarının akışı başlar, hücre içi kalsiyum artışı proteolitik enzim ve fosfolipazların aktive olmasını sağlar. Fosfolipazların aktifleşmesi ile araşidonik asit oluşur, araşidonik asit de doğrudan etkisiyle mitokondri enzimlerinin inhibisyonuna ve serbest radikal oluşumunda artışa

sebepler olur. İskeminin erken safhasında, dokuda bu metabolik olaylar sonucu konjesyon kanama ve ödem görülür (79).

Reperfüzyon hasarından asıl sorumlu olan, hücre içerisine moleküler oksijen girmesi sonucunda hızlıca meydana gelen serbest oksijen radikalleridir ancak bununla beraber çok sayıda farklı mekanizma da süreçte rol oynamaktadır (80). Serbest oksijen radikallerinin ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzim düzeylerinin artması, lipid peroksidasyonunun gerçekleşmesi, lökositlerdeki integrinlerin olaya karışması, endoteldeki selektin ekspresyonunun görülmesi, sodyum-potasyum pompasının bozulması, hücre içi kalsiyum iyonunun artışı, protein kinaz C'nin aktivasyonu, fosfatidil inositol 3 kinaz-protein kinaz B ve mitojen aktive edici protein kinaz vb. hücre sinyal yollarının çalışması gibi henüz netliğe kavuşmamış çeşitli mekanizmalar sonucu hücrede nekroz ya da programlı hücre ölümü ile sonuçlanan patolojik durumu ortaya çıkarır (81).

Patolojik süreçlerin sonunda hücre içerisinde artan  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  ve ADP seviyeleri, mitokondride yüksek miktarda reaktif oksijen türlerinin üretilmesine neden olmaktadır. Beyin, daha az endojen antioksidan seviyelerine sahip nöronlar nedeniyle reaktif oksijen türlerine karşı daha savunmasızdır. Serbest oksijen radikallerinin seviyesinin artması, hücresel makromoleküllerin yok olmasına ve apoptoz ile sonuçlanacak hücre içi sinyal yollarının başlamasına neden olabilmektedir (82, 83). İskeminin başlamasıyla birlikte NOS enzimi uyarılır ve NO sentezi artar, NO'de süperoksit ile birleşip daha güçlü bir oksidan olan peroksinitrit üretiminde rol oynar (83). Bunun yanısıra NO üretimi ve oksidatif stres, DNA tamir enzimi olan Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1)'in uyarılmasını sağlar. PARP-1'in çok fazla uyarılması, nikotinamid adenin dinükleotid ( $NAD^+$ ) bağımlı oksijensiz solunum ve oksijenli solunum gibi reaksiyonların zarar görmesine ve bunların sonucunda meydana gelen enerji (ATP) yetersizliği ile nöronal ölüm yolları birlikte hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (84).

İskeminin sonrasındaki reperfüzyon ile birlikte, NO, süperoksit ve peroksinitrit oluşumunda da bir artış meydana gelmektedir. Reperfüzyon hasarında önemli rolleri bulunan bu serbest radikaller, özellikle damar çeperlerinde yoğunlaşırlar ve bazal laminada kollajenleri ve lamininleri sindiren matriks metalloproteaz enzimlerini aktive ederek kan beyin bariyerinin bütünlüğünün bozulmasına ve geçirgenliğinin artmasına neden olurlar (85, 86). Ayrıca oksidatif ve nitratif stres, lökositlerin (özellikle nötrofillerin) serebral vaskülatüre göçünü tetikler ve bazal laminanın bozulmasına sebep olarak damar geçirgenliğini daha da arttıran enzimlerin salıverilmesine neden olurlar.

Tüm bu süreçlerin sonunda da parankimal hemoraji, vazojenik beyin ödemi ve beyindeki nötrofil infiltrasyonuna neden olur (85, 87).

## 2.7. Hücre Ölümü

İskemi/reperfüzyon hasarına karşı en duyarlı olan hücresel yapılar zar lipitleri, proteinler ve nükleik asit molekülleridir (88). İskemi/reperfüzyon sonucunda oluşan serbest radikaller, hücre zarı hasarına, proteinlerin fragmentasyonuna ve modifikasyonuna neden olarak proteinlerin proteolitik degradasyonuna ve lipid peroksidasyonuna sebep olur. Lipid peroksidasyon aldehit ürünleri de proteinlere ve DNA'ya kovalan biçimde bağlanarak onların işlevlerinde değişikliğe ve tüm bunların sonucunda da hücrelerin ölümüne neden olurlar (89).

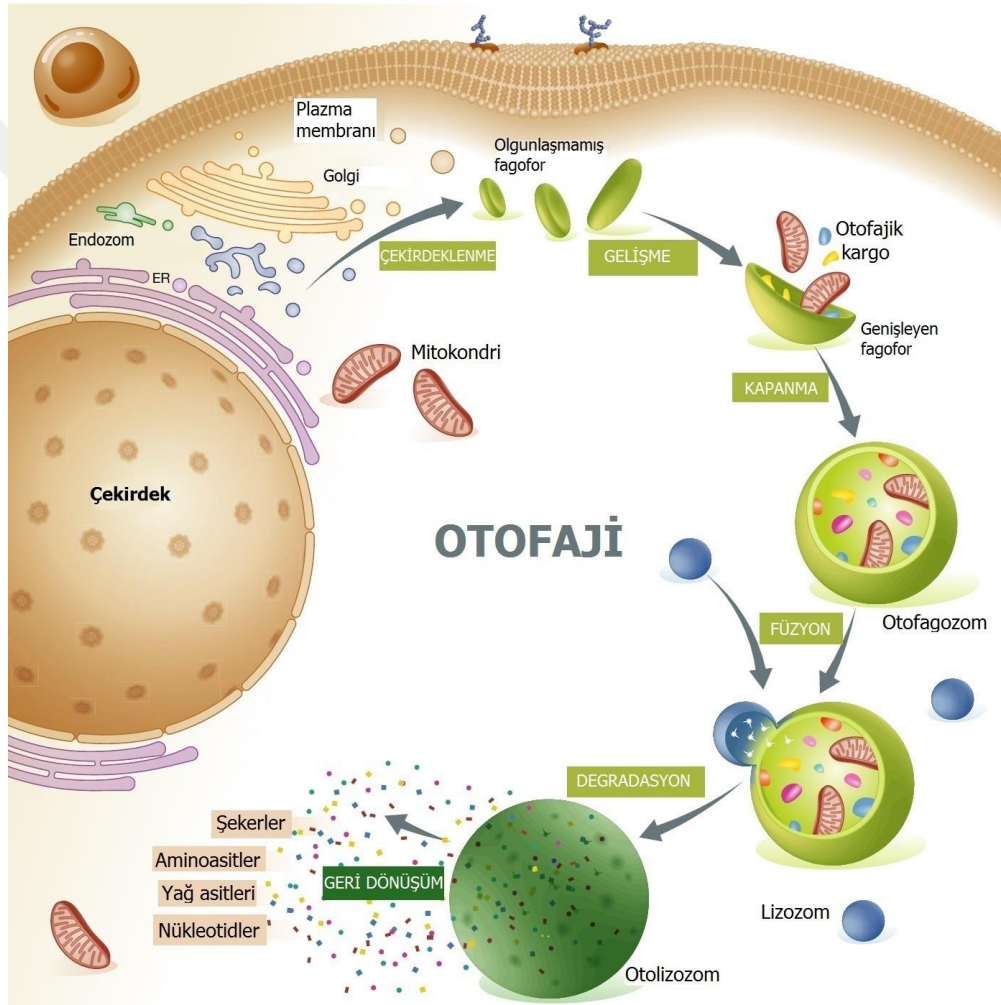
Hücre ölümü, hücrenin temel yaşamsal fonksiyonlarını devam ettiremediği zaman gerçekleşen biyolojik bir süreçtir. Bu biyolojik süreç normal hücrelerin değişimi, hastalık veya lokalize yaralanma gibi durumların sonucunda hücresel sorunlara karşı korunma mekanizması olarak gelişen bir durumdur. Hücre ölümü, apoptotik ve nekrotik olmak üzere morfolojik görünümü, farklı proteazların dahil olduğu veya olmadan gerçekleşen enzimolojik kriterler ve immünolojik veya immünolojik olmayan özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Programlı hücre ölümü ise fizyolojik ve evrimsel açıdan korunan bir süreçtir. Çok hücreli organizmalar başta olmak üzere embriyolojik gelişim, doku oluşumu ve sağlığı gibi birçok olayda önemlidir. Programlı hücre ölümleri yıllarca apoptoz ve nekroz olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalarla ve gelişen teknolojiyle birlikte başka bir programlı hücre ölümü yolu olan otofajik hücre ölümü de eklenmiştir (90, 91).

## 2.8. Otofaji

Yaşamın sorunsuz bir şekilde devam edebilmesi için organizmanın gereksinim duyduğu fizyolojik şartların belirli sınırlar içerisinde sabit tutulması ve hücrelerin çoğalması (bölünmesi) ile hücrelerin ölümü arasındaki dengenin çok iyi korunması ve muhafaza edilmesi gerekmektedir (92). Otofaji eski Yunancada kendi kendini anlamına gelen “*auto*” ve yeme anlamına gelen “*phagy*” kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş bir terimdir. Otofaji besin yetersizliği (açlık), hipoksi, enerji tükenmesi gibi hücresel fizyolojik stres durumlarına hücrenin adapte olabilmesini ve hayatta kalabilmesini sağlayan hücresel bir mekanizmadır. Otofaji hücresel fonksiyonları olumsuz



etkileyebilecek işlevini yitirmiş proteinlerin ve zarar görmüş organellerin çift membranlı vakuol (otofagozom) içine alınması ve otofagozomun dış membranının lizozom ile birleşip (otolizozom) otofagozom içeriğinin lizozomal enzimlerce sindirilmesidir (93) (Şekil 2.4.). Otofaji ile uzun ömürlü ve hasarlı proteinler ve mitokondride oluşan serbest oksijen radikalleri ortadan kaldırılır. Böylece hücresel yapıtaşları ve enerji kaynaklarının geri dönüşümü sayesinde hücresel kararlılığın devamı sağlanmış olur. Otofaji katabolik bir süreç gibi görünmesine rağmen sentez, yıkım ve geri dönüşüm basamakları sayesinde hücresel bütünlüğün devamına ve genomik istikrarın korunmasına katkı sağlar (94).

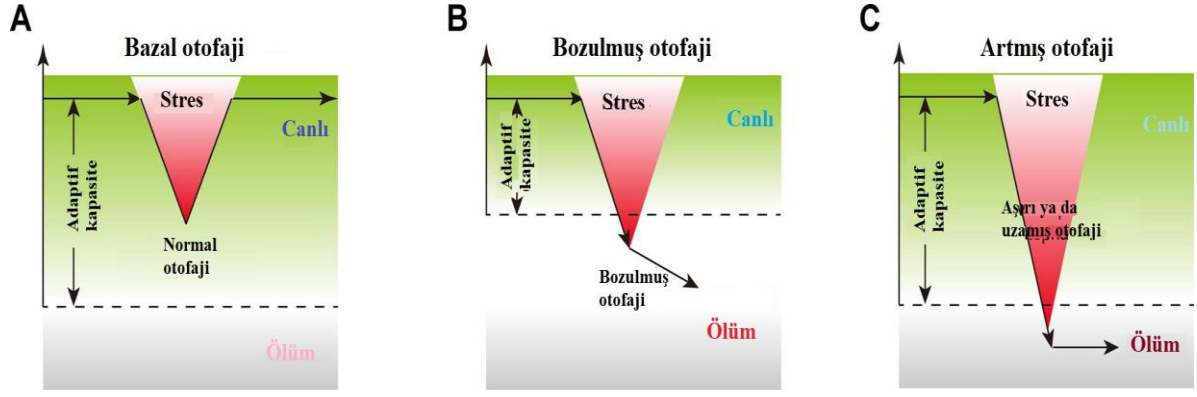


Şekil 2.4. Makrotofajinin basamakları (95)

Otofaji hücrelerin besin veya büyüme faktörü yoksunluğu, hipoksi, reaktif oksijen türleri, DNA hasarı veya hücre içi patojenler gibi çoklu stres koşullarına karşı hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizmadır (96). Hücrelerin hayatta kalabilmesi için gerekli olan hücresel yapıtaşları ve enerjiyi sağlayabilmek için her hücrede bazal seviyede

otofaji bulunmaktadır. Hücresel otofajik aktivite genellikle bazal koşullar altında düşük seviyededir ancak besin yetersizliği, hipoksi veya enerji tükenmesi, hormonal uyarım veya farmasötik ajanlar hücredeki otofaji seviyesini arttırabilir. Otofaji ölmekte olan hücrelerde gözlemlenen yaygın bir morfoloji olması nedeniyle hücre ölüm yolağı olarak düşünülmüştür. Ancak son çalışmalarda otofajinin hücrenin yaşamsal organlarını tüketerek hücreyi ölüme götürdüğü ve stresli koşullarda hücrelere besin ve enerji sağlayarak canlı tuttuğu gösterilmiştir. Hücre içerisindeki bu geri dönüşüm, tüm hücre tipleri için çok önemlidir ancak hasarlı hücresel içerikler hücre bölünmesi sırasında bir miktar seyrelebilmeleri nedeniyle otofaji nöronlar gibi tamamen farklılaşmış ve normalde bölünemeyen hücrelerde daha büyük bir öneme sahiptir. Özellikle diğer hücrelere kıyasla nöronlar hayatta kalmak için yüksek bazal otofajiye bağımlıdır (97, 98).

Normal koşullarda otofaji süreci stres anında aktive edilir ve hücre içi bileşenlerin temizlenmesini ve yeniden kullanımını kontrol ederek hücrelerin hayatta kalmasına yardımcı olur (Şekil 2.5. A). Böylece otofaji temel fizyolojik şartların yeniden kurulmasına ve iyileşme eylemini geliştirerek homeostazise ulaşılmasıyla ilgili bir dizi onarıcı olaya da katkı sağlar. Eğer otofaji ile ilişkili genlerde (Atg) mutasyon gibi bazı nedenlerden dolayı bir bozulma gerçekleşirse, hücresel adaptif kapasite normal koşullardakinden daha sınırlı hale gelir ve hücreler aynı stres derecesine karşı daha savunmasız hale gelebilir (Şekil 2.5. B). Aksine kalıcı stres eğer maksimum hücresel adaptif kapasiteyi aşan aşırı veya uzun süreli otofajiye neden olursa, otofaji-indüklü etkiler de nekrotik ve apoptotik kaskadları kolaylaştırır ve bunun sonucunda da hücre ölümüne neden olabilir (Şekil 2.5. C). Bu nedenle otofaji, hücresel adaptif sistem mekanizmalarında iki ucu keskin bir kılıç gibi görünmektedir ve otofajinin faydalı mı yoksa zararlı mı olduğu otofaji indüksiyon hızına ve otofajinin aktivasyon süresine bağlıdır (11).



**Şekil 2.5.** Hüresel enerjinin ve homeostazisin düzenlenmesinde otofajinin rolü (11)

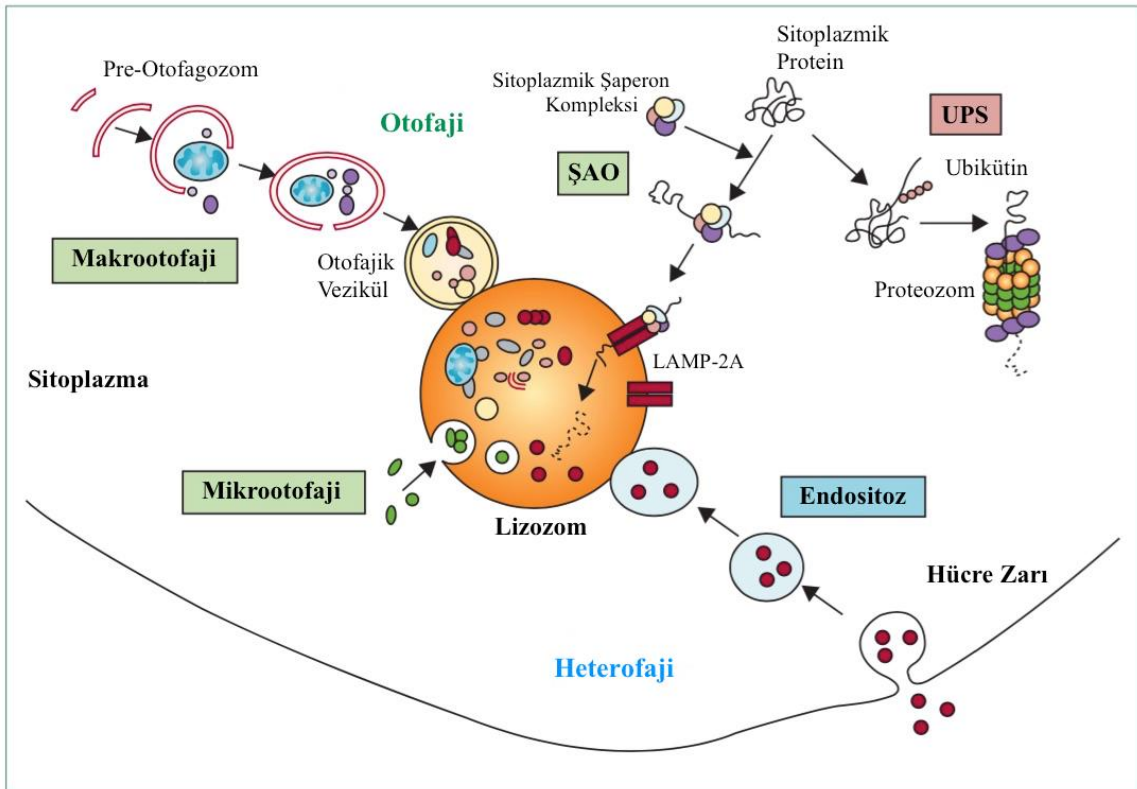
Günümüzde memeli hücrelerinde makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç farklı otoaji yolağı tanımlanmıştır. Üç farklı otofaji yolağında da hücrelerin yıkıma uğrayacak materyalleri lizozomlar tarafından yıkılır ancak üçünün de biyolojik özellikleri birbirinden farklıdır (Şekil 2.6). Genellikle üstünde en çok durulan ve otofaji denildiğinde kastedilen makrotofajidir ve ana otofajik yoldur. Makrotofaji pek çok hücrede oluşur; protein fragmentlerinin ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli görevi üstlenir. Makrotofaji yıkıma uğrıtılacak hedef molekülleri, çevrelerindeki diğer sitoplazmik içerikten ayıran çift katlı membran sistemlerinin (otofagozomların) oluşumuyla karakterize edilir. Yıkıma uğrıtılacak protein, karbonhidrat, lipid, RNA, mitokondri ve peroksizom gibi organeller otofagozomların içine hapsedilip lizozomlara taşınarak lizozomal enzimlerle parçalanırlar. Otofagozomlar endoplazmik retikulumdaki içerik olarak fosfotidil inozitol 3 fosfat (PI3P)'tan zengin membranlarının bir araya gelmesi, uzaması ve kapanması ile meydana gelmektedir. Otofagozomlar içeriklerini lizozoma taşıyarak lizozom ile birleştiklerinde otolizozom adını alır ve içerikleri asidik lizozomal hidrolazlar ile yıkılır. Mikrotofaji ise küçük miktarlardaki sitoplazma içeriğinin doğrudan lizozom tarafından pinositozudur. Sitoplazmik içerik lizozom membranının içe kıvrılmasıyla lizozom içinde hapsedilir. Diğer otofaji türlerine göre daha seçici olan şaperon aracılı otofaji ise sadece KFERQ benzeri motifleri içeren proteinlerin yıkıma uğrıtıldığı otofaji türüdür. Heat Shock Cognate 70 (HSC70) içeren şaperon kompleksler, sitoplazmadaki KFERQ motifi proteinleri tanıyarak, bu proteinlere bağlanırlar ve lizozom membranına taşırlar. Lizozom membranında bulunan Lysosomal Associated Membrane Protein-2 (LAMP-2), şaperon-KFERQ motifli protein kompleksini tanıyarak ve protein katlantıları açılır. Protein lizozom membranından HSC70 yardımıyla geçerek lizozomda yıkıma uğrıtılır (Şekil 10).

Şaperon aracılı otofajide membran oluşumu ve içeriğin membran sistemi içinde hapsedilmesi gibi basamakların olmadığı tespit edilmiştir (99, 100).

Otofaji sürecinde, otofagozomlar “otofaji oluşum merkezi” (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memeli hücrelerinde endoplazmik retikulum ile golgi arasında olduğu düşünülen bölgelerde oluşmaktadır. Otofagozom zarının kökeni tam olarak bilinmemekle birlikte, otofajik zarların mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi veya hücre zarından türediği düşünülmektedir (100).

Otofajinin en çok üstünde durulan türü makrotofajidir ve birçok hücre türünde meydana gelmektedir. Protein fragmentlerinin ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli görevi üstlenen makrotofajinin basamakları şu şekildedir:

- I) İndüksiyon fazı (Otofagozom membranının başlaması)
- II) Vezikülün çekirdeklenme fazı
- III) Vezikülün uzama fazı
- IV) Vezikülün lizozomla birleşme ve yıkım fazı (101).



Şekil 2.6. Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (99)

### 2.8.1. Beclin-1, LC-I/II ve P62

Hücre içerisinde yıkım, yapım ve hücre içi maddelerin geri dönüşümünü dengelemekten sorumlu bir mekanizma olan otofajinin tanımlanması 1960'lı yıllara uzansa da 1990'ların ortalarına kadar genetik temelini kavramaya yönelik çalışmalar yapılmamıştır. 1992'de Ohsumi ve arkadaşları mayalarda yaptıkları çalışmada 30 Atg tanımlamışlardır (91). Otofaji mekanizmasında rol oynayan proteinler ilk olarak mayada gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda keşfedilmiş ve daha sonrasında ökaryotlarda yapılan çalışmalarda bu proteinlerin homologları tanımlanmıştır. Otofaji ile bağlantılı proteinler olarak da bilinen Atg proteinlerinin çoğu, pre-otofagozomal yapıların (PAS) veya fagoforum oluşumu, otofajik zarların oluşumu, uzaması ve kesecik haline gelmesi ve son olarak da otolizozom ile sitozolik proteinlerin ve organellerin degradasyonunda rol oynamaktadır (41). Beclin-1, LC3 ve P62 proteinleri otofaji sürecine katılan üç ana proteindir (102).

Beclin-1 hücrede çok işlevli rol oynayan özel bir moleküldür. Beclin-1 otofajinin başlaması ve gelişmesi, endositoz, strese karşı adaptasyon, yaşlanma ve hücre ölümü gibi birçok hücreyel süreçte önemli roller üstlenmektedir (94). Beclin-1 yaklaşık 60 kDa'lık moleküler ağırlığa ve 450 amino asitlik doğrusal dizilime sahip bir proteindir. Beclin-1 sitoplazmik yapılarda yani endoplazmik retikulum, mitokondri ve nükleer membran içinde lokalizedir (103). Beclin 1, fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) üretmek üzere fosfatidilinositolün inositol halkasının 3 pozisyonlu hidroksil grubunun fosforilasyonunu katalize eden, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K-III) temel bir bileşenidir (104). Sınıf III PI3 kinaz hücre çoğalmasını ve hücre içindeki hücre iskeleti elemanlarının yer değiştirmesini destekler. Sınıf III PI3 kinaz, sadece Beclin-1 ile bir kompleks oluştururken faaliyet gösterebilir. Beclin-1/PI3K-III kompleksi trans-golgi aygıtında lokalizedir. Bu kompleks artan fosfatidilinositol 3-fosfat (PIP3) üretimini destekleyerek fagoforum uzamasını artırır ve diğer Atg proteinlerinin fagoforlara dahil edilmesine izin verir (105, 106). Otofajide önemli roller oynayan ve otofajiyi düzenleyen temel proteinlerden birisi olan Beclin-1, otofaji aktivitesinin dinamik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (107, 108).

LC3 proteini, NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1 protein) ve p62 ile birlikte otofagozomun gelişiminde, organellerin ve proteinlerin kargolanmasında görev almaktadır (109). LC3, mayalarda Atg8 proteini olarak adlandırılır ve moleküler kütlesi yaklaşık 17 kDa olan çözünür bir proteindir. Atg5-Atg12 ve LC3 konjugasyon sistemi

otofagozomun son formunu alıp genişlemesi için mutlaka gereklidir. Atg5-Atg12-Atg16L kompleksi sitoplazmada oluşur ve ardından pre-otofagozomal zara bağlanır. Bu bağlanma MAP-LC3 (microtubule associated protein 1 (MAP1) LC3) veya kısaca LC3'ün bu bölgeye gelmesini sağlar (110). LC3'ün C-ucunda bulunan beş amino asitin Atg4 (sistein proteazı) proteazı tarafından karboksil ucundan kesilerek 6. aminoasit olan glisinin ortaya çıkarılmasıyla, sitoplazmik izoformu LC3-I tipi oluşturulur. Burada LC3'ün serbest formu olan LC3-I, geri dönüşümsüz olarak E1 enzim benzeri Atg7 ile aktifleştirildikten sonra E2 enzim benzeri Atg3 ile işlenip, fosfatidil etanolamin (FE) eklenmesiyle lipidlenmiş formu olan LC3-II'ye dönüşür. Bu modifikasyon LC3'ü pre-otofagozomal membrana bağlamak için gereklidir (111, 112). LC3-II, otofagozomun hem dış yüzeyinde hem de lümen kısmında yerleşerek otofagozom oluşumuna katılır. Otofagozomun dış yüzeyinde bulunan LC3-II, kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanınca Atg4 tarafından FE'nin kesimiyle ortadan kaldırılırken, lümen tarafındaki LC3-II ise otofajik kargo ile birlikte sindirilir (113). Bu nedenle LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü otofajinin araştırılmasında kullanılan belirteçlerden birisidir (110).

Otofaji, lizozomal sistem aracılığıyla sitotoksik bileşenlerin programlanmış bir degradasyonudur (114) ve p62/SQSTM1'de poliubikutin bağlayıcı proteinlerden ve seçici otofajik substratlardan birisidir (15). Zarar görmüş veya uzun ömürlü proteinlerin parçalanması için bir kargo reseptörü olarak görev yapan p62'nin (15), son yıllarda tau gibi ubikuitinlenmiş proteinleri degradasyon için proteazoma ilettiği gösterilmiştir (115). Ayrıca p62, ubikuitinlenmiş kargolara bağlanarak sitozolik protein kalite kontrolünü kolaylaştırmak için çekirdek ve sitoplazma arasında mekik oluşturabilmektedir (115). Otofaji sürecinde ubikuitinlenmiş proteinlerin tanınmasına, ubikuitin bağlanma domainleri (UBD) aracılığıyla ubikuitin ile kovalent olmayan şekilde etkileşen ubikuitin reseptörleri aracılık eder. Böyle bir adaptör fonksiyonuna sahip olduğu bildirilen ilk protein olan p62, başlangıçta hücre büyümesini ve proliferasyonunu düzenleyen sinyal yollarında bir aracı olarak keşfedilmiştir. P62, bir C-terminal UBD'ye ve LC3 etkileşmesinden sorumlu bir kısa LIR (LC3 ile etkileşen bölge) dizisine sahiptir (116). Memeli proteininin otofajik degradasyonu için LIR gereklidir ve p62 proteini otofagozom oluşumunu desteklemek için LIR alanı aracılığıyla LC3 ile etkileşime girer. Böylece p62 proteini degradasyon amacıyla lizozoma taşınması için UBD alanı aracılığıyla kendisine bağlanan ubikuitinlenmiş hedef sitotoksik materyalleri verir. LC3 ile olan ilişkisi sayesinde ve UBD alanı aracılığıyla P62, ubikuitinlenmiş proteazomun tanınmasında, otofajik kargoların otofagozomlara taşınmasında ve otofajiyile yıkımlarının

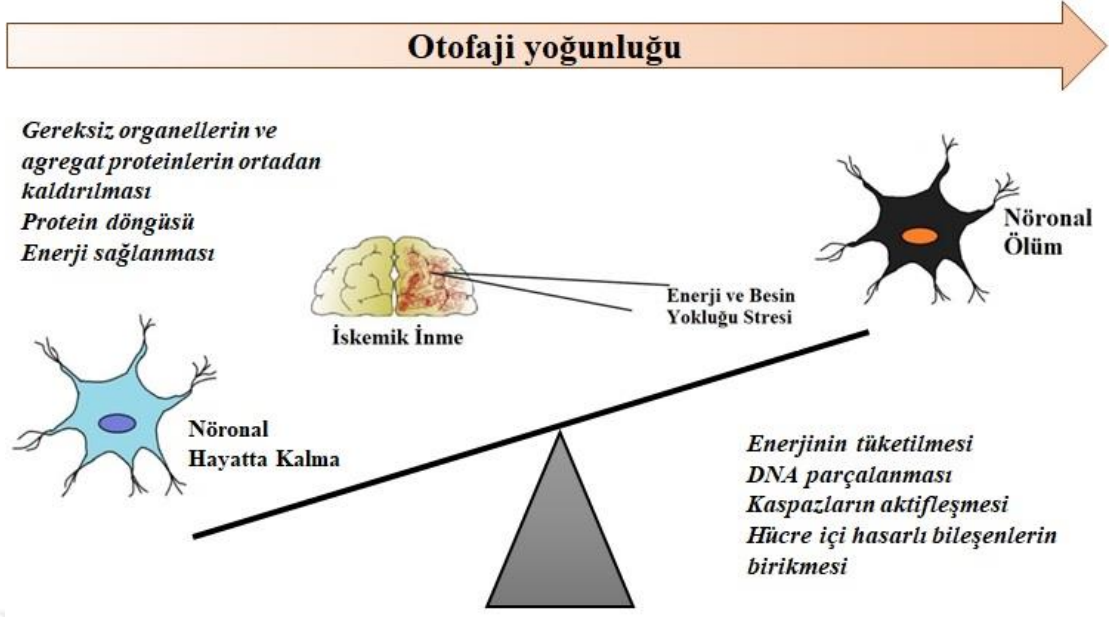
kolaylaştırılmasında görev alır. (114). Otofagozomlar lizozomlarla kaynaşıp otofagolizozomları oluştuğunda otofajik kargolar lizozomal enzimlerce yıkılır. Kargo yıkılana kadar p62 proteini otofagozoma bağlı olarak bulunur (110). P62 otofaji ile etkili bir şekilde bozulan spesifik bir substrattır yani normal olarak başlamış ve tamamlanmış bir otofaji mekanizması sonunda p62 degrade olur. Hücre içindeki p62 miktarı, hücrenin otofajik etkinliği ile ters orantılıdır. Bu nedenle hücre içinde p62 birikimi otofajik sürecin engellendiğini gösteren iyi bir belirteçdir (117).

### **2.8.2. Serebral İskemi ve Otofaji**

Bölünemeyen ve terminal farklılaşma hücreleri olarak nöronlar, hücresel homeostazı korumak için protein kalite kontrolü ve anormal organellerin eliminasyonu konusunda sıkı düzenlemelere sahiptirler (41). Sinir hücrelerinin hayatta kalması, hücresel proteinlerin ve hasarlı organellerin oluşumu ve degradasyonu arasındaki dengeye bağlıdır (118). Son yıllardaki çalışmalar, otofajinin yapısal veya açlığa bağlı protein döngüsünde ve hasarlı organellerin eliminasyonunda önemini roller oynasa bile otofajinin nöronlardaki kesin rolü karmaşıktır ve hala çok iyi bilinmemektedir (41). Mevcut kanıtlar otofajinin serebral iskemik hasarlanma sonrası nöronal kaderin belirlenmesinde ikili rol oynadığını göstermektedir (Şekil 2.7.). İskemik hasarlanma durumunda en hassas hücreler nöronlar olduğundan, iskemik inme sırasında nöronal otofaji erken gözlenebilir (119). Normal koşullar altında otofaji nöronlarda nispeten düşük seviyelerde tutulurken serebral iskemik hasar gibi patofizyolojik koşullara yanıt olarak arttırılabilir (41).

Nöronal otofajinin iki önemli özelliği vardır. Birincisi, beynin ihtiyaç duyduğu besin maddelerini açlık koşulları altında diğer organlardan telafi edilebilmesidir. Böyle bir düşüncenin nedeni ise yapılan bir çalışmada 48 saat boyunca yiyeceklerden mahrum bırakılmış farelerin beyinde otofaji görülmemesidir. İkincisi ise otofagozomların ve lizozomların lokalizasyonunun farklı olmasıdır. Otofagozomlar sitoplazma boyunca bulunurken, lizozomlar esas olarak nöron gövdesinin jukstanükleer sitoplazmasında bulunurlar. Otolizozomları oluşturmak için dendritlerde ve sinaptik terminal bölgelerinde oluşan otofagozomların nöron gövdesindeki lizozomlara taşınması gerekir. Bu durum dendritler veya aksonlar hasarlandığında, dendritlerde ve sinaptik terminal bölgelerinde oluşan otofagozomların, sekestre edilmiş materyali ayrıştırmak için lizozomlarla kaynaşamayacağı anlamına gelmektedir (118).





Şekil 2.7. Nöronlarda otofaji (10, 119)

Otofaji, bazal ve uyarılmış otofaji olarak da alt sınıflara ayrılmaktadır. Bazal otofaji nöronlarda “temizlik” süreci olarak kabul edilirken, uyarılmış otofaji nörodejeneratif hastalıklarda umut verici bir nöroprotektif strateji olarak kabul edilmektedir. Otofajinin indüksiyonu nörodejeneratif hastalıkların ortak bir özelliği olan anormal protein agregatları olan nöronlarından kurtulmaya yardım edebilir. Birçok çalışma otofajinin olmaması ya da yetersiz olmasının otofajinin nörodejeneratif hastalıkların altında yatan bir neden olabileceğini ileri sürmektedir. Günümüzde otofajinin serebral iskemide oynadığı rol hakkında birleşik bir teori olmamasına rağmen, son birkaç yıldaki çalışmalara dayanarak bu konu hakkında farklı beş bakış açısı ortaya atılmıştır (118).

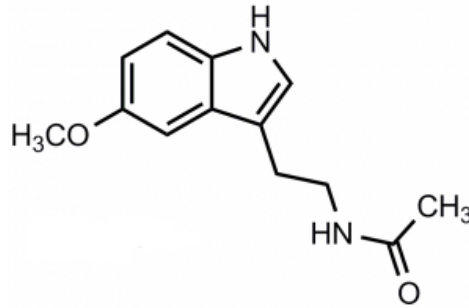
- 1) Serebral iskemide otofajinin aktivasyonu nöronları ölümden korur.
- 2) Serebral iskemide otofajinin aktivasyonu yıkıcı bir role sahiptir.
- 3) Serebral iskemide otofajinin derecesi hücrelerin kaderini belirler. Kang ve arkadaşları (120), otofaji düzeylerinin hücrelerin hayatta kalması veya ölümü için kritik olduğunu önermişlerdir. Fizyolojik otofaji seviyeleri hayatta kalmayı teşvik ederken, yetersiz veya aşırı otofaji seviyeleri ölümü teşvik etmektedir.
- 4) Serebral iskemiden sonra otofajinin indüklendiği zaman/süre otofajinin rolünü belirler. Otofaji iskemik önkoşullamada koruyucu bir rol oynayabilir, ancak iskemi/reperfüzyon meydana geldiğinde farklı bir etkiye sahiptir.



- 5) Serebral iskemide otofaji sekteye uğrayabilir. Birçok nörodejeneratif hastalığın ortak bir özelliği, anormal derecede çok sayıda otofajik vakuolün (otofagozomlar ve otolizozomlar) birikmesi veya sıkça düzensiz şekilli otofajik vakuollerin ortaya çıkmasıdır. Artmış otofagozom oluşumu, otofajik vakuollerin yoğunluğunun artmasından kaynaklanıyor gibi görünmektedir ancak bu artmış otofajik vakuoller de bozulmuş otolizozomal degradasyon olduğu anlamına gelebilir.

## 2.9. Melatonin

Pineal bez varlığı çok eski zamanlardan beri bilinen bir yapı olmakla beraber yaklaşık üç yüz yıl önce Fransız filozof Rene Descartes pineal bezi “ruhun tahtı” olarak tanımlamıştır. Ancak o tarihten 1950’lerin sonuna kadar pineal bezden salgılanan ana madde olan melatonin hormonunun varlığı ortaya konulamamıştır (121, 122). Melatonin hormonu ilk olarak 1958 yılında Amerikan dermatolog Aaron Lerner tarafından sıgırların pineal bezinden elde edilip tanımlanmıştır (123).



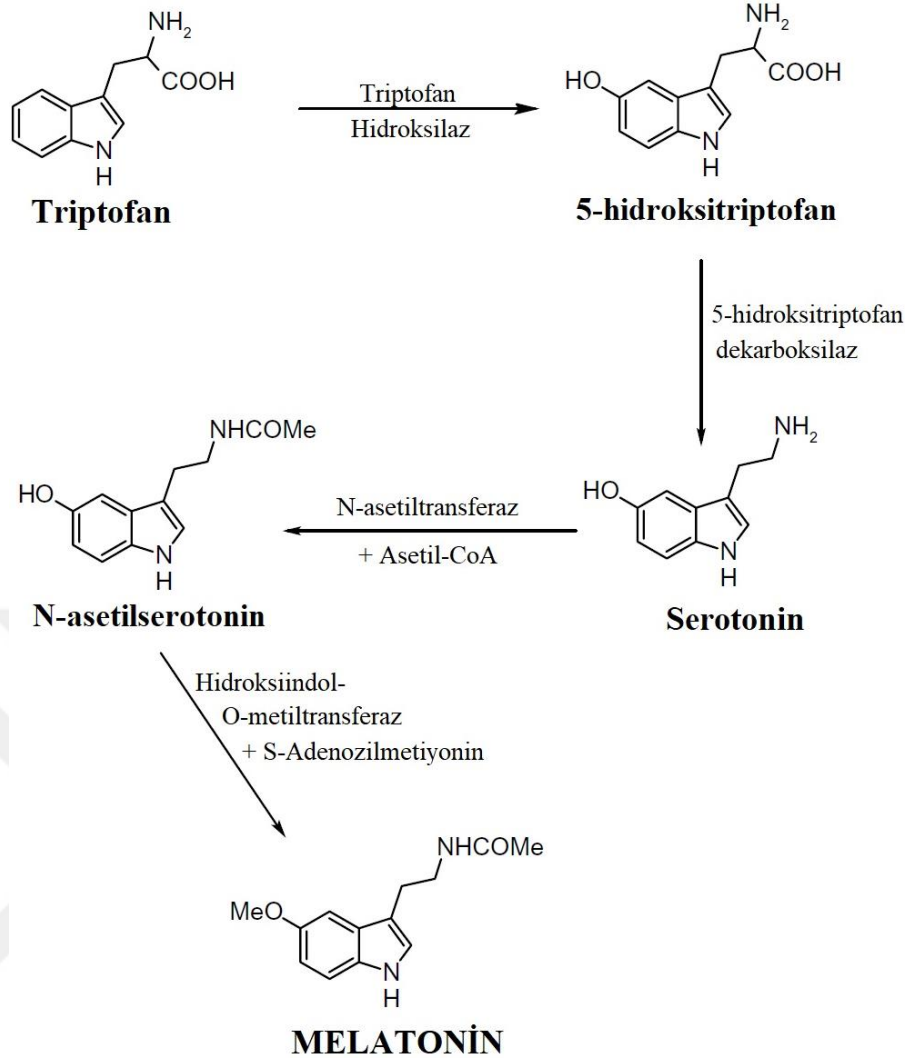
Şekil 2.8. Melatoninin kimyasal yapısı (124)

Pineal bezin pineolasit denilen hücrelerinde üretilen melatonin, sirkadiyen ritim, uyku/uyanıklık döngüsü, pubertal gelişme-üreme, lokomotor aktivite, immünite ve kan basıncının düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik ve biyolojik işlevin düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Güçlü bir serbest radikal süpürücüsü olan melatonin, yüksek toksisiteye sahip hidroksil ve oksijen radikallerinin direkt olarak temizliğini sağlar ve bir pro-oksidatif enzim olan nitrik oksit sentazı inhibe eder. Ayrıca melatonin, antinosiseptif, anti-depresan, anksiyolitik, antineofobik, nöro-protektif, anti-inflamatuvar, anti-kanserojenik ve anti-oksidan gibi fonksiyonlara da sahiptir (121, 122, 125).

### 2.9.1. Melatoninin Sentezi ve Salgılanması

Melatonin sentezlenmesi/salgılanması omurgalı canlılarla sınırlı olmayıp, bakterilerde, tek hücreli ökaryotlarda ve bitkileri de içeren bir çok taksonda yapılmaktadır. Melatonin yalnızca pineal bezden sentezlenmez/salgılanmaz; retinadan, gastrointestinal sistemden, böbrekten, karaciğerden, tiroid bezinden, kemik iliğinden, lökositlerden, membranöz kohleadan, plasentadan, Harderian bezinden, üreme organlarından, deriden ve bazı beyin alanlarından da sentezlenir/salgılanır (126). Pineal bez dışındaki bu organların/dokuların toplam büyüklüğü nedeniyle sentezledikleri melatonin miktarı hiçbir şekilde göz ardı edilemez ancak bu organların oluşturdukları melatonin ya zayıf ya da sadece belirli uyarıcılara cevap olarak salınım gösterirler. Ayrıca bu organlardan/dokulardan salgılanan melatonin yalnızca parakrin etki gösterirler. Melatoninin plazma düzeyini belirleyen yer ise pineal bezdir (126-128).

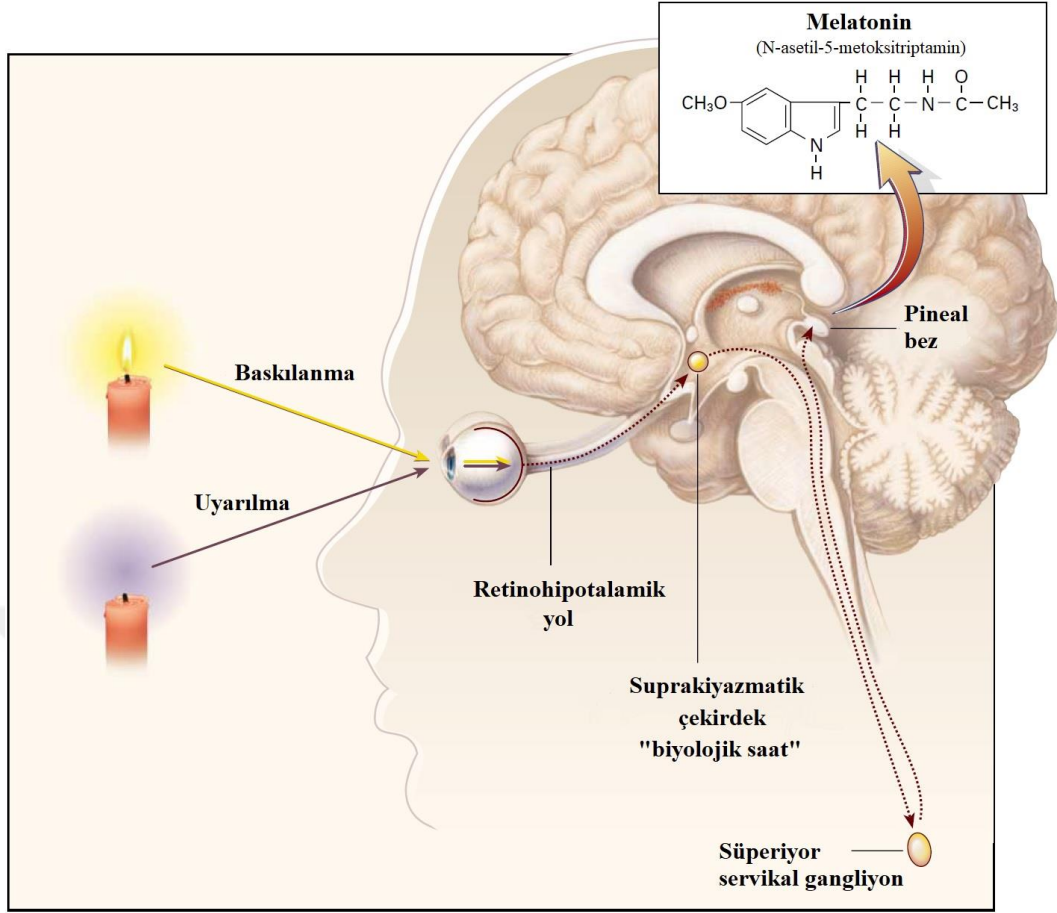
Melatonin, dışarıdan besinlerle birlikte alınması gereken esansiyel bir aminoasit olan triptofan aminoasidinden sentezlenen bir indol bileşiğidir. Triptofan aminoasidinin çok büyük bir kısmı (yaklaşık %80'i) pineal bez tarafından kullanılmaktadır. Melatonin sentezi pineal bez tarafından öncü madde olan triptofan aminoasidinin sistemik dolaşımdan aktif transportla hücre içine (pinealositlere) alınmasıyla başlar. Pinealositlerde triptofan aminoasidi, bir mitokondriyal enzim olan triptofan 5-hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofana hidroksillenmektedir. Kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen bir ara metabolit olan 5-hidroksitriptofan ise sitoplazmik bir enzim olan L-aminoasit dekarboksilaz enzimi tarafından gerçekleştirilen bir reaksiyon ile karboksil grubunu kaybederek 5-hidroksitriptamine (serotonin) dönüştürülür. Kan beyin bariyerini geçemeyen serotonin, arilalkilamin N-asetiltransferaz enzimi tarafından asetilasyona uğratarak N-asetil-5-hidroksitriptamin (N-asetilserotonin) oluşturulur. Son olarak N-asetil-5-hidroksitriptaminden hidroksiindol-O-metiltransferaz enzimi aracılığı ile N-asetil-5-metoksitriptamine (melatonin) dönüştürülmesiyle melatonin sentezi tamamlanır (129, 130).



**Şekil 2.9.** Melatonin sentez basamakları (131)

Melatonin sentez ve salınımını etkileyen en önemli faktör ışıktır. Melatonin sentezinin yapıldığı pinealosit hücreleri ışığa duyarlı hücrelerdir. Bu nedenle melatonin sentezi ve salınımı karanlıkta uyarılır, gece devam eder ve aydınlıkla baskılanır. Ayrıca gecenin uzunluğuna bağlı olarak melatonin sentez ve salınımı da o kadar uzun sürer. Karanlık fazın başında ve sonunda ışık melatonin salınım ritmini düzenler ve sekresyonunu baskılar (132).

Retinohipotalamik yollarla alınan ışık bilgisi vücudun biyolojik ritminin düzenlenmesinden sorumlu merkez olan suprakiazmatik çekirdeğe ulaşır ve buradan da paraventriküler çekirdeğe geçer. Daha sonra ışık bilgisi paraventriküler çekirdekten spinal kordun üst torasik segmentindeki intermediolateral çekirdeğe ve buradan da süperior servikal gangliyonuna iletilir. Bu bilgi süperior servikal gangliyon hücreleri, internal koroid sinir ve konarian sinirler aracılığıyla pineal beze ulaşır (133) (Şekil 2.10.).



**Şekil 2.10.** Melatonin sekresyonunun fiziyojisi (122)

Gün ışığında retinal fotoreseptör hücreleri hiperpolarize olup nörepinefrin salınımını engeller. Bu da retinohipotalamik-pineal sistemin baskılanmasına ve çok az miktarda melatonin salınımına neden olur. Süperior servikal gangliyondan çıkan sinyallerin pinealosit hücrelerini uyarıcı etkisi ile karanlıkta bu baskılanma ortadan kalkar ve melatoninin sentezi/salınımı artar. Suprakiazmatik çekirdekte gelen karanlık bilgisi, süperior servikal gangliyondan uzanan post ganglionik sinir terminallerinden norepinefrin salınımına neden olur. Salınan norepinefrin pinealosit hücre membranındaki  $\alpha_1$  ve  $\beta_1$  adrenerjik reseptörlerine bağlanır ve hücre içi cAMP artışına sebep olur. Artan hücre içi cAMP ise melatonin yapımında hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetiltransferaz enziminin düzeyini artırır ve sonuç olarak serotoninden melatonin sentezi ve salınımı artar (133).

Melatonin hormonunun salınımı özel bir sirkadiyen ritime sahiptir. Bu hormonun plazma seviyesi saat 21:00-22:00'de artmaya başlayarak saat 02:00-04:00 aralığında en üst seviyesine ulaşır. Melatonin hormonunun plazma seviyesi saat 05:00-07:00 gibi

azalmaya başlayarak saat 07:00 sonrasında ise bazal seviyesine düşer. Melatonin hormonunun gece plazmadaki seviyesi gündüz seviyesinden yaklaşık 3-10 kat daha yüksektir ve bir günde %80'i gece boyunca olmak üzere ortalama 30 mg melatonin hormonu üretilir (134).

### 2.9.2. Melatoninin Fizyolojik Etkileri

Homeostazisin devam ettirilmesi, kan basıncının düzenlenmesi, immünojenik yanıtın oluşturulması gibi temel fizyolojik fonksiyonlar ve hücreler düzenlenmesi, solunum zinciri ve antioksidan savunma gibi birçok temel biyokimyasal mekanizma sirkadiyen bir ritme sahiptir (135). Melatoninin nörodejeneratif hastalıklara, yaşlanmaya, iskelet/reperfüzyon hasarına, oksidatif strese ve reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu rolü vardır. Melatonin iki yan zincire, bir 5-metoksi ve 3-amid grubuna sahip bir indolamindir. Molekül ağırlığı ve boyutu, kısmi hidrofilik ve güçlü lipofilik özellikleri sayesinde hücre zarlarını ve vücuttaki fizyolojik bariyerleri kolayca geçebilen güçlü bir serbest radikal süpürücü ve geniş spektrumlu bir antioksidandır. Melatonin OH<sup>•</sup>, O<sup>2-</sup>, ve NO içeren radikal oksijen ve nitrojen türlerinin doğrudan temizleyicisidir (136).

Melatonin hem direkt serbest radikal temizleyici aktivitesi hem de antioksidan savunma sistemine katkıları nedeniyle protein oksidasyonunu, lipid peroksidasyonunu, mitokondriyal hasarı ve DNA yıkımını inhibe ederek oksidatif stresin indüklediği zararlı durumların ortadan kaldırılmasına yardımcı olur (136). Melatonin hücre içerisinde mitokondriyal süperoksit dismutaz, sitozolik süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin seviyelerini arttırmaktadır. Bu enzimlerin yanı sıra melatoninin, nöronal ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimleri gibi hücre ölüm yollarında görev alan enzimlerin miktarlarını da düşürdüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (137).

Melatonin fizyolojik etkilerini MT1 ve MT2 reseptörleri üzerinden göstermektedir. MT1 ve MT2 reseptörleri merkezi sinir sisteminde, suprakiazmatik çekirdek, hipokampus, serebellar korteks, prefrontal korteks, bazal gangliyonlar, substantia nigra, ventral tegmental alan, nükleus akkümbens, retinal hücreler (horizontal, amakrin ve gangliyon hücreleri); periferik organlarda reseptör yerleşimleri ise kan damarları, meme bezleri, gastrointestinal sistem, karaciğer, böbrek, mesane, overler, testisler, prostat, deri ve immün sistemdir (127).

Melatonin %60-70 oranında albümine bağlanarak kanda taşınan bir hormondur. Endojen melatoninin yarılanma ömrü 3 dakika ile 45 dakika, ekzojen alınan melatoninin yarılanma ömrü ise 20 dakika ile 60 dakika arasında değişmektedir. Ekzojen olarak alınan melatoninde endojen melatonin gibi aynı yollar kullanılarak metabolize edilmektedir. Melatonin hem karaciğer hem de böbrekte metabolize edilmesine rağmen metabolize edildiği asıl kısım karaciğerdir (132, 134, 138-140). Melatonin karaciğerde mikrozomal enzimler tarafından en önemli metaboliti olan 6-hidroksimelatonine dönüştürülür; böbrekte ise sülfat (%50-80) ve glukuronik aside (%5-30) bağlanarak atılırken %1'lik kısmı ise hiçbir değişime uğramadan atılmaktadır. Melatonin hem hidrofilik hem de lipofilik yapıya sahip olması nedeniyle tüm hücre zarlarını kolayca geçebilir ve idrar dışında az bir kısmı da tükürük, safra, serebrospinal sıvı gibi sıvılarla vücudumuzdan atılmaktadır (141).

### **2.9.3. Melatonin, Serebral İskemi ve Otofaji İlişkisi**

Melatonin salgısının yaşa bağlı olarak azalma gösterdiği ve bu azalmanın da inme ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında pineal kalsifikasyon ve düşük melatonin düzeylerinin inme için risk faktörleri olduğu ve beyinde melatoninin antiapoptotik özellikleri sayesinde nöroproteksiyon sağladığı belirtilmiştir (142). İndüklenmiş geçici fokal serebral iskemi sırasında melatonin uygulanmasının Bcl-2 protein seviyesini arttırdığı ve mitokondriden sitokrom-c salınımı inhibe ederek apoptozom oluşumunu ve kaspaz-3 aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir (2).

Otofaji, agregat proteinlerin, hasarlı organelerin ve bazı patojenlerin lizozomal olarak geri dönüştürülerek iskemik hücrelere ek enerji kaynağı ve besin sağlanmasında ve hücrelerin hayatta kalmasında önemli rol oynamaktadır (143). Bazı durumlarda otofaji süreci hücre ölümüne dahil edilmektedir ancak çoğu durumda otofaji hücresel bileşenlerin otofagozom tarafından yutulduğu ve sindirilmek için lizozomla kaynaştığı normal ve önemli bir degradasyon sürecidir (119). Artan veriler otofajinin iskemi sonrası penumbra bölgesinde önemli ölçüde aktive olduğunu göstermiştir (144). Ayrıca otofajinin uyarılmasının nöronal hasarın önlenmesindeki blokajından daha avantajlı olduğunu ve otofajinin uyarılmasının serebral iskemiye takiben nöronal hayatta kalmaya fayda sağladığı belirtilmiştir (145). Serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı melatonin aracılı korumada otofajinin rolü hakkındaki bilgiler hala sınırlı ve çelişkilidir (146) ancak

serebral iskemide uygun otofajik aktivitenin nöroprotektif olduğu, aşırı veya yetersiz otofajinin de zararlı olduğu genel kabul görmektedir (145).



### 3. MATERYAL VE METOT

Çalışmadaki uygulamaların tamamı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafınca onaylanan (02/06/2020 tarih, 2020/8-7 karar sayısı ve 9833 HAYBİS kayıt no) etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde yapıldı. Çalışmada *Wistar Albino* cinsi, ortalama ağırlıkları 220-280 gr, 3-4 aylık toplam 105 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışma süresince tüm sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünün uygulandığı, sıcaklığı  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de sabit tutulan ortamda barındırıldı. Hayvanlara normal musluk suyu içirildi ve *ad libitum* olarak pellet halindeki standart sıçan yemiyle beslendi.

Çalışma süresince deney hayvanlarının beslenme ve bakımı, serebral iskemi modelinin oluşturulması, nörolojik muayeneleri, rotarod ve yapışkan çıkarma davranış testleri İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (İNÜ-DEHÜM), elektron mikroskop ve immünofloresan analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında, Western Blot analizleri ise İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

#### 3.1. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak hayvanların sayısı (örneklem büyüklüğü), tip 1 hata ( $\alpha$ ) 0.05, tip 2 hata ( $\beta$ ) 0.20 (Güç=0.80), gruplar arası öngörülen en yüksek fark 0.6, standart sapması 0.2 ve grup sayısı 7 olduğunda; her bir grupta en az 5 sıçan olması gerektiği güç analizi ile hesaplandı (147). Buna karşın cerrahi operasyonlar sırasında ve sonrasında kayıplar yaşanabileceği ve araştırma sonuçlarının geçerliliği ve güvenilirliğinin etkilenmemesi için her bir grupta (Western Blot ve elektron mikroskop analizi için en az 6 sıçan, immünofloresan analizi için en az 4 sıçan, infarkt hacminin hesaplanabilmesi için en az 5 sıçan olacak şekilde) en az 15 sıçan olmak üzere toplamda 105 sıçan çalışmaya dahil edildi.

#### 3.2. Deney Hayvanlarının Rasgele Gruplara Yerleştirilmesi ve Körleme Yöntemi

Mevcut tez proje çalışmasında taraf tutma (yanlılık) problemlerini azaltmak için rasgele atama ve çift körleme yöntemleri kullanıldı. Bu bağlamda, deney hayvanlarının



bu tez çalışmasında incelenen deney ve kontrol gruplarına yerleştirilmesi rasgele atama (randomizasyon) yöntemlerinden rasgele tahsis kuralı kullanılarak Fakültemiz Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından geliştirilen rasgele atama yazılımı ile yapıldı (148).

### 3.3. Deney Grupları ve Deney Tasarımı

Çalışmada kullanılacak tüm sıçanlar tartılarak vücut ağırlık ortalamaları birbirlerine en yakın olacak şekilde Sham Sİ Grubu, Sİ3 Grubu, Sİ3+EtOH Grubu, Sİ3+Mel Grubu, Sİ7 Grubu, Sİ7+EtOH Grubu, Sİ7+Mel Grubu olmak üzere rastgele 7 gruba ayrıldı (n=15).

**Grup 1- Sham Sİ Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara davranış testlerinin üç günlük ön eğitimi yaptırıldı ve daha sonra sham Sİ cerrahi operasyonları gerçekleştirildi (Damarın oklüzyonu dışındaki bütün cerrahi operasyonlar gerçekleştirildi). Bu hayvanlara Sham Sİ'den 1 saat sonra günde bir kez olmak üzere 3 gün boyunca intraperitoneal olarak melatonin çözücüsü (aynı hacimde, %0.5'lik etanol) enjekte edildi. Ayrıca diğer gruptaki hayvanlarla eşzamanlı olarak nörolojik defisit skora ve davranış testleri yaptırıldı.

**Grup 2- Sİ3 Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara davranış testlerinin üç günlük ön eğitimi yaptırıldıktan sonra geçici fokal Sİ oluşturuldu ve Sİ sonrası 3 gün boyunca reperfüzyon sağlandı. Sİ'den 24 saat sonra 3 gün boyunca nörolojik defisit skora ve davranış testleri yaptırıldı.

**Grup 3- Sİ3+EtOH (Çözücü) Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara davranış testlerinin üç günlük ön eğitimi yaptırıldıktan sonra geçici fokal Sİ oluşturuldu ve Sİ sonrası 3 gün boyunca reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon başladıktan 1 saat sonra melatonin çözücüsü (aynı hacimde, %0.5'lik etanol) enjekte edildi ve Sİ'den 24 saat sonra 3 gün boyunca nörolojik defisit skora ve davranış testleri yaptırıldı.

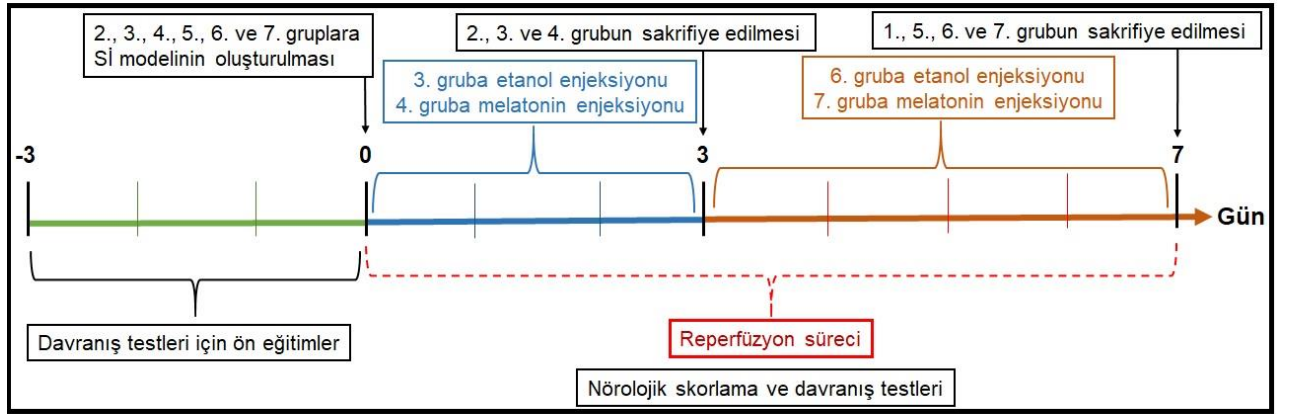
**Grup 4- Sİ3+Mel Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara davranış testlerinin üç günlük ön eğitimi yaptırıldıktan sonra geçici fokal Sİ oluşturuldu ve Sİ sonrası 3 gün boyunca reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon başladıktan 1 saat sonra günde bir kez (10 mg/kg) (149) olmak üzere 3 gün boyunca intraperitoneal olarak melatonin enjekte edildi. Ayrıca Sİ'den 24 saat sonra 3 gün boyunca nörolojik defisit skora ve davranış testleri yaptırıldı.

**Grup 5- Sİ7 Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara davranış testlerinin üç günlük ön eğitimi yaptırıldıktan sonra geçici fokal Sİ oluşturuldu ve Sİ sonrası 7 gün boyunca reperfüzyon

sağlandı. Sİ'den 24 saat sonra 7 gün boyunca nörolojik defisit skorlama ve davranış testleri yaptırıldı.

**Grup 6- Sİ7+EtOH (Çözücü) Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara davranış testlerinin üç günlük ön eğitimi yaptırıldıktan sonra geçici fokal Sİ oluşturuldu ve Sİ sonrası 7 gün boyunca reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon başladıktan 1 saat sonra melatonin çözücüsü (aynı hacimde, %0.5'lik etanol) enjekte edildi ve Sİ'den 24 saat sonra 7 gün boyunca nörolojik defisit skorlama ve davranış testleri yaptırıldı.

**Grup 7- Sİ7+Mel Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara davranış testlerinin üç günlük ön eğitimi yaptırıldıktan sonra geçici fokal Sİ oluşturuldu ve Sİ sonrası 7 gün boyunca reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon başladıktan 1 saat sonra günde bir kez (10 mg/kg) (149) olmak üzere 7 gün boyunca intraperitoneal olarak melatonin enjekte edildi. Ayrıca Sİ'den 24 saat sonra 7 gün boyunca nörolojik defisit skorlama ve davranış testleri yaptırıldı.



Şekil 3.1. Deney dizaynı

### 3.4. Melatonin Çözeltisinin Hazırlanması

Melatonin uygulanma öncesinde % 0.5 etanol içerisinde çözdürülerek serum fizyolojik ile uygun konsantrasyona ayarlandı (10 mg/kg). Hazırlanan bu çözelti içerisindeki etanolün final konsantrasyonunun % 0.5'den fazla olmamasına dikkat edildi (150, 151).

### 3.5. Hayvanların Anesteziye Alınması ve Cerrahi Operasyonlara Hazırlanması

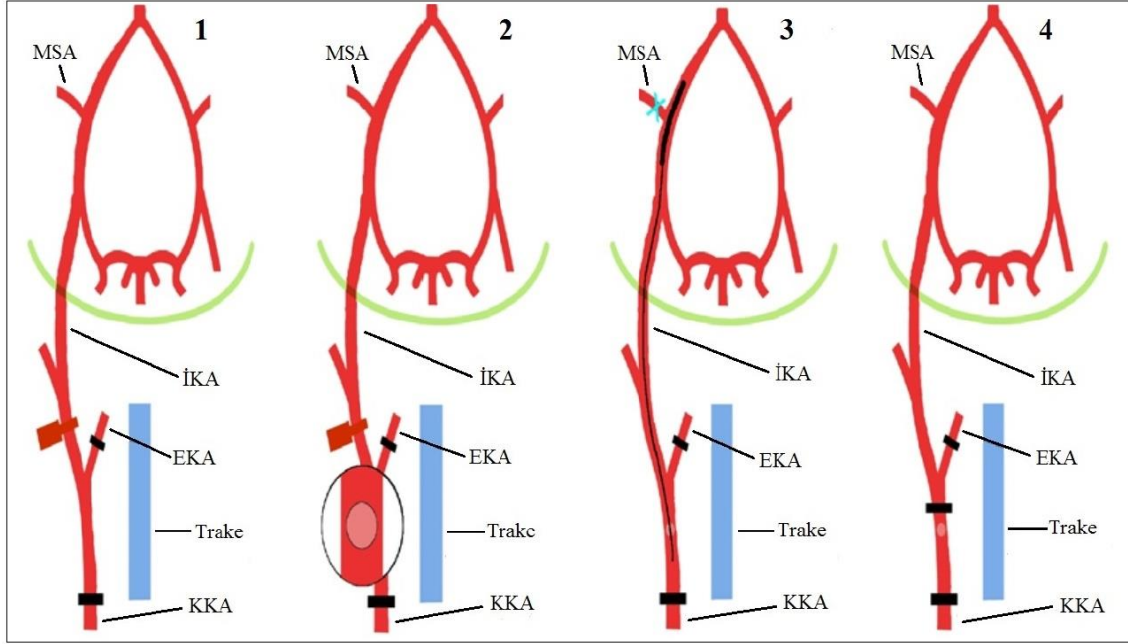
Sıçanlar spontan solunumları ve göz kırpma refleksi korunacak şekilde intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya), 8 mg/kg ksilazin (Bioveta PLC, Çek Cumhuriyeti) ile anestezi altına alındı (152). Spontan hareketleri kaybolan sıçanların anesteziye girip girmediği parmak kıstırma yanıtları ve fizyolojik yanıtın izlenmesi sonunda saptandı. Anesteziye giren hayvanların 3X4 cm<sup>2</sup>'lik boyun bölgesi tıraş edilerek cilt görünür hale getirildi. Ortaya çıkarılan cilt bölgesi povidon iyot solüsyonu ve %70'lik etanol ile cerrahi olarak dezenfekte edildi. Cerrahi alan dışında kalan bölgeler spanç ile örtüldükten sonra cerrahi işlemlere başlandı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Hayvanların cerrahi operasyona hazırlanması

### 3.6. Sham Serebral İskemi ve Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması

Hayvanların cerrahi operasyonlarına ağrıya yanıtızsız olacak ve deney sırasında spontan solunumlarına devam edecek şekilde anestezi işlemi uygulandıktan sonra başlandı. Deney sırasında hayvanların vücut sıcaklıkları kontrol edilerek 36.5-37 °C’de sabit tutuldu. Fokal serebral iskemi modeli Koizumi intraluminal filaman tekniği kullanılarak sağ middle serebral arterin oklüzyonu (MSAO) ile oluşturuldu (Şekil 3.3).

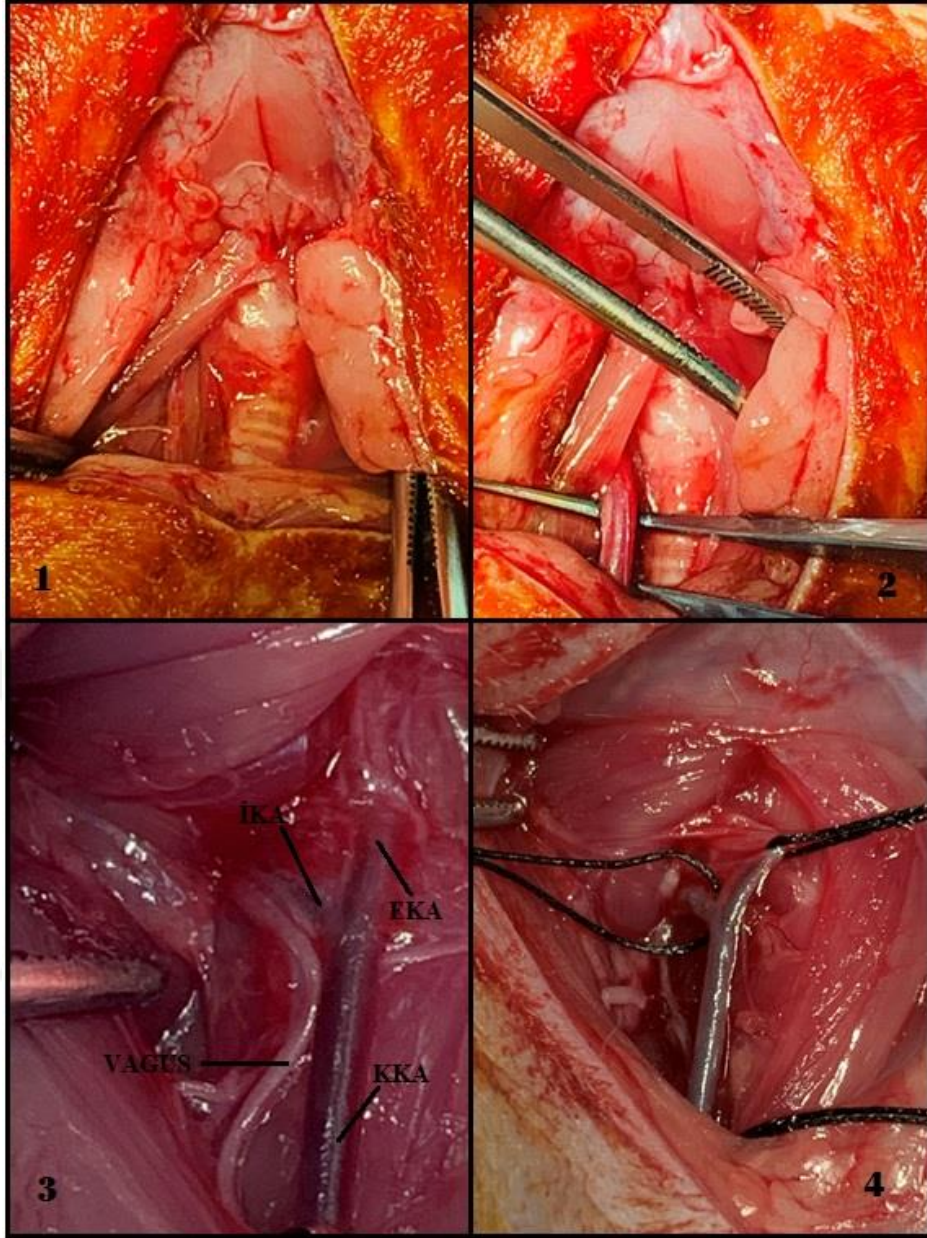


**Şekil 3.3.** Middle serebral arterin tıkanmasının şematik görüntüsü (153)

(MSA: Middle serebral arter, İKA: İnternal karotid arter, EKA: Eksternal karotid arter, KKA: Kommon karotid arter)

Koizumi tekniği ile serebral iskemi modeli oluşturulurken, hayvanlar sırtüstü pozisyonda yatırılarak orta hattın 5 mm sağına 3 cm uzunluğunda vertikal bir cilt insizyonu yapılarak süperfisyel fasyaya ulaşıldı. Süperfisyel fasyanın altında lateralde glandüler doku ve medialde de bir üçgen oluşturan üç adet kas (sternohyoid, digastrik, sternomastoid) saptanarak bu üçgenin içerisine doğru keskin diseksiyon ile derinleştirildi. Bu üçgenin derininde sağ arteria karotis kommunis, karotid bifukasyonu, eksternal karotid arter ve internal karotid arter çevre dokulardan diseke edilerek ortaya çıkarıldı. Arteria karotis kommunis ve internal karotid arterin lateralinde devam etmekte olan nervus vagus tanınarak hiç zarar verilmeden hassas ve keskin bir diseksiyon ile ayrıldı (Şekil 3.4.).

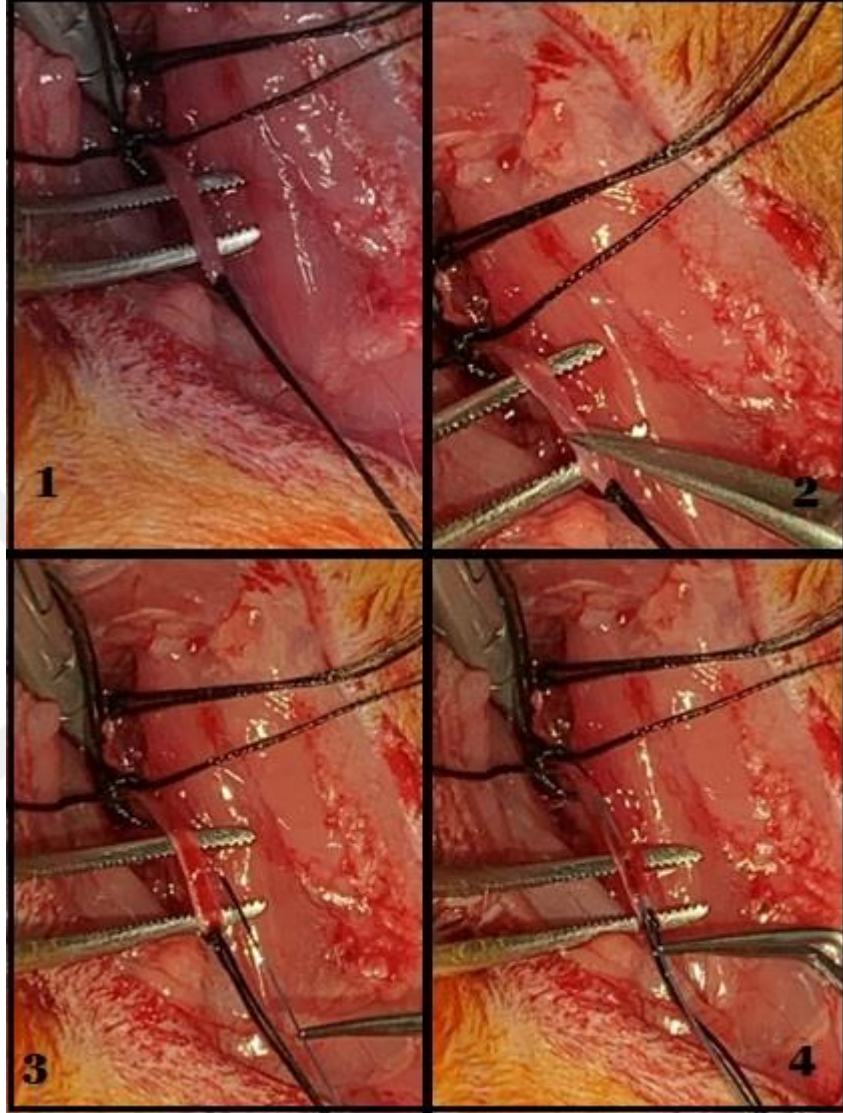




**Şekil 3.4.** Karotid arterlerin ve nervus vagusun izole edilmesi  
(İKA: İnternal karotid arter, EKA: Eksternal karotid arter, KKA: Kommon karotid arter)

Eksternal karotid arter distalden ve arteria karotis kommunis proksimalden 5-0 ipek suture ile bağlandı. İnternal karotid artere geçici olarak bir mikrovasküler klemp yerleştirilerek, internal ve eksternal bifurkasyonun 1 mm proksimalinden sağ arteria karotis kommunis'e bir insizyon yapıldı. Middle serebral arter oklüzyonu için ucu silikon sertleştirici karışım ile kütleştirilip kalınlaştırılmış olan yaklaşık 0.39 mm çapındaki 4/0 naylon filaman bu insizyon bölgesinden damar içine sokularak internal karotid artere doğru ilerletildi. Daha sonra internal karotid artere yerleştirilen klemp kaldırılarak naylon

filaman middle serebral artere doğru zayıf bir direnç hissedilene kadar (yaklaşık 18-20 mm) ilerletildi (Şekil 3.5.).



**Şekil 3.5.** Serebral iskemi modelinin oluşturulması

(İnternal karotid artere klemp yapılması 1, kommon karotid artere mini insizyon yapılması 2, kommon karotid artere yapılan mini insizyona ipin yerleştirilmesi 3, kommon karotid arterden ipin middle serebral artere doğru ilerletilmesi 4)

Naylon filaman 90 dk boyunca bekletilerek iskemi oluşturulmuş ve daha sonra filaman geri çekilerek reperfüzyon sağlandı (Şekil 3.6).





**Şekil 3.6.** Serebral iskemi ve reperfüzyon süreci

90 dakika sonunda hayvanların uyanması sırasında sol ön ayaklarındaki fleksiyon ve kontralateral kendi etrafında dönme hareketleri gözlenerek iskemi oluştuğundan emin olunmasının ardından tekrardan hafif bir anestezi sağlandı ve cerrahi insizyon bölgesi tekrar dezenfekte edildi. Hayvanlar anestezi altındayken dikişler atıldı ve uyandıklarında kafeslerine alındı. En son olarak hayvanlara intraperitoneal olarak verilen 10 cc % 0.9'luk serum fizyolojik solüsyon ile de hidrasyon sağlanarak cerrahi işleme son verildi (149, 154, 155) (Şekil 3.7.).



**Şekil 3.7.** Cerrahi operasyona son verilmesi

### **3.7. Nörolojik Defisit Skorlama ve Davranış Testleri**

#### **3.7.1. Nörolojik Defisit Skorlama**

Nörolojik defisit skorlama testi, Bederson skorlama metodunun modifiye edilmiş hali ile gerçekleştirildi. Hayvanların nörolojik muayeneleri reperfüzyon sağlanmaya başladıktan 24 saat sonra 7 gün boyunca her gün aynı saatlerde gruplardaki tüm hayvanlara uygulandı. Modifiye edilmiş Bederson skorlama metoduna göre,

0 puan = Normal nörolojik muayene,

1 puan = Kuyruğundan tutulup kaldırıldığında kontralateral ön ayakta fleksiyon,

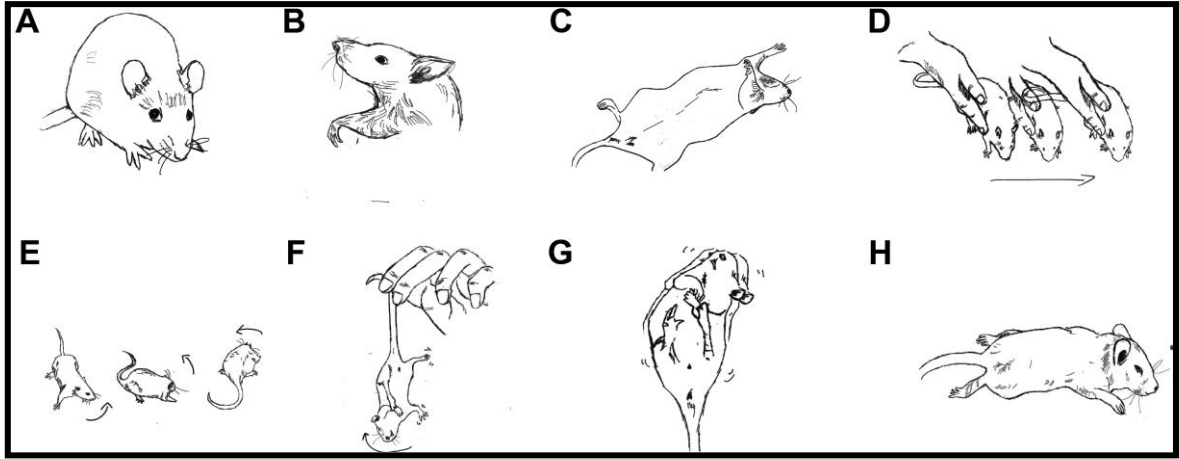
2 puan = Kontralateral ön ayakta fleksiyon ve lateral itmeye karşı azalmış direnç,

3 puan = Yürürken kontralateral yöne doğru daire çizme,

4 puan = Kuyruğundan tutulup kaldırıldığında dönme hareketi veya nöbet aktivitesi,

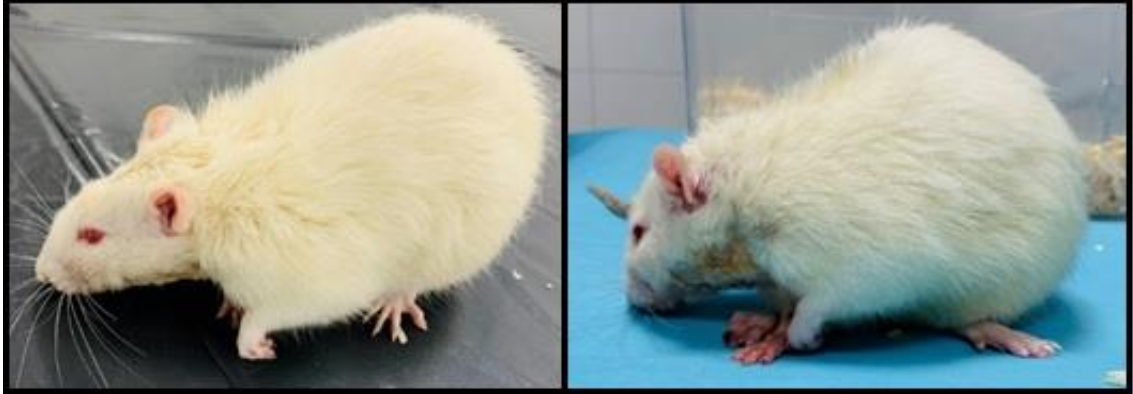
5 puan = Spontan olarak yürüyememe (156, 157) (Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.).

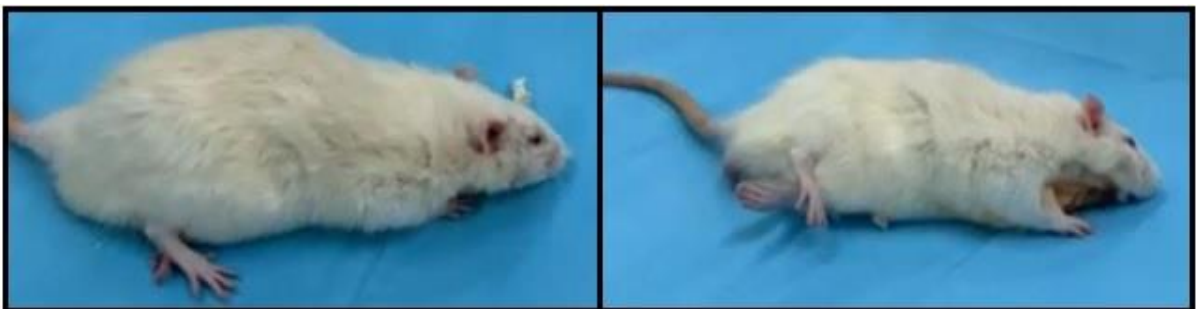




**Şekil 3.8.** Nörolojik defisit skoru (156)

(Defisit bulunmayan sıçanlar **0** (A), ön bacağın fleksiyonunun bileğini etkileyen sıçanlar (B) veya omzunu etkileyen sıçanlar (C) **1**, ön ayağın fleksiyonu ve lateral itmeye karşı direnci azalmış sıçanlar **2** (D), defisit olan tarafına tek yönlü daire çizen sıçanlar **3** (E), uzunlamasına eğirme yapan sıçanlar (F) veya nöbet aktivitesi (G) **4**, hareket etmeyen sıçanlar **5** (H) olarak skorlandı.)





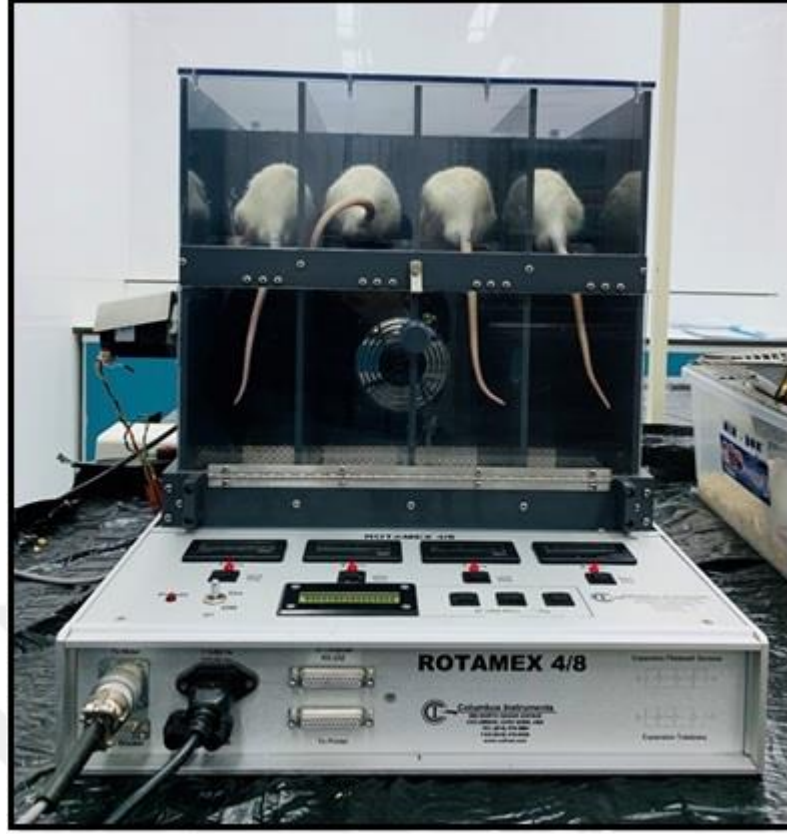


**Şekil 3.9.** Hayvanların Nörolojik Muayeneleri

### 3.7.2. Rotarod Testi

Rotarod cihazı ayarlanabilir bir hızda kendi etrafında dönen 4 kulvarlı bir çubuktan oluşmaktadır. Bu testin esası artan hızda dönen bir çubuk üzerinde hayvanın düşmeden kalabildiği sürenin ölçülmesidir. Hayvanlara inme sonrası uygulanan rotarod testi ile hayvanların direnme gücü, dengeli ve koordineli hareketleri değerlendirildi. Rotarod cihazına sıçanların alışabilmesi için serebral iskemi oluşturulmadan önce 3 gün boyunca 15'er dakika 5 rpm'de ön eğitim yaptırıldı (Testler, kontrol grubundaki hayvanlara da diğer gruplarla eş zamanlı uygulandı) (158). Testler reperfüzyon sağlanmaya başladıktan 24 saat sonra 7 gün boyunca her gün aynı saatlerde gruplardaki tüm hayvanlar bireysel bölmelerine dönen çubuğun tersi yönünde yerleştirildikten sonra rotarod cihazı 5 dakika içerisinde 4 rpm'den 40 rpm'ye çıkarılarak sıçanların cihazın (çubuğun) üzerinde kalabildiği süre ölçüldü. Testlerin deneme süresi 5 dakikayı geçmeyecek ve her deneme arasında 5 dakika ara verilip hayvanlar dinlendirilecek şekilde ayarlandı. Her bir hayvan için deney 5 kez tekrarlanmış ve tüm denemelerin ortalaması alınarak ve gün-gün karşılaştırıldı (159) (Şekil 3.10.).





Şekil 3.10. Sıçanlara rotarod testinin yaptırılması

### 3.7.3. Yapışkan Çıkarma Testi

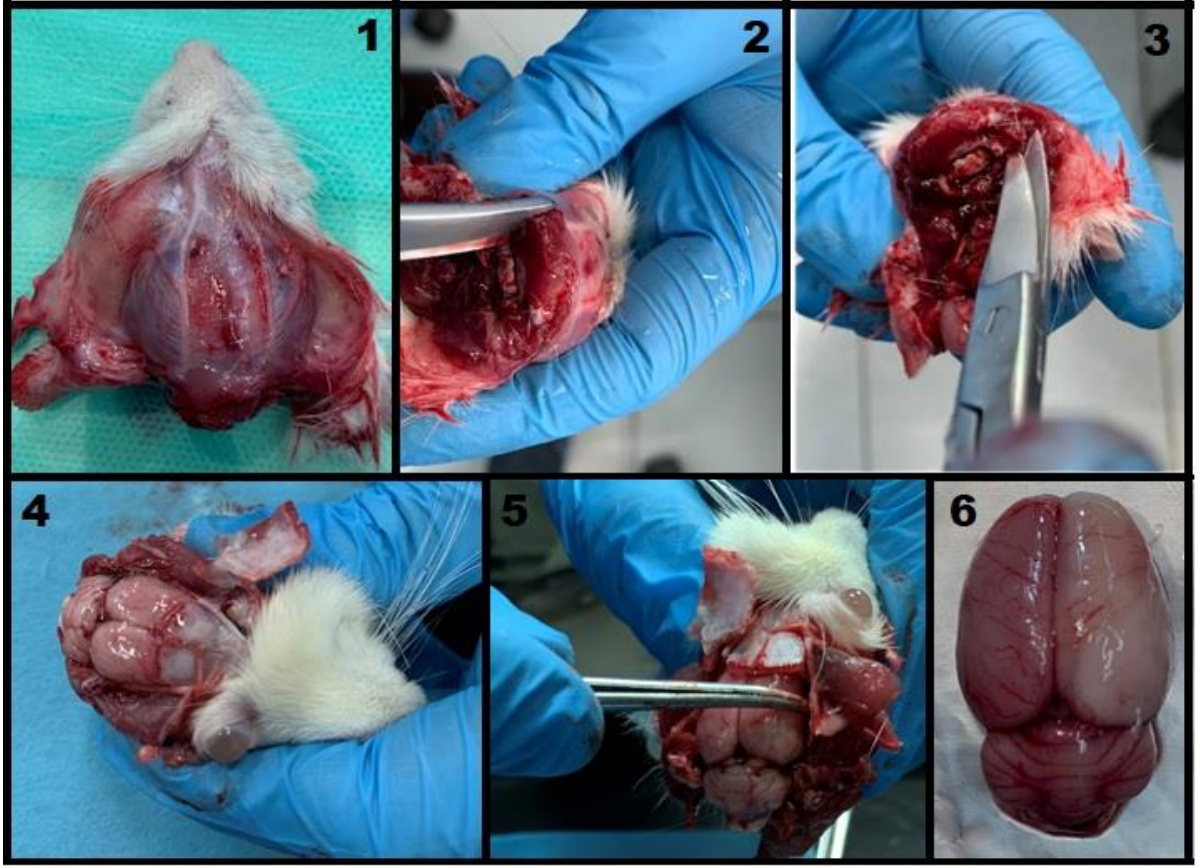
Somatosensoriyel ihmali ölçen yapışkan çıkarma testi, inme sonrasında hayvanların duyuşal durumlarını incelemek için kullanılan bir testtir. Bu testte hayvanın her iki ön ayağının distal radial yüzüne konan eşit boyutlardaki (1x1 cm<sup>2</sup>) küçük yapışkan etiketleri kendisinin yaptığı temizleme hareketiyle çıkartması beklenmektedir. Yapışkanlar ön ayaklara konulduktan sonra denek bu yapışkanları çıkartana kadar geçen süre saniye cinsinden ölçüldü. Gruplardaki tüm hayvanlara serebral iskemiden önce 3 gün süreyle günde 3 kez 5 dakika aralıklarla test uygulandı. Yapışkan çıkarma testi reperfüzyon sağlanmaya başladıktan 24 saat sonra 7 gün boyunca her gün aynı saatlerde günde 3 kez 5 dakika aralıklarla gruplardaki tüm hayvanlara uygulandı. Hayvanların her iki ayağındaki yapışkanı çıkartabildiği süre kaydedilerek ve her bir denemenin süresi en fazla 120 saniye ile sınırlandırıldı. Her bir hayvan için tüm denemelerin ortalaması alınarak ve gün-gün karşılaştırıldı (160-162) (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. Sıçanlara yapışkan çıkarma testinin yaptırılması

### 3.8. Hayvanların Dekapite Edilmesi ve Beyin Dokularının Alınması

Hayvanlar yedi günlük nörolojik defisit skora ve davranış testlerinden sonra dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Dekapitasyon işlemi gerçekleştirildikten hemen sonra *foramen magnum*'u ortaya çıkarmak için kafatası üzerindeki deri ve kas tabakaları makasla kesildi. Makasın bir ucu *foramen magnum*'un içinden sokularak (sağlı ve sollu olarak) beyine dokunulmadan dikkatlice kafatası kemiği kesildi. Kesilen kemik bir pens yardımıyla kaldırılarak yerinden çıkarıldı. Daha sonra beyin, *foramen magnum*'un alt tarafından ucu küt bir pens ile optik ve trigeminal sinir bağlantıları kesilerek bulunduğu yerden çıkartıldı. Beyin dokuları Şekil 3.12.'de gösterildiği gibi hızlıca çıkarıldı ve analizlere kadar uygun koşullarda muhafaza edildi.



**Şekil 3.12.** Beyin dokusunun çıkarılması

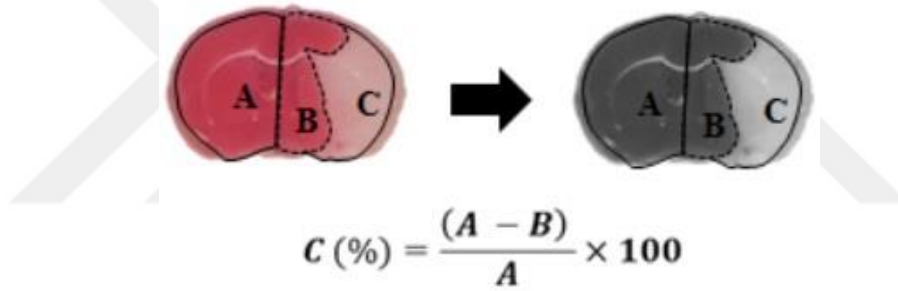
(Foramen magnum'u açığa çıkarmak için kafatası üzerindeki deri ve kas tabakalarının kesilmesi (1), kafatası kemiğinin kesilmesi (2 ve 3), kesilen kemiğin yerinden çıkarılması (4), optik ve trigeminal sinirler kesilerek beyin bulunduğu yerden çıkarılması (5))

### **3.9. Analizlerin Yapılması**

#### **3.9.1. Beyin Dokularında TTC Boyama İle İnfarkt Alanının Gösterilmesi**

2,3,5-trifenil tetrazolium klorür (TTC), beyaz kristal yapıda ve dehidrogenazların substratı olan bir redoks indikatörüdür. TTC, dokuda NADH, dehidrogenazlar ve diaforazlar bulunduğunda formazan pigmentlerini indirgeyen bir kimyasal maddedir. Suda kolayca çözünebilen ve normalde renksiz bir kimyasal olan TTC, canlı dokuların mitokondrilerinde bir proton alıcısı gibi davranır ve süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından 1,3,5-trifenil formazan'a indirgenerek dokunun kırmızı-pembe renkli görüntülenmesini sağlar. Canlılık faaliyetlerini kaybetmiş dokularda ise dehidrogenaz enzimlerinin bozulması nedeniyle TTC indirgenemez ve doku boyanamayarak beyaz-kirli beyaz renkli olarak kalır. Bu amaçla canlı ve cansız dokuların ayrımının yapılmasında TTC boyama çok sık kullanılmaktadır (163, 164).

Serebral iskemi sonrasında reperfüzyon süresini tamamlayan sıçanlar dekapite edilip beyinleri hızla çıkartılarak kuru buz üzerinde donduruldu. Daha sonra donmuş beyin dokularından bregmanın +4 mm (anteriyor) ve -6 mm (posteriyor) seviyelerinden 2 mm aralıklarla 6 dilim koronal kesit alındı. Alınan beyin dilimleri içerisinde Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) ile hazırlanmış %1'lik TTC bulunan petri kabı içerisine konuldu. Boyama işlemi için kesitler karanlıkta 37 °C'de 10 dk boyunca etüvde inkübe edilmiştir ve beyin dilimlerinin TTC ile daha homojen bir şekilde boyanabilmesi için hafice karıştırıldı. TTC ile boyama işleminden sonra beyin dilimleri içerisinde %4'lük formalin bulunan başka bir petri kabına alınıp 12 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra boyanmış kesitlerin fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı ve boyanmış kesitlerdeki infarkt alanı ve infarkt olmayan alan sınırları Image J yazılımı kullanılarak belirlendi. İnfarkt alanının hesaplanması Şekil 3.13'te belirtilen formülle yapıldı (20, 149, 165).



Şekil 3.13. İnfarkt alanının hesaplanması (166)

### 3.9.2. Western Blot Yöntemi İle Beclin-1, LC3-I/II ve p62 Proteinlerinin Seviyelerinin Belirlenmesi

#### 3.9.2.1. Protein İzolasyonu

-80 °C dondurucuda saklanan beyin dokuları çalışmaya başlanacağı zaman çıkartıldı ve oda ısısına geldikten sonra hassas terazide tartılarak 100 mg olacak şekilde her bir hayvan için beyin dokusu alındı. Bu dokulara 10 katı oranında RIPA Lysis Buffer (ab156034, Abcam; İngiltere) ve proteaz inhibitör kokteyl (ab201111, Abcam; İngiltere) çözeltisi eklendi ve doku homojenizatörü kullanılarak dokular homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi süresince numuneler buz üzerinde tutularak soğuk ortam sağlandı ve protein yıkımı engellendi. Daha sonra homojenatlar 15 000 rpm'de +4 °C'de



5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısımları alınarak Western Blot analizlerinde kullanıldı.

### 3.9.2.2. Protein Miktar Tayini

Doku homojenatlarının total protein miktarı tayini BCA analiz kiti kullanılarak yapılmıştır. BCA (Bikinkoninik Asit) analiz yöntemi, alkali ortamda proteinlerin  $Cu^{+2}$ 'yi  $Cu^{+1}$ 'e indirgemesi ve biskinonik asitle mor renk oluşması esasına dayanır. BCA protein konsantrasyonu, ticari kit (ab102536, Abcam; İngiltere,) kullanılarak ve firmanın önerdiği şekilde 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

BCA yöntemi ile protein miktar analizi için farklı BSA (Bovine Serum Albümin) standart çözeltileri hazırlandı. Kitte bulunan Solüsyon A ve Solüsyon B 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlandı. BSA standartları ile birlikte protein konsantrasyonu belirlenmek istenen homojenatlardan 50 µl çift tekrar olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına eklendi. Örneklerin üzerine 100 µl çalışma çözeltisi ilave edildi. Mikrolaka kapatılarak hafifçe çalkalandı ve 37 °C su banyosunda 30 dk inkübe edildi. Bu sırada yeşil renk olan çalışma solüsyonu protein varlığında zamanla mora dönmektedir. Bu renk değişimi absorbansı 562 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucuda (Bio-tek, ABD) ölçüldü ve BSA standartlarının absorbanslarından yararlanılarak konsantrasyon-absorbans grafiği çizilerek grafik denklemi belirlendi. Örneklerin absorbansları grafik denklemine yerleştirildi ve her bir örnek için total protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplandı.

### 3.9.2.3. SDS Jelin Hazırlanması

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) jelin hazırlanması için Tablo 3.1'de belirtilen reaktifler uygun hacimlerde karıştırıldı. TEMED ve APS eklendiğinde jelin donması başladığı için bu reaktifler karışıma en son eklendi. Jel karışımı hava kabarcıklarının oluşmamasına dikkat edilerek pipet ile camların arasına döküldü. Jelin üst kısmının havayla temasını engellemek için üstüne izopropanol eklendi. 30-60 dk jelin donması için beklendikten sonra üst kısımdaki propanol döküldü ve kağıt havlu ile kurulandı (Şekil 3.14.).



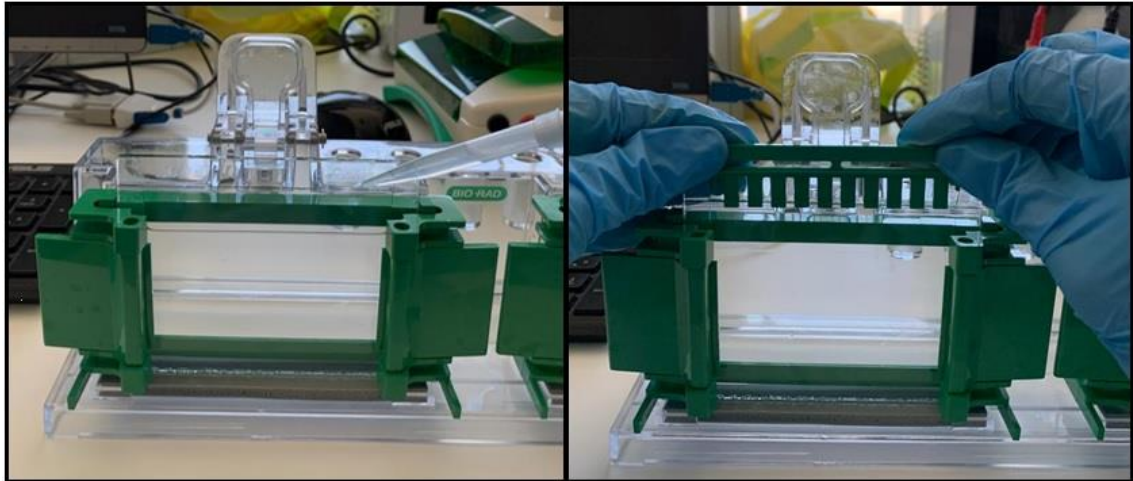
**Tablo 3.1.** % 10'luk running jelin hazırlanması

| <b>Kullanılan Reaktifler</b>              | <b>Miktar</b> |
|---|---------------|
| 1.5 M Tris HCl (pH 8.8)                   | 1250 µl       |
| ddH <sub>2</sub> O                        | 2000 µl       |
| % 40'luk Akrilamid/Bis-Akrilamid Karışımı | 1670 µl       |
| % 20'lik SDS                              | 25 µl         |
| %10'luk APS (Taze hazırlanmalı)           | 25 µl         |
| TEMED                                     | 2.5 µl        |

Tablo 3.2.'de belirtilen reaktiflerle belirtilen miktarlarda stacking jel hazırlandı ve hazırlanan jel kısa camın üzerine çıkacak şekilde döküldü. Ardından camların arasına her bir kuyucuğu 50 µL hacimli 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Polimerizasyon işlemi için jeller 30 dk stantta bekletildi (Şekil 3.14.).

**Tablo 3.2.** % 5'lik stacking jelin hazırlanması

| <b>Kullanılan Reaktifler</b>              | <b>Miktar</b> |
|---|---------------|
| 1 M Tris HCl (pH 6.8)                     | 375 µl        |
| ddH <sub>2</sub> O                        | 2088 µl       |
| % 30'luk Akrilamid/Bis-Akrilamid Karışımı | 506 µl        |
| % 20'lik SDS                              | 15 µl         |
| %10'luk APS (Taze hazırlanmalı)           | 15 µl         |
| TEMED                                     | 1.5 µl        |

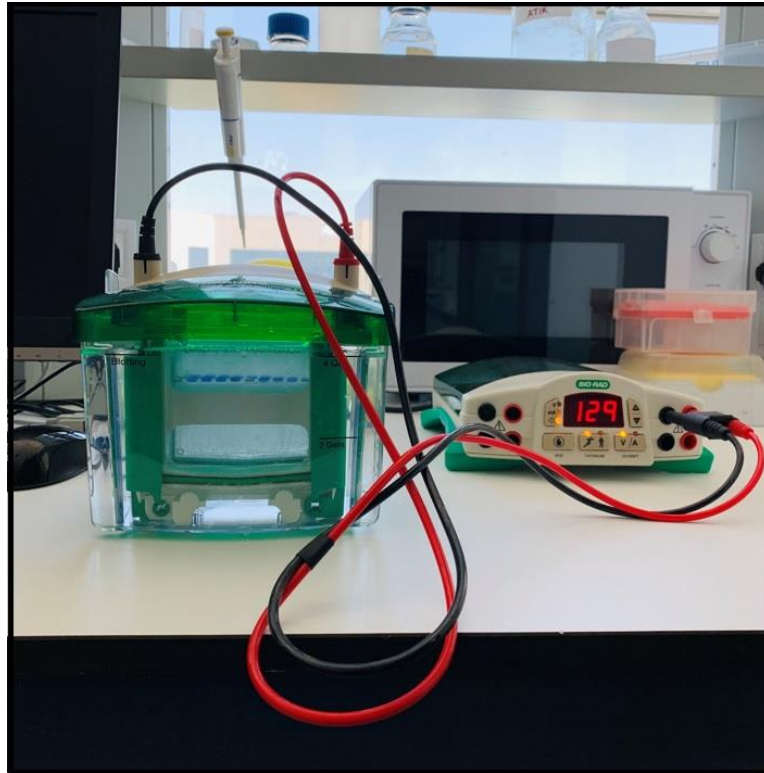


**Şekil 3.14.** Jelin hazırlanması

### 3.9.2.4. Proteinlerin Elektroferez İşlemi

Jele yüklenecek örneklerin her birinden 40 µg olacak şekilde hesaplanarak alındı. Hesaplanan hacimde protein üzerine örnek yükleme tamponu (% 0.05 Bromphenol blue, % 30 gliserol, % 10 SDS, 0.25 M Tris-HCl, %5 β-merkaptolanol) ilave edildi. β-merkaptolanol tampon içerisine örnek yükleneceği zaman ilave edildi. Protein örnekleri SDS'in proteinleri denatüre etmesi (SDS deterjanı proteinlere bağlanarak proteinleri negatif yüklü hale getirir) için 10 dk 95 °C'de inkübe edildi.

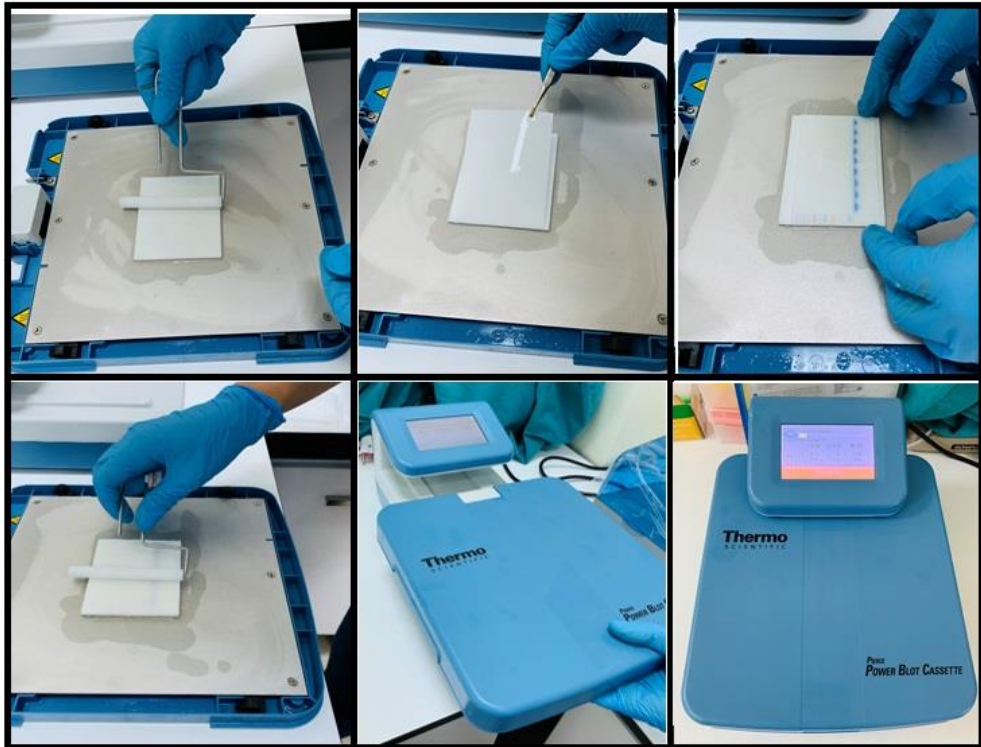
Ardından jeller elektroferez tankına yerleştirildi ve jeller arasına yürütme tamponu dökülerek sızdırma kontrolü yapıldı. Jellerin tarakları çıkarıldı ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde yürütme tamponu ilave edildi. Her jelin ilk kuyucuğuna 3 µL molekül ağırlık markerı (ab116029; Abcam, İngiltere) ve diğer kuyucuklara örnekler yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tank gerekli seviyeye kadar yürütme tamponu ile dolduruldu. Tank güç kaynağına bağlandı ve 100 voltta 130 dk ayarlanarak elektroferez başlatıldı. Yükleme tamponu ile mavi renk alan örneklerin elektroferez sırasında jeldeki sürüklenmeleri izlendi ve uygun noktada elektroferez sonlandırıldı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Proteinlerin elektroferez işlemi

### 3.9.2.5. Blotlama İşlemi

Jeldeki örneklerin membrana transferi için poliviniliden florür (PVDF) membranlar kullanılarak yarı-kuru transfer yöntemi uygulanmıştır. Transfere başlamadan önce PVDF membranlar uygun boyutta kesildi ve yaklaşık 30 sn - 1 dk kadar metanol içerisinde ve 2 dk kadar transfer solüsyonunda bekletilerek transfere hazır hale getirildi. Elektroforez sonrasında jeller tanktan çıkarıldı ve ince bir spatula yardımıyla camlar birbirinden dikkatlice ayrılarak jeller deiyonize suyla yıkandı. Jel üzerindeki fazlalık bölgeler spatula yardımıyla kesildi. İçinde soğuk transfer tamponu bulunan bir kap içerisine transferde kullanılacak filtre kağıtları konularak ıslatıldı. Transfer kasetine sırasıyla iki adet transfer solüsyonu ile ıslatılmış transfer kağıdı yerleştirildi ve üzerinden rulo ile geçilerek aralarda oluşan hava kabarcıkları çıkartıldı. Filtre kağıtlarının üzerine PVDF membran yerleştirildi ve bir kez daha üzerinden rulo ile geçilerek düzleştirildi. PVDF membranın üzerine jel yerleştirildi ve üzerine iki adet daha filtre kağıdı konularak hava kabarcığı kalmayacak şekilde rulo ile üzerinden geçildi. Transfer kasedi kapatılarak cihaza yerleştirildi ve proteinlerin büyüklüğüne göre 25 voltta 5 dk (LC3-I/II ve kaspaz-3) veya 7 dk (Beclin-1, p62 ve  $\beta$ -Aktin) süresince transfer işlemi uygulandı (Şekil 3.16.).



Şekil 3.16. Jelden membrana transfer işlemi

### 3.9.2.6. Bloklama İşlemi

Transfer işleminin sonrasında membran, membrana geçen özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu basamakta membran oda sıcaklığında bir çalkalayıcıda % 5'lik süt tozu ile 1 saat boyunca muamele edildi (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17. Bloklama işlemi

### 3.9.2.7. Primer Antikor ile İnkübasyon

Primer antikorlar, % 0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi içinde hazırlanan % 5'lik BSA içerisinde kullanım kılavuzlarında önerilen konsantrasyonlarda hazırlandı. Membranlar primer antikorlar (Beclin-1 (2 µg/ml) katalog no: ab62557 (Abcam, İngiltere), LC3-I/II (1:500), katalog no: ab128025 (Abcam, İngiltere), p62 (2 µg/ml) katalog no: ab91526 (Abcam, İngiltere), Cleaved caspase-3 (1:500) katalog no: ab49822 (Abcam, İngiltere), β-Aktin (1:1000), katalog no: ab8226 (Abcam, İngiltere)) ile +4 °C'de



karıştırıcıda bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar 3 kez 10 dk TBS-T çözeltisi ile yıkandı (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. Primer antikor ile inkübasyon

### 3.9.2.8. Sekonder Antikor ile İnkübasyon ve Membranın görüntülenmesi

Sekonder antikor çözeltisi % 0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi içinde hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde hazırlandı. Primer antikorla inkübasyondan sonra membranlar oda sıcaklığında 3 kez 15 dk TBS-T çözeltisi ile yıkandı. Yıkamanın ardından membranlar Beclin-1, LC3-I/II, p62 ve caspase-3 için Anti-rabbit IgG HRP-linked sekonder antikor (1:2000) katalog no: ab205718 (Abcam, İngiltere) ve  $\beta$ -Aktin için Anti-mouse IgG HRP-linked sekonder antikor (1:2000) katalog no: ab6728 (Abcam, İngiltere) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.19). Sekonder antikor inkübasyonu tamamlandıktan sonra membranlar 3 kez 10 dk TBS-T çözeltisi ile yıkandı (Şekil 3.19.).



**Şekil 3.19.** Sekonder antikor ile inkübasyon

Yıkamanın ardından membran temiz bir pens yardımıyla ışık geçirmeyen bir kaba alındı ve Western ECL Substrate solüsyonu (ECL solüsyonlarının 1:1 oranındaki karışımı) (Thermo Scientific, ABD, kat. no:32106) ile muamele edildi. Membran üzerindeki protein bantları Sygene G:BOX görüntüleme cihazıyla görüntülendi (Şekil 3.20). Protein bantları daha sonra GeneTools software (Version 4.03.05, Sygene, Cambridge, İngiltere), manual band quantification programı ile hesaplandı (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20. Membranın görüntülenmesi

### 3.9.3. İmmünofloresan Yöntemi İle Beclin-1, LC3 ve p62 Proteinlerinin Seviyelerinin Belirlenmesi

Dekapite edilen hayvanların alınan beyin dokuları immünofloresan incelemeler için kesitler alınana kadar -80 °C’de saklandı. Kesitler alınacağı zaman dokular -80 °C’den çıkartılıp -20 °C’de bir gece bekletildi. -20 °C’de dondurulan dokulardan cryostat microtome cihazı (Leica CM1850, Almanya) ile immünofloresan incelemeler için bregma seviyesinden 8 µm kalınlığında koronal kesitler alındı. Alınan kesitler pozitif şarjlı lamlara yapıştırılarak oda sıcaklığında kuruması beklenildi ve kesitler oda ısısında 1-2 saat bekletildikten sonra +4 °C’de bir gece bekletildi.

Boyama protokolüne başlanacağı zaman kesitler +4 °C’den çıkartılıp 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra fiksasyon için kesitler 15 dk boyunca -20 °C’deki aseton içerisinde bekletildi. Asetondan çıkarılan kesitler 5 dk aralıklarla +4 °C’deki PBS tamponu ile 2 kez yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra kesitler %1’lik Bovine Serum Albumin (BSA) ile 30 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası lam üzerindeki doku kesitlerinin etrafı hidrofobik kalem pap-pen kalem ile çizilerek üzerlerine primer antikor Beclin-1 (20 µg/ml) katalog no: ab62557 (Abcam, İngiltere), LC3-I/II (2 µg/ml), katalog no: ab128025 (Abcam, İngiltere), p62 (20 µg/ml) katalog no: ab91526 (Abcam, İngiltere), Cleaved caspase-3 (1:500) katalog no: ab49822 (Abcam,

İngiltere) eklenerek +4 °C’de bir gece boyunca inkübe edildi. Antikorların spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek için kesitler PBS tamponu ile 5 dk aralıklarla 3 kez yıkandı. İmmünofloresan ışımayı tespit etmek için kesitler oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 (1:500) katalog no: ab150077 (Abcam, İngiltere) ile inkübe edildi. Sekonder antikorun inkübasyonu sonrasında kesitler PBS tamponu ile 5 dk aralıklarla 3 kez daha yıkandı. Yıkama işleminden sonra çekirdek boyası DAPI (Diamidin-2-Fenilindol Dihidroklorid) katalog no: ab104139 (Abcam, İngiltere) ile 2 dk muamele edildi. Kesitler lam üzerinde karanlıkta kuruduktan sonra Gel/Mount akışkan koruyucu madde ile kaplanarak lamelle kapatıldı ve analizler yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

Kesitlerin Şekil 3.21’ de gösterilen alanlarından Beclin-1, LC3, p62 ve cleaved caspase-3 proteinlerinin immünofloresan incelemeleri gerçekleştirildi.



**Şekil 3.21.** Kesitlerde immünofloresan incelemelerin gerçekleştirildiği alan

#### **3.9.4. Transmisyon Elektron Mikroskop Yöntemi İle Beyin Dokularının İncelenmesi**

Transmisyon elektron mikroskopik inceleme için kullanılan solüsyonlar ve miktarları Tablo 3.3.’te verilmiştir. Elektron mikroskopik inceleme için doku takip prosedürü Tablo 3.4.’te ve elektron mikroskopik inceleme için grid boyama prosedürü Tablo 3.5.’te verilmiştir.

Transmisyon elektron mikroskopik inceleme için alınan yaklaşık 1 mm<sup>3</sup> hacmindeki beyin dokuları % 2.5’lik glutaraldehit ile +4 °C’de 12 saat süresince fikse edildi. Fiksasyon sonrasında beyin dokuları PBS ile yıkanmış ve 2 saat süresince % 1’lik osmium tetroksit ile postfiksasyon uygulandı. Daha sonra, doku örnekleri aseton serilerinde (% 30-100) dehidratasyon işlemini takiben araldit CY212 içerisinde kapsül



bloklara gömülerek 45 °C’de 4 saat 70 °C’de 24 saat polimerizasyon için inkübe edildi. Hazırlanan kapsül araldit bloklar trimer cihazında (Leica EM Trim, Almanya) trimlendikten sonra ultramikrotom (Leica Ultracut R, Almanya) yardımıyla 80 nm kalınlığında beyin kesitleri alındı ve bakır gridler üzerine yerleştirildi. Daha sonra kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanarak Zeiss Libra 120 transmisyon elektron mikroskobu (Zeiss, Almanya) ile incelenerek fotoğraflar alındı.

**Tablo 3.3.** Elektron mikroskopik takip basamaklarında kullanılan solüsyonlar

|   |         |
|---|---------|
| <b>Fosfat Tamponu (PBS)</b>                                       |         |
| 0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3.56 g+100 ml distile su) | 38 ml   |
| 0.2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3.12 g+100 ml distile su) | 12 ml   |
| Deiyonize su  | 50 ml   |
| Toplam  | 100 ml  |
| <b>%2.5 Gluteraldehit</b>   |         |
| 0.2 M fosfat tamponu  | 50 ml   |
| % 25 Gluteraldehit  | 12 ml   |
| Deiyonize   | 38 ml   |
| Toplam  | 100 ml  |
| <b>%1 Osmium Tetraoksit</b>                                       |         |
| % 4 Osmium tetraoksit   | 5 ml    |
| 0.2 M fosfat tamponu  | 10 ml   |
| Deiyonize su  | 5 ml    |
| Toplam  | 20 ml   |
| <b>Araldit</b>  |         |
| DDSA  | 20 ml   |
| Araldit CY212   | 20 ml   |
| BDMA  | 0.8 ml  |
| Toplam  | 40.8 ml |
| <b>Uranil Asetat Boyası</b>                                       |         |
| Metil alkol   | 80 ml   |
| Uranil Asetat   | 2 g     |
| Deiyonize su  | 20 ml   |
| <b>Kurşun Sitrat Boyası</b>                                       |         |
| Kurşun sitrat   | 0.266 g |
| Trisodyum sitrat  | 0.352 g |
| 1 M sodyum hidroksit  | 1.6 ml  |
| Deiyonize su  | 8.4 ml  |

**Tablo 3.4.** Elektron mikroskop doku takip prosedürü

| <b>EM doku takibi prosedürü</b> |                       |                  |
|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| 1.                              | Gluteraldehit         | 2 saat, +4 °C    |
| 2.                              | PBS                   | 2 dk x 3, 20 °C  |
| 3.                              | Osmium tetraoksit % 1 | 1,5 saat, 20 0C  |
| 4.                              | PBS                   | 2 dk x 4, +20 °C |
| 5.                              | Aseton % 30           | 5 dk, 20 °C      |
| 6.                              | Aseton % 50           | 5 dk, 20 °C      |
| 7.                              | Aseton % 70           | 5 dk, 20 °C      |
| 8.                              | Aseton % 90           | 5 dk x 2, 20 °C  |
| 9.                              | Aseton % 100          | 5 dk x 2, 20 °C  |
| 10.                             | Araldit % 50          | 30 dk, 37 °C     |
| 11.                             | Araldit % 75          | 30 dk, 37 °C     |
| 12.                             | Araldit % 100         | 1 saat, 37 °C    |

**Tablo 3.5.** Elektron mikroskop grid boyama (Kontrastlama) prosedürü

| <b>EM kontrastlama prosedürü</b> |                |                            |
|----------------------------------|----------------|----------------------------|
| 1.                               | Uranil asetat  | 5 dk                       |
| 2.                               | Deiyonize su   | 1 dk                       |
| 3.                               | Kurşun Sitrata | +4 °C'de 3 dk (karanlıkta) |
| 4.                               | Deiyonize su   | 1 dk x 5                   |

### 3.10. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS statistics version 25.0 for Windows paket programı ile yapıldı. Veri analizinde öncelikle eksik ve hatalı veriler ile aşırı/aykırı değer sorunlarının önlenmesine yönelik denetimler ve düzeltme işlemleri uygulandı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Grupların nörolojik defisit skorlama, rotarod testi ve yapışkan çıkarma testinin verileri normal dağılım göstermediği için gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis H testi ile analiz edildi. Daha sonra gruplar arası karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Grup içi (gün-gün) karşılaştırmalarda

Friedman testi kullanıldı. Veriler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verildi. Grupların Western Blot ve immüno Floresan sonuçlarının değerlendirilmesinde Kruskal Wallis H testi kullanıldı. Gruplar arası anlamlı farklılık tespit edildiğinde, çoklu/ikili karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verildi.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Melatoninin Nörolojik Defisit Skoru, Rotarod ve Yapışkan Çıkarma Test Süreleri Üzerine Etkisi

#### 4.1.1. Melatoninin Nörolojik Defisit Skoru Üzerine Etkisi

Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde hayvanlara nörolojik defisit skorlama testi uygulandı. Grupların nörolojik defisit skorları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

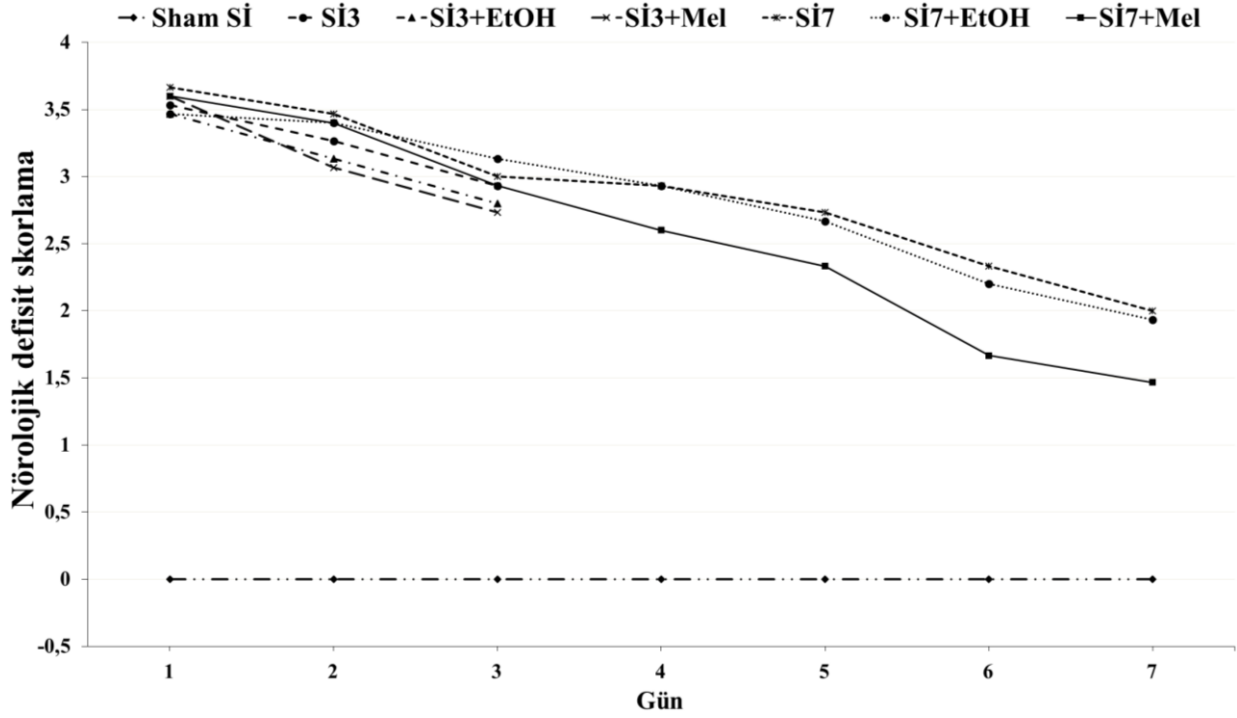
**Tablo 4.1.** Melatoninin nörolojik defisit skoru üzerine etkisi

| Gruplar  | Nörolojik Defisit Skoru |                          |                        |                        |                        |                        |                        |
|----------|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|          | 1. Gün                  | 2. Gün                   | 3. Gün                 | 4. Gün                 | 5. Gün                 | 6. Gün                 | 7. Gün                 |
| Sham Sİ  | 0 <sup>#</sup>          | 0 <sup>#</sup>           | 0 <sup>#</sup>         | 0 <sup>#</sup>         | 0 <sup>#</sup>         | 0 <sup>#</sup>         | 0 <sup>#</sup>         |
| Sİ3      | 4 (2-4) <sup>□,a</sup>  | 3 (2-4) <sup>□,b</sup>   | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | -                      | -                      | -                      | -                      |
| Sİ3+EtOH | 4 (2-4) <sup>□,a</sup>  | 3 (2-4) <sup>□,b</sup>   | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | -                      | -                      | -                      | -                      |
| Sİ3+Mel  | 4 (3-4) <sup>□,a</sup>  | 3 (2-4) <sup>□,b</sup>   | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | -                      | -                      | -                      | -                      |
| Sİ7      | 4 (3-4) <sup>□,a</sup>  | 3 (3-4) <sup>□,a,b</sup> | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | 3 (2-3) <sup>□,c</sup> | 2 (1-3) <sup>□,d</sup> | 2 (1-3) <sup>□,e</sup> |
| Sİ7+EtOH | 4 (2-4) <sup>□,a</sup>  | 3 (2-4) <sup>□,a,b</sup> | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | 3 (2-3) <sup>□,d</sup> | 2 (1-3) <sup>□,e</sup> | 2 (1-3) <sup>□,f</sup> |
| Sİ7+Mel  | 4 (3-4) <sup>□,a</sup>  | 3 (3-4) <sup>□,a,b</sup> | 3 (2-4) <sup>□,c</sup> | 3 (2-3) <sup>□,d</sup> | 3 (2-3) <sup>□,e</sup> | 2 (1-3) <sup>□,f</sup> | 1 (1-3) <sup>□,f</sup> |

(Sütunlardaki değerler gruplar arası değişimi göstermekte olup birbirinden farklı sembolü taşıyanlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. Satırlardaki değerler ardışık günlerin değişimini göstermekte olup birbirinden farklı harfi taşıyanlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n = 15$ )

Nörolojik defisit skorlaması bakımından gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, Sham Sİ grubunun nörolojik defisit skoru 1. ve 7. günler arasında tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p < 0.05$ ) ancak gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ayrıca gruplar kendi içlerinde gün-gün olarak karşılaştırıldığında, Sİ3, Sİ3+EtOH ve Sİ3+Mel gruplarının 1. ve 3. günler arasında nörolojik defisit skoru bir önceki güne istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ). Sİ7 grubunun nörolojik defisit skoru 2. ve 3.

günler, 5. ve 6. günler ve 6. ve 7. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ( $p<0.05$ ). Sİ7+EtOH grubunun nörolojik defisit skoru 2. ve 3. günler, 4. ve 5. günler, 5. ve 6. günler ve 6. ve 7. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). Sİ7+Mel grubunun nörolojik defisit skoru 2. ve 3. günler, 3. ve 4. günler, 4. ve 5. günler ve 5. ve 6. günler arasında istatistiksel olarak farklı olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).



Şekil 4.1. Melatoninin nörolojik defisit skoru üzerine etkisi

#### 4.1.2. Melatoninin Rotarod Test Süresi Üzerine Etkisi

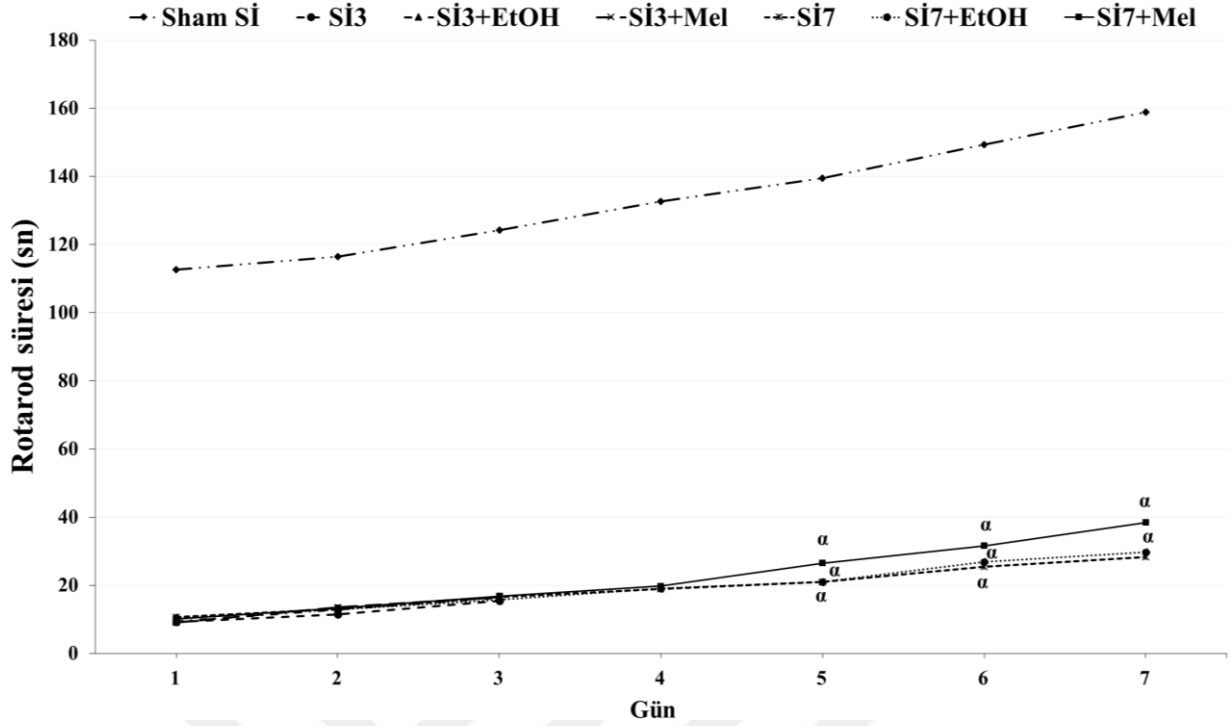
Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde hayvanların direnme gücünü, dengeli ve koordineli hareketlerini değerlendirmek için rotarod testi uygulandı. Grupların rotarod test sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Melatoninin rotarod test süresi üzerine etkisi

| Gruplar  | Rotarod Süresi (sn)         |                             |                             |                             |                             |                             |                             |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|          | 1. Gün                      | 2. Gün                      | 3. Gün                      | 4. Gün                      | 5. Gün                      | 6. Gün                      | 7. Gün                      |
| Sham Sİ  | 113 (98-126) <sup>#,a</sup> | 119(100-131) <sup>#,b</sup> | 127(111-140) <sup>#,c</sup> | 133(121-149) <sup>#,d</sup> | 138(128-155) <sup>#,e</sup> | 148(137-169) <sup>#,f</sup> | 156(142-179) <sup>#,g</sup> |
| Sİ3      | 9 (6-13) <sup>□,a</sup>     | 11 (10-15) <sup>□,b</sup>   | 14 (11-25) <sup>□,c</sup>   | -                           | -                           | -                           | -                           |
| Sİ3+EtOH | 9 (8-13) <sup>□,a</sup>     | 13 (11-15) <sup>□,b</sup>   | 15 (12-21) <sup>□,c</sup>   | -                           | -                           | -                           | -                           |
| Sİ3+Mel  | 9 (6-13) <sup>□,a</sup>     | 14 (10-16) <sup>□,b</sup>   | 16 (12-20) <sup>□,c</sup>   | -                           | -                           | -                           | -                           |
| Sİ7      | 11 (8-15) <sup>□,a</sup>    | 13 (10-18) <sup>□,b</sup>   | 16 (12-20) <sup>□,c</sup>   | 18 (16-25) <sup>□,d</sup>   | 20 (18-27) <sup>□,e</sup>   | 25 (21-34) <sup>□,f</sup>   | 28 (24-35) <sup>□,g</sup>   |
| Sİ7+EtOH | 10 (9-13) <sup>□,a</sup>    | 12 (10-19) <sup>□,b</sup>   | 15 (12-19) <sup>□,c</sup>   | 19 (17-23) <sup>□,d</sup>   | 21 (19-25) <sup>□,e</sup>   | 27 (22-35) <sup>□,f</sup>   | 29 (26-35) <sup>□,g</sup>   |
| Sİ7+Mel  | 9 (6-14) <sup>□,a</sup>     | 13 (10-16) <sup>□,b</sup>   | 16 (13-20) <sup>□,c</sup>   | 19 (17-24) <sup>□,d</sup>   | 28 (21-31) <sup>▲,e</sup>   | 31 (27-38) <sup>▲,f</sup>   | 38 (32-45) <sup>▲,g</sup>   |

(Sütunlardaki değerler gruplar arası değişimi göstermekte olup birbirinden farklı sembolü taşıyanlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. Satırlardaki değerler ardışık günlerin değişimini göstermekte olup birbirinden farklı harfi taşıyanlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n = 15$ )

Rotarod test süresi bakımından gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, Sham Sİ grubunun rotarod test süresi 1. ve 7. günler arasında tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ). Ayrıca Sİ3, Sİ3+EtOH ve Sİ3+Mel grupları rotarod test süresi bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Reperfüzyon süresi 7 gün olan gruplar karşılaştırıldığında Sİ7+Mel grubunun rotarod test süresi Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre 5., 6. ve 7. günlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Ayrıca gruplar kendi içlerinde gün-gün olarak karşılaştırıldığında bütün grupların rotarod süresi bir önceki güne istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.2.** Melatoninin rotarod test süresi üzerine etkisi

(Grafikte  $\alpha$  sembolü grupların istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=15$ )

#### 4.1.3. Melatoninin Yapışkan Çıkarma Test Süresi Üzerine Etkisi

Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanma sürecinde hayvanların somatosensoriyel ihmalini ölçen yapışkan çıkarma testi uygulandı. Grupların yapışkan çıkarma testinin sonuçları Tablo 4.3.'de verilmiştir.

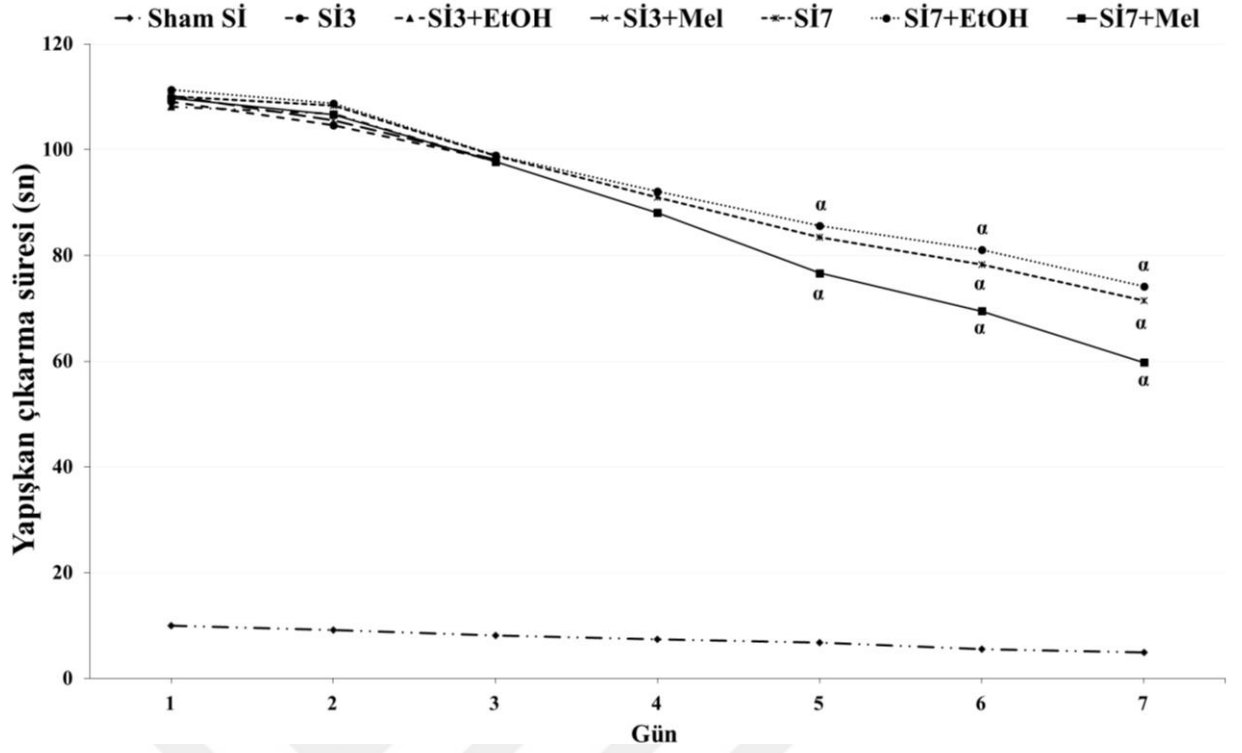
**Tablo 4.3.** Melatoninin yapışkan çıkarma test süresi üzerine etkisi

| Gruplar  | Yapışkan Çıkarma Süresi (sn) |                             |                             |                            |                             |                           |                           |
|----------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|          | 1. Gün                       | 2. Gün                      | 3. Gün                      | 4. Gün                     | 5. Gün                      | 6. Gün                    | 7. Gün                    |
| Sham Sİ  | 10 (6-15) <sup>#,a</sup>     | 9 (6-12) <sup>#,b</sup>     | 8 (5-11) <sup>#,c</sup>     | 7 (5-10) <sup>#,d</sup>    | 7 (5-9) <sup>#,d</sup>      | 6 (4-8) <sup>#,f</sup>    | 5 (4-6) <sup>#,f</sup>    |
| Sİ3      | 112 (86-120) <sup>□,a</sup>  | 100 (80-120) <sup>□,b</sup> | 97 (78-119) <sup>□,c</sup>  | -                          | -                           | -                         | -                         |
| Sİ3+EtOH | 111 (85-121) <sup>□,a</sup>  | 112 (82-120) <sup>□,a</sup> | 98 (78-115) <sup>□,b</sup>  | -                          | -                           | -                         | -                         |
| Sİ3+Mel  | 112 (85-120) <sup>□,a</sup>  | 105 (80-120) <sup>□,b</sup> | 98 (79-117) <sup>□,c</sup>  | -                          | -                           | -                         | -                         |
| Sİ7      | 114 (87-120) <sup>□,a</sup>  | 109 (85-122) <sup>□,a</sup> | 100 (77-116) <sup>□,b</sup> | 91 (75-109) <sup>□,c</sup> | 88 (70-98) <sup>□,▲,d</sup> | 78 (67-89) <sup>□,e</sup> | 71 (60-80) <sup>□,f</sup> |
| Sİ7+EtOH | 113(100-120) <sup>□,a</sup>  | 110 (89-120) <sup>□,a</sup> | 100 (80-119) <sup>□,b</sup> | 90 (75-112) <sup>□,c</sup> | 83 (69-104) <sup>□,d</sup>  | 80 (69-98) <sup>□,e</sup> | 71 (62-89) <sup>□,f</sup> |
| Sİ7+Mel  | 113 (87-120) <sup>□,a</sup>  | 110 (80-120) <sup>□,a</sup> | 100 (72-113) <sup>□,b</sup> | 88 (69-102) <sup>□,c</sup> | 77 (62-89) <sup>▲,d</sup>   | 70 (59-81) <sup>▲,e</sup> | 60 (51-70) <sup>▲,f</sup> |

(Sütunlardaki değerler gruplar arası değişimi göstermekte olup birbirinden farklı sembolü taşıyanlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. Satırlardaki değerler ardışık günlerin değişimini göstermekte olup birbirinden farklı harfi taşıyanlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir, p<0.05, n=15)

Yapışkan çıkarma test süresi bakımından gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, Sham Sİ grubunun yapışkan çıkarma test süresi 1.ve 7. günler arasında tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0.05). Sİ7+Mel grubunun yapışkan çıkarma test süresi 5. günde Sİ7+EtOH grubuna göre, 6. ve 7. günlerde ise hem Sİ7 grubuna göre hem de Sİ7+EtOH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi (p<0.05). Ayrıca gruplar kendi içlerinde gün-gün olarak karşılaştırıldığında Sham Sİ grubunun yalnızca 4. ve 5. günleri arasında, Sİ3+EtOH, Sİ7, Sİ7+EtOH, Sİ7+Mel gruplarının da yalnızca 1. ve 2. günleri arasında anlam bulunmazken, bütün grupların yapışkan çıkarma test süresi bir önceki güne istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0.05).





**Şekil 4.3.** Melatoninin yapışkan çıkarma test süresi üzerine etkisi

(Grafikte  $\alpha$  sembolü grupların istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n = 15$ )

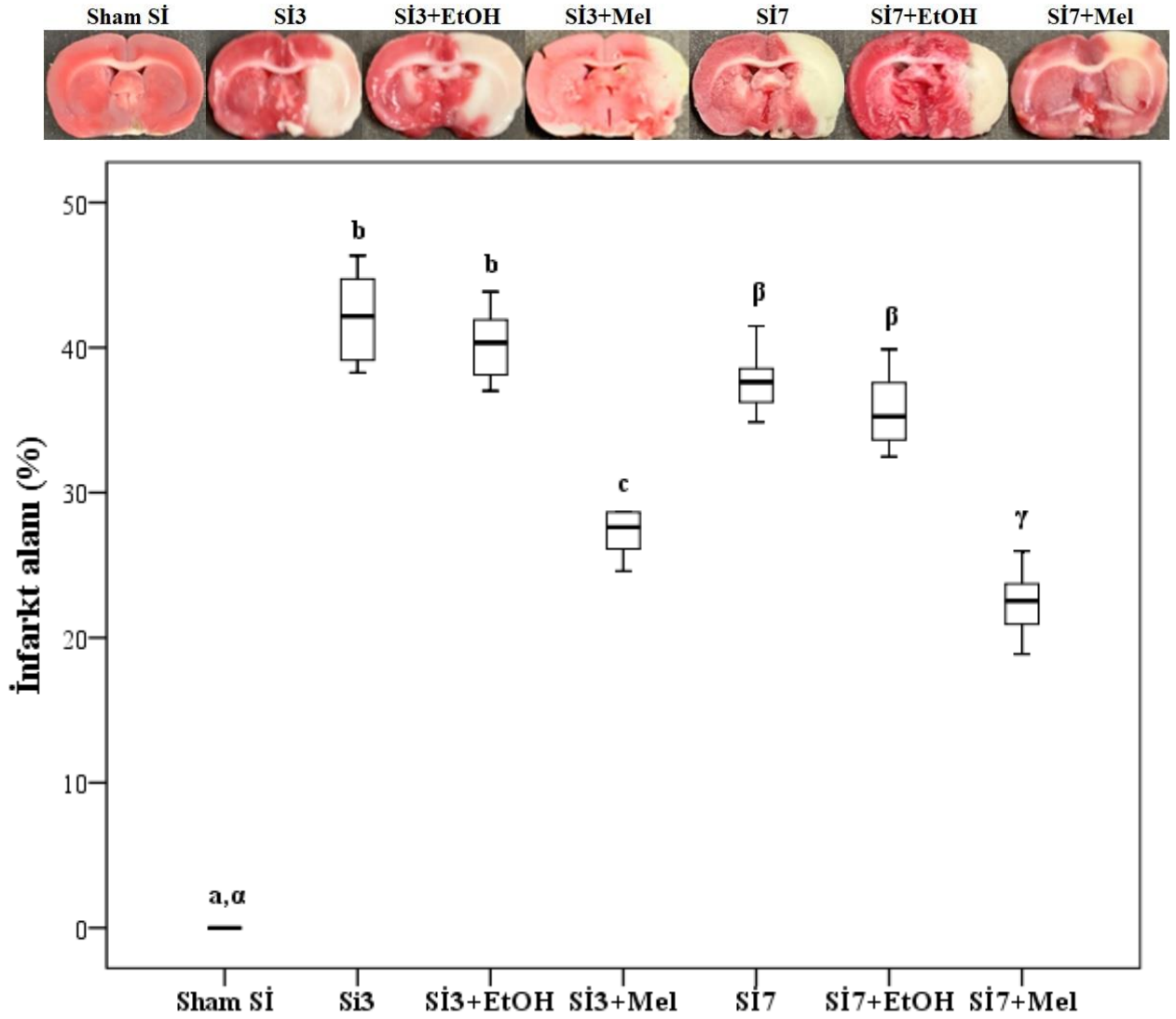
## 4.2. Melatoninin İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi

Serebral iskemi ve reperfüzyon süreci sonrası grupların beyin dokularında oluşan infarkt alanı TTC boyama yöntemi ile karşılaştırıldı. Grupların infarkt alanı yüzdeleri Tablo 4.4.'de verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Melatoninin infarkt alanı üzerine etkisi

| <b>Gruplar</b>    | <b>İnfarkt Alanı (%)</b>         |
|-------------------|----------------------------------|
| <b>Sham Sİ</b>    | 0 <sup>a,α</sup>                 |
| <b>Sİ3</b>        | 40.34 (37.01-43.86) <sup>b</sup> |
| <b>Sİ3 + EtOH</b> | 42.16 (38.27-46.34) <sup>b</sup> |
| <b>Sİ3 + Mel</b>  | 27.62 (24.58-34.98) <sup>c</sup> |
| <b>Sİ7</b>        | 35.25 (32.47-39.88) <sup>β</sup> |
| <b>Sİ7 + EtOH</b> | 37.62 (34.86-41.48) <sup>β</sup> |
| <b>Sİ7 + Mel</b>  | 22.54 (18.88-25.98) <sup>γ</sup> |

(Tabloda farklı harfler 3 günlük reperfüzyon gruplarının, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir, p<0.05, n=5)



**Şekil 4.4.** Melatoninin infarkt alanı üzerine etkisi

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ )

İnfarkt alanı bakımından gruplar karşılaştırıldığında SI3 ve SI3+EtOH gruplarının infarkt alanının Sham SI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Bununla beraber SI3+Mel grubunun infarkt alanının da Sham SI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu, SI3 ve SI3+EtOH gruplarına göre ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ). SI7 ve SI7+EtOH gruplarının infarkt alanının Sham SI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ). SI7+Mel grubunun infarkt alanının Sham SI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu, SI7 ve

Sİ7+EtOH gruplarına göre ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ).

### 4.3. Melatoninin Beclin-1, LC3-I/II, p62 ve Cleaved Caspase-3 Protein seviyeleri Üzerine Etkisi

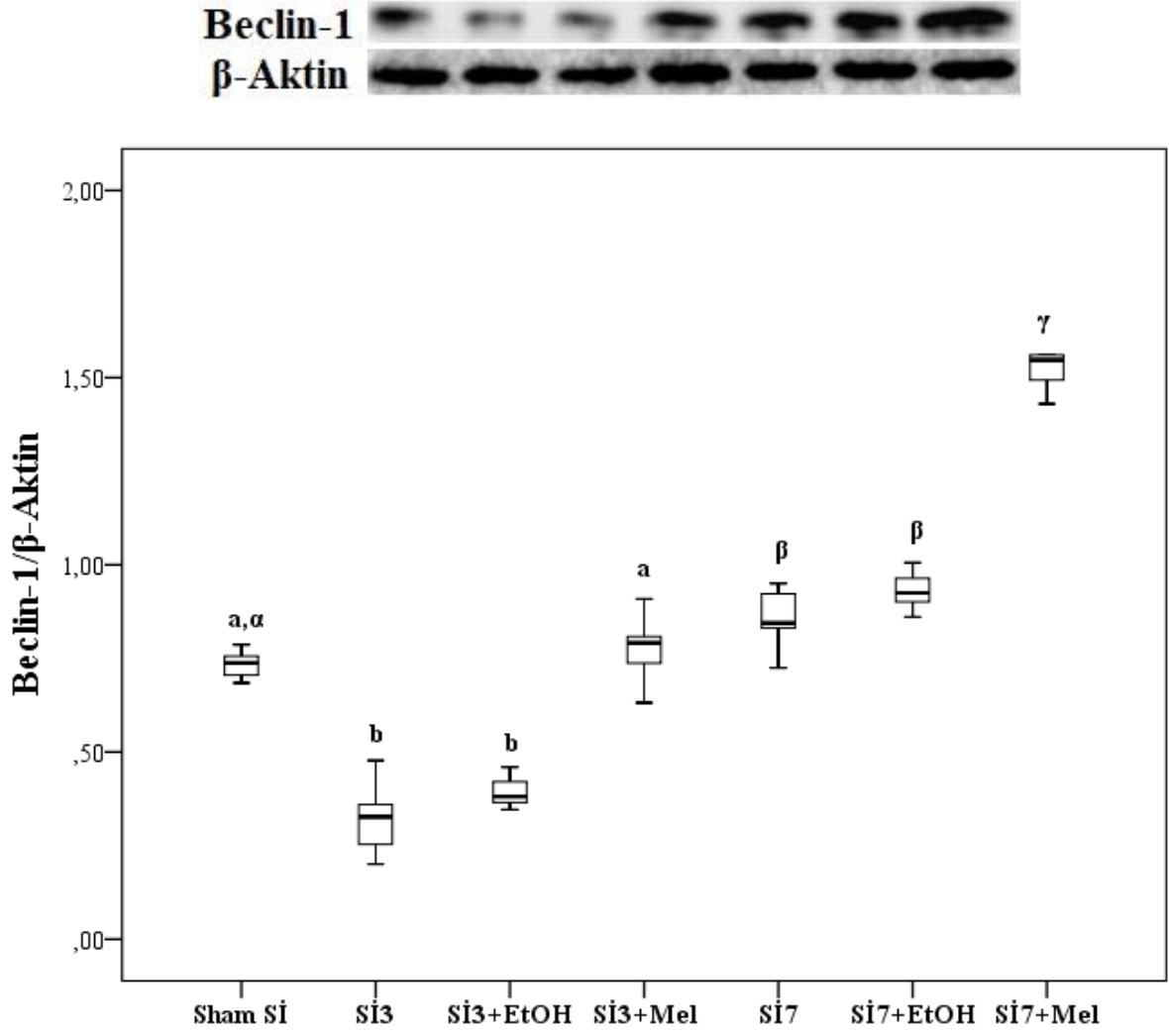
#### 4.3.1. Melatoninin Beclin-1 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi

Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların Beclin-1 protein seviyeleri Western Blot yöntemi ile karşılaştırıldı. Grupların Beclin-1/ $\beta$ -Aktin protein seviyeleri Tablo 4.5.'de verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Melatoninin Beclin-1/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

| Gruplar    | Beclin-1/ $\beta$ -Aktin Oranı                      |
|------------|---|
| Sham Sİ    | 0.7379 (0.68-0.79) <sup>a,<math>\alpha</math></sup> |
| Sİ3        | 0.3266 (0.2-0.48) <sup>b</sup>                      |
| Sİ3 + EtOH | 0.3807 (0.35-0.46) <sup>b</sup>                     |
| Sİ3 + Mel  | 0.7915 (0.63-0.91) <sup>a</sup>                     |
| Sİ7        | 0.8443 (0.73-0.95) <sup><math>\beta</math></sup>    |
| Sİ7 + EtOH | 0.9251 (0.86-1.01) <sup><math>\beta</math></sup>    |
| Sİ7 + Mel  | 1.5471 (1.43-1.66) <sup><math>\gamma</math></sup>   |

(Tabloda farklı harfler 3 günlük reperfüzyon gruplarının, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p<0.05$ ,  $n=6$ )



**Şekil 4.5.** Melatoninin Beclin-1/β-Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ )

Beclin-1/β-Aktin protein seviyesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarının Beclin-1 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Sİ3+Mel grubunun Beclin-1 protein seviyesinin ise Sham Sİ grubuna göre değişmediği, Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artış gösterdiği bulundu ( $p < 0.05$ ). Sİ7 grubunun Beclin-1 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek olduğu ( $p < 0.05$ ) ancak Sİ7+EtOH grubuna göre değişmediği belirlendi. Ayrıca Sİ7+Mel grubunun Beclin-1 protein seviyesinin Sham Sİ, Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmış olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ).

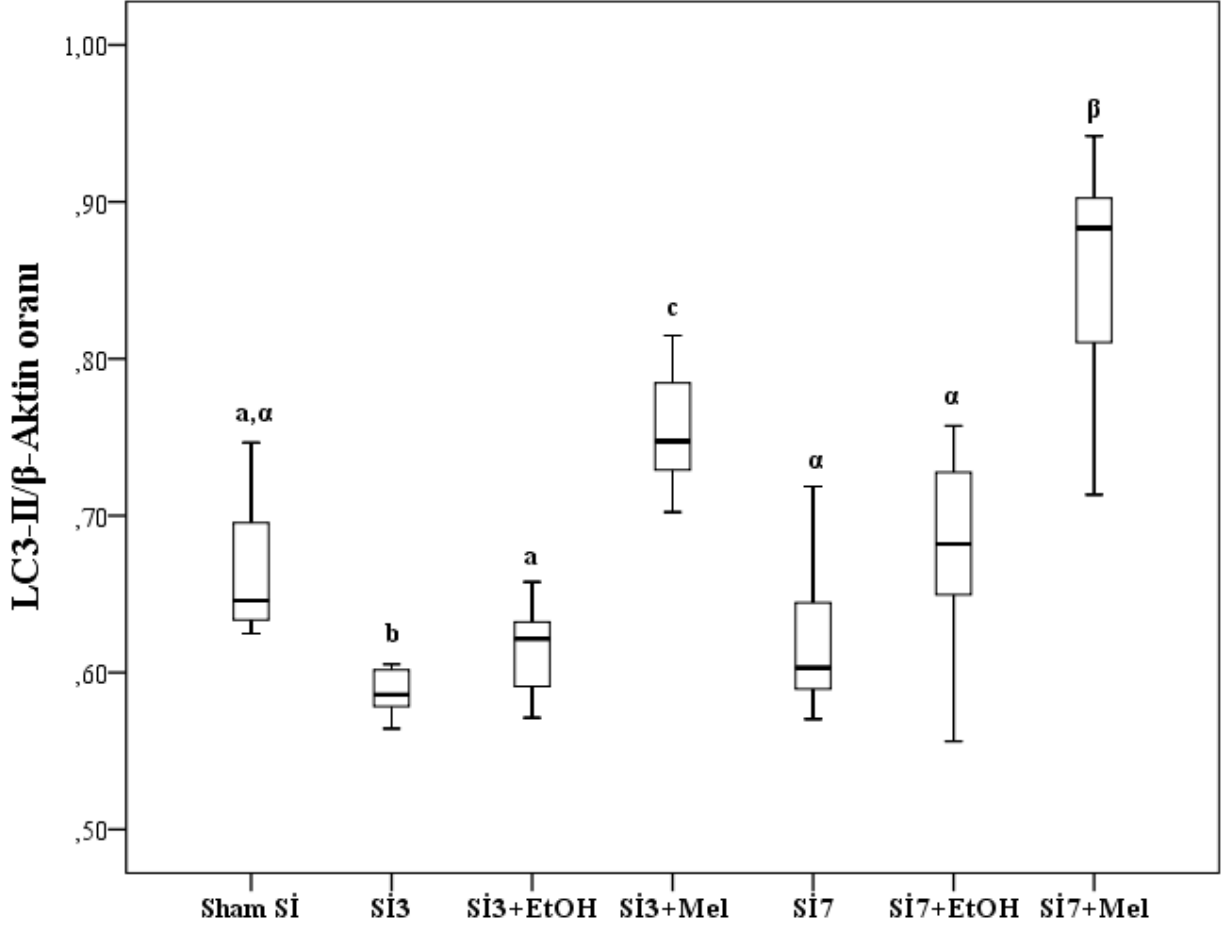
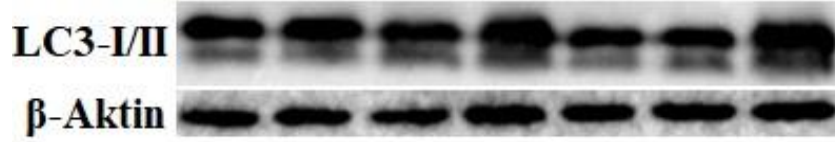
#### 4.3.2. Melatoninin LC3-II Protein Seviyesi Üzerine Etkisi

Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların LC3-II protein seviyeleri Western Blot yöntemi ile karşılaştırıldı. Grupların LC3-II/ $\beta$ -Aktin protein seviyeleri Tablo 4.6.'da verilmiştir.

**Tablo 4.6.** Melatoninin LC3-II/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

| Gruplar    | LC3-II/ $\beta$ -Aktin Oranı                        |
|------------|---|
| Sham Sİ    | 0.6459 (0.62-0.75) <sup>a,<math>\alpha</math></sup> |
| Sİ3        | 0.5860 (0.56-0.61) <sup>b</sup>                     |
| Sİ3 + EtOH | 0.6216 (0.57-0.66) <sup>a</sup>                     |
| Sİ3 + Mel  | 0.7475 (0.70-0.81) <sup>c</sup>                     |
| Sİ7        | 0.6031 (0.57-0.72) <sup>a</sup>                     |
| Sİ7 + EtOH | 0.6819 (0.56-0.76) <sup>a</sup>                     |
| Sİ7 + Mel  | 0.8833 (0.71-0.94) <sup><math>\beta</math></sup>    |

(Tabloda farklı harfler 3 günlük reperfüzyon gruplarının, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ )



**Şekil 4.6.** Melatoninin LC3-II/β-Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )

LC3-II/β-Aktin protein seviyesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3 grubunun LC3-II protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ). Sİ3+EtOH grubu ile Sham Sİ grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Sİ3+Mel grubunun LC3-II protein seviyesinin Sham Sİ, Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarının LC3-II protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre değişiklik göstermediği belirlendi. Ayrıca Sİ7+Mel

grubunun LC3-II protein seviyesinin Sham Sİ, Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği tespit edildi ( $p<0.05$ ).

#### 4.3.3. Melatoninin p62 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi

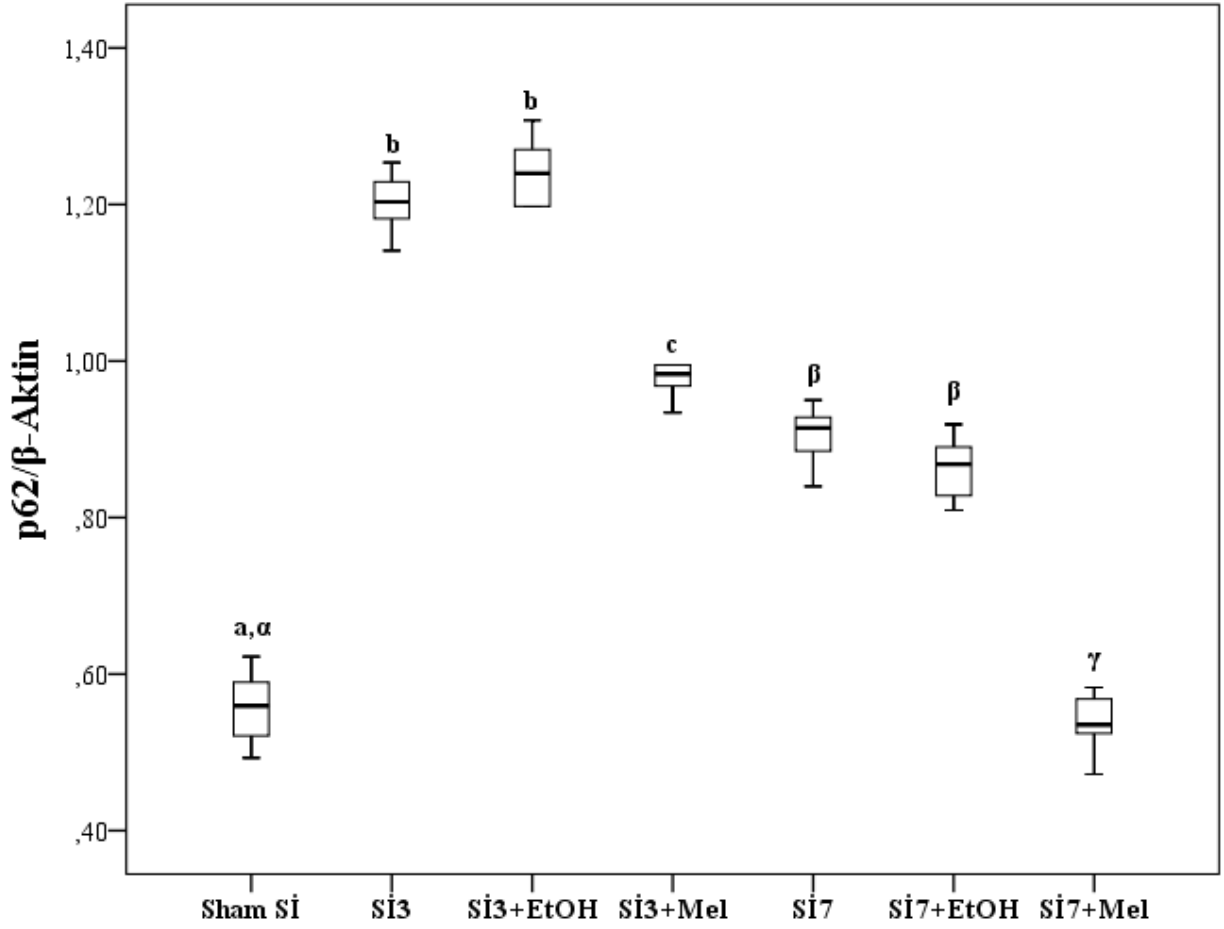
Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların p62 protein seviyeleri Western Blot yöntemi ile karşılaştırıldı. Grupların p62 protein seviyeleri Tablo 4.7.'de verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Melatoninin p62/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

| Gruplar    | P62/ $\beta$ -Aktin Oranı                           |
|------------|---|
| Sham Sİ    | 0.5594 (0.49-0.62) <sup>a,<math>\alpha</math></sup> |
| Sİ3        | 1.2033 (1.14-1.25) <sup>b</sup>                     |
| Sİ3 + EtOH | 1.2398 (1.20-1.31) <sup>b</sup>                     |
| Sİ3 + Mel  | 0.9836 (0.93-1.05) <sup>c</sup>                     |
| Sİ7        | 0.9146 (0.84-0.95) <sup><math>\beta</math></sup>    |
| Sİ7 + EtOH | 0.8682 (0.81-0.92) <sup><math>\beta</math></sup>    |
| Sİ7 + Mel  | 0.5353 (0.47-0.58) <sup><math>\gamma</math></sup>   |

(Tabloda farklı harfler 3 günlük reperfüzyon gruplarının, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p<0.05$ ,  $n=6$ )





**Şekil 4.7.** Melatoninin p62/β-Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ )

P62/β-Aktin protein seviyesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarının p62 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Sİ3+Mel grubunun p62 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ( $p < 0.05$ ). Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarının p62 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ). Sİ7+Mel grubunun p62 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre değişiklik göstermediği, Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ( $p < 0.05$ ).

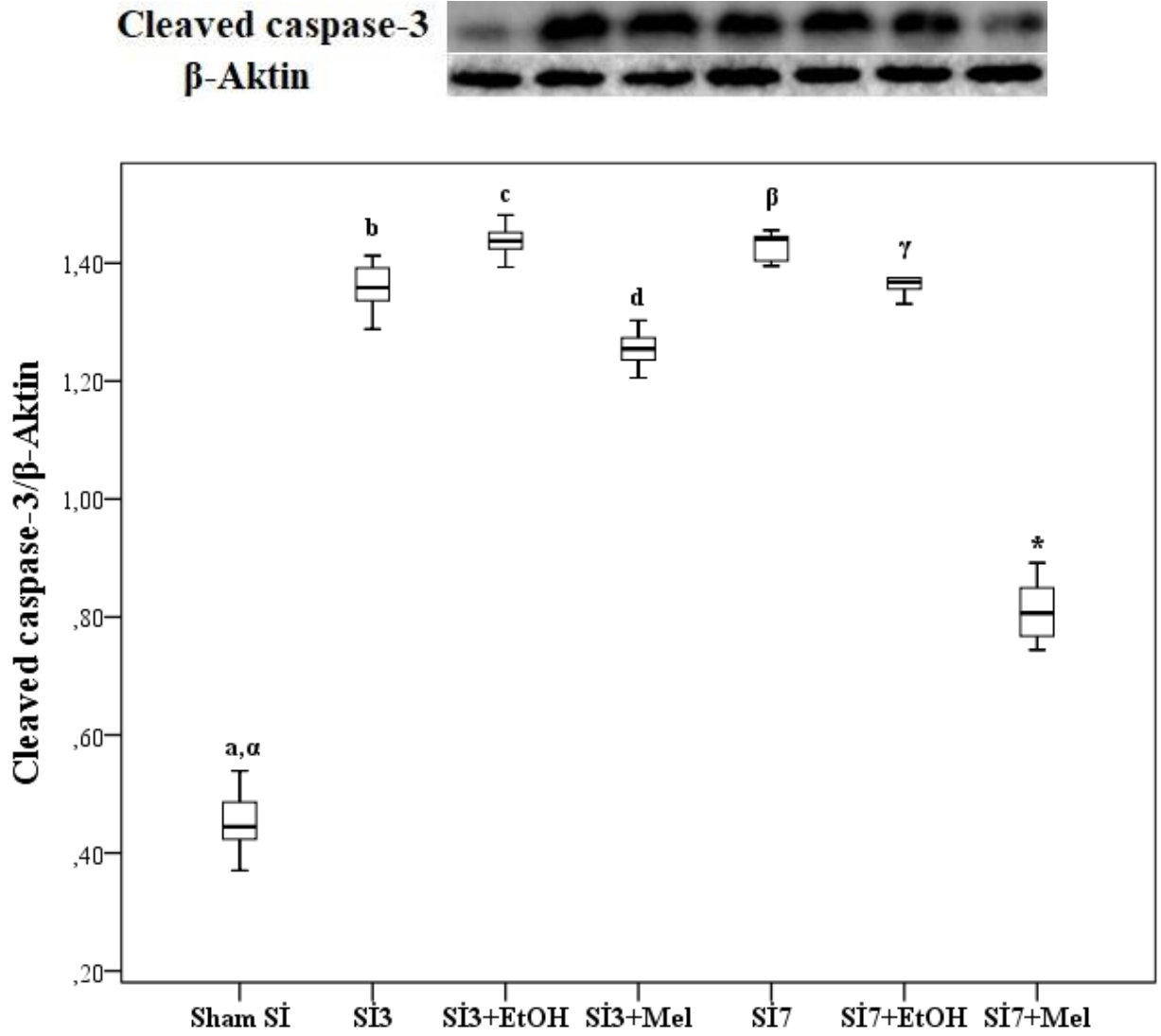
#### 4.3.4. Melatoninin Cleaved Caspase-3 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi

Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların cleaved caspase-3 protein seviyeleri Western Blot yöntemi ile karşılaştırıldı. Grupların cleaved caspase-3/ $\beta$ -Aktin protein seviyeleri Tablo 4.8.'de verilmiştir.

**Tablo 4.8.** Melatoninin cleaved caspase-3/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

| Gruplar    | Cleaved caspase-3/ $\beta$ -Aktin Oranı             |
|------------|---|
| Sham Sİ    | 0.4445 (0.37-0.54) <sup>a,<math>\alpha</math></sup> |
| Sİ3        | 1.3583 (1.29-1.41) <sup>b</sup>                     |
| Sİ3 + EtOH | 1.4376 (1.39-1.48) <sup>c</sup>                     |
| Sİ3 + Mel  | 1.2547 (1.21-1.30) <sup>d</sup>                     |
| Sİ7        | 1.441 (1.40-1.46) <sup><math>\beta</math></sup>     |
| Sİ7 + EtOH | 1.3678 (1.33-1.41) <sup><math>\gamma</math></sup>   |
| Sİ7 + Mel  | 0.8067 (0.74-0.89) <sup><math>\delta</math></sup>   |

(Tabloda farklı harfler 3 günlük reperfüzyon gruplarının, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ )



**Şekil 4.8.** Melatoninin cleaved caspase-3/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi üzerine etkisi

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ )

Cleaved caspase-3/ $\beta$ -Aktin protein seviyesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3, Sİ3+EtOH ve Sİ3+Mel gruplarının cleaved caspase-3 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Sİ3+Mel grubunun cleaved caspase-3 protein seviyesinin ise Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ( $p < 0.05$ ). Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarının cleaved caspase-3 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Ayrıca Sİ7+Mel grubunun cleaved caspase-3 protein seviyesinin Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli düzeyde arttigi, Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldigi belirlendi ( $p<0.05$ ).

#### 4.4. Melatoninin Beclin-1, LC3-I/II, p62 ve Cleaved Caspase-3 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi

##### 4.4.1. Melatoninin Beclin-1 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi

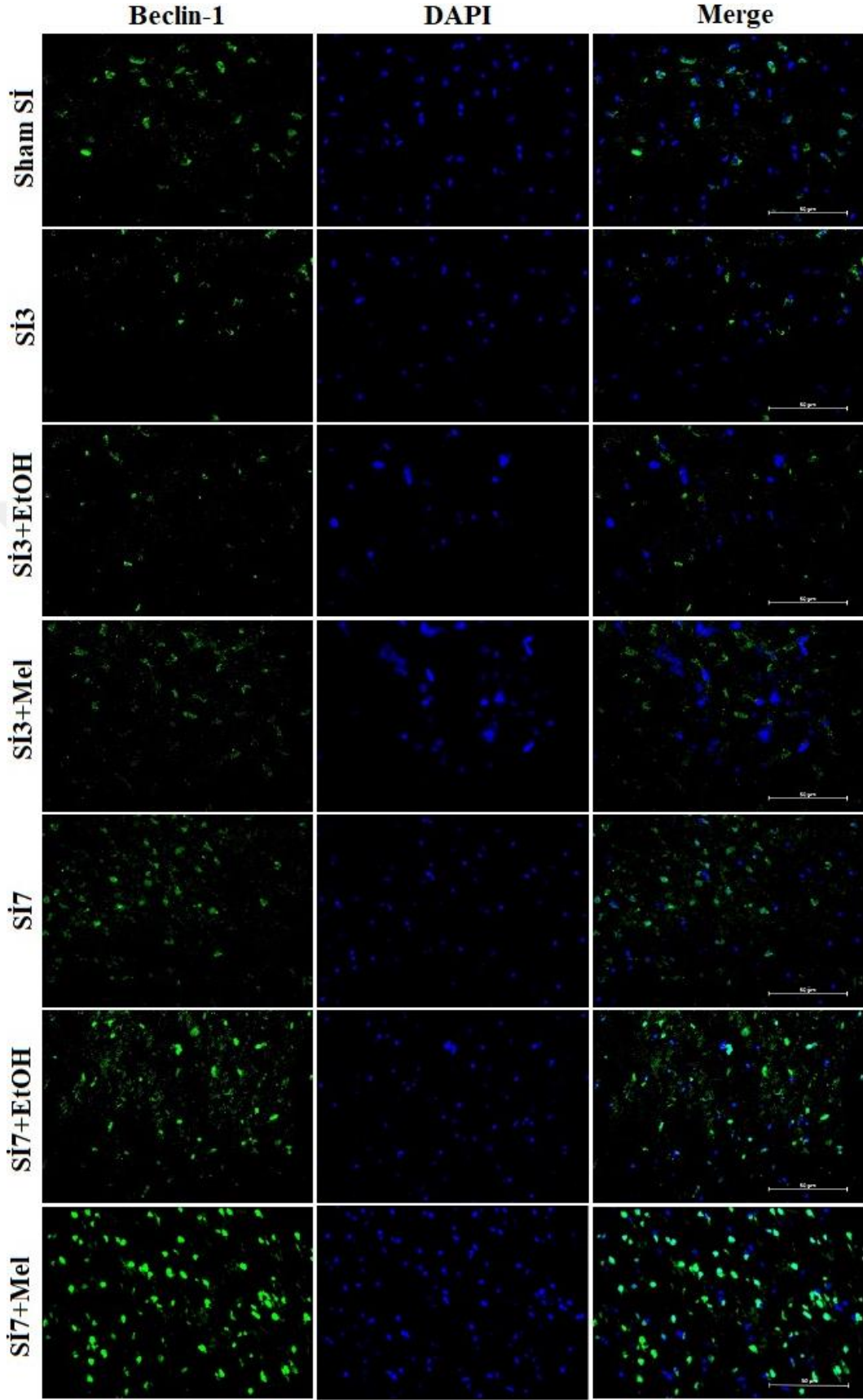
Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların Beclin-1 pozitif hücre sayıları immünofloresan yöntemi ile karşılaştırıldı. Grupların Beclin-1 pozitif boyanan hücre sayıları Tablo 4.9.'da verilmiştir.

**Tablo 4.9.** Melatoninin Beclin-1 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

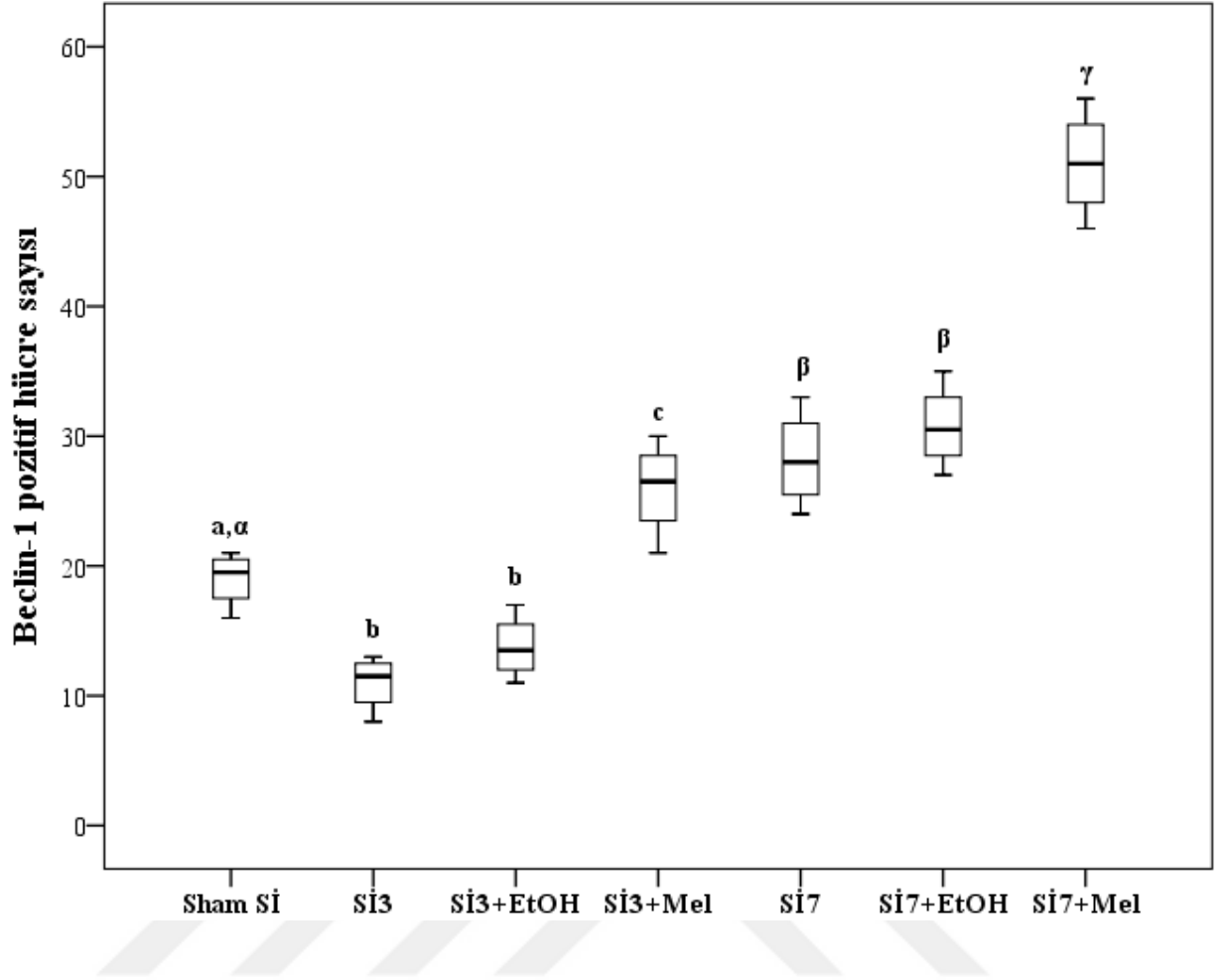
| Gruplar    | Beclin-1 Pozitif Hücre Sayısı |
|------------|-------------------------------|
| Sham Sİ    | 19.5 (16-21) <sup>a,α</sup>   |
| Sİ3        | 11.5 (8-13) <sup>b</sup>      |
| Sİ3 + EtOH | 13.75 (11-17) <sup>b</sup>    |
| Sİ3 + Mel  | 26 (21-30) <sup>c</sup>       |
| Sİ7        | 28.25 (24-33) <sup>β</sup>    |
| Sİ7 + EtOH | 30.75 (27-35) <sup>β</sup>    |
| Sİ7 + Mel  | 51 (46-56) <sup>γ</sup>       |

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p<0.05$ ,  $n=4$ )

Beclin-1 pozitif hücre sayısı bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarının Beclin-1 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı, Sİ3+Mel grubunun Beclin-1 pozitif hücre sayısının ise Sham Sİ, Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ( $p<0.05$ ). Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarının Beclin-1 pozitif hücre sayısının Sham Sİ, grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). Ayrıca Sİ7+Mel grubunun Beclin-1 pozitif hücre sayısının Sham Sİ, Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.9.** Grupların ipsilateral korteks alanındaki Beclin-1 proteininin immüno Floresan görüntüleri  
 (Yeşil: Beclin-1, Mavi: Çekirdek, Merge: Çakıştırılmış. Skala bar=50 µm)



**Şekil 4.10.** Melatoninin Beclin-1 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=4$ )

#### 4.4.2. Melatoninin LC3 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi

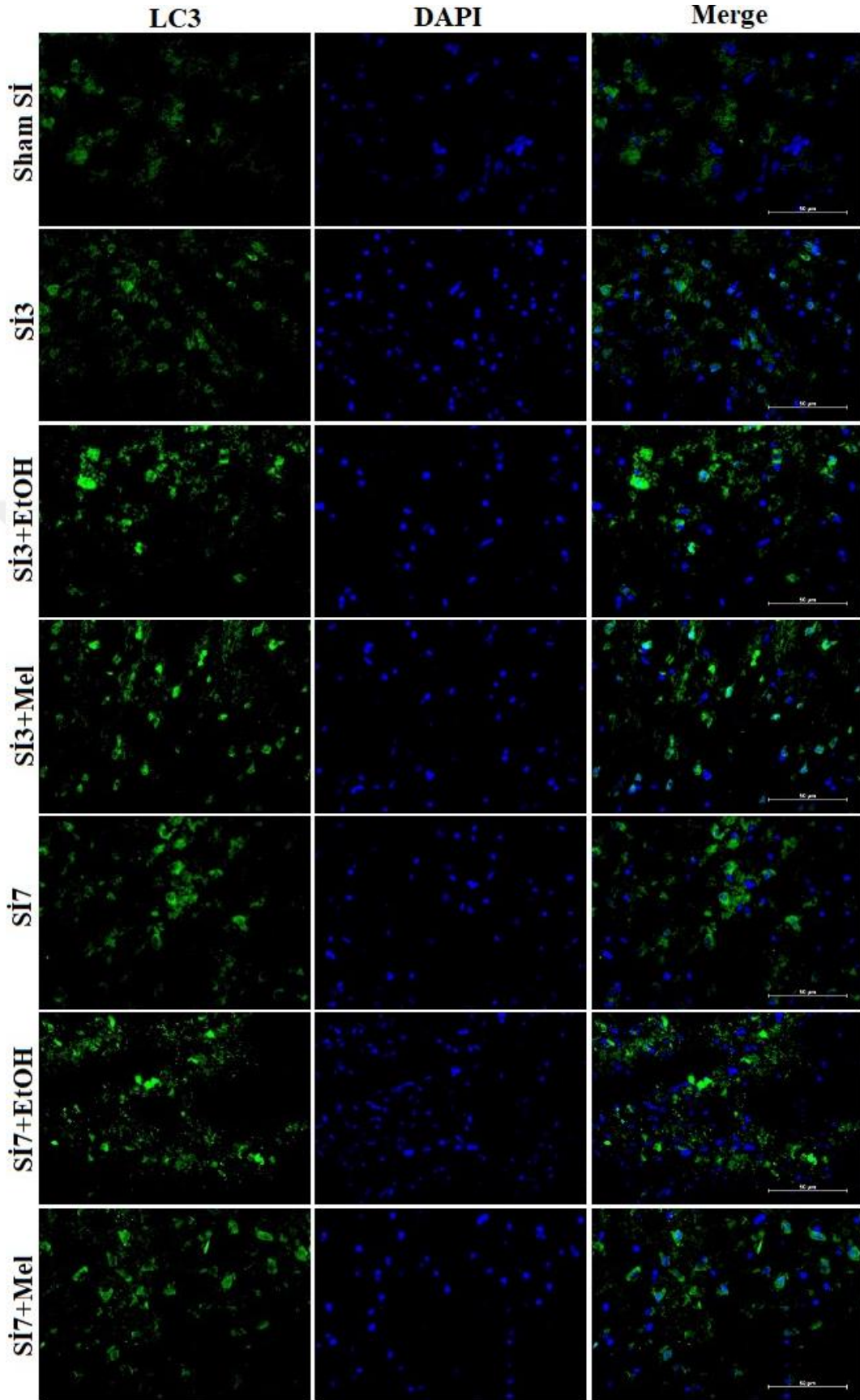
Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların LC3 pozitif hücre sayıları immünofloresan yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Grupların LC3 pozitif boyanan hücre sayıları Tablo 4.10.'da verilmiştir.

**Tablo 4.10.** Melatoninin LC3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

| <b>Gruplar</b>    | <b>LC3 Pozitif Hücre Sayısı</b> |
|-------------------|---------------------------------|
| <b>Sham Sİ</b>    | 21.5 (20-24) <sup>a,α</sup>     |
| <b>Sİ3</b>        | 16 (13-19) <sup>b</sup>         |
| <b>Sİ3 + EtOH</b> | 19 (18-21) <sup>a</sup>         |
| <b>Sİ3 + Mel</b>  | 25 (24-29) <sup>c</sup>         |
| <b>Sİ7</b>        | 20.5 (20-24) <sup>α</sup>       |
| <b>Sİ7 + EtOH</b> | 22.5 (21-24) <sup>α</sup>       |
| <b>Sİ7 + Mel</b>  | 31 (29-33) <sup>β</sup>         |

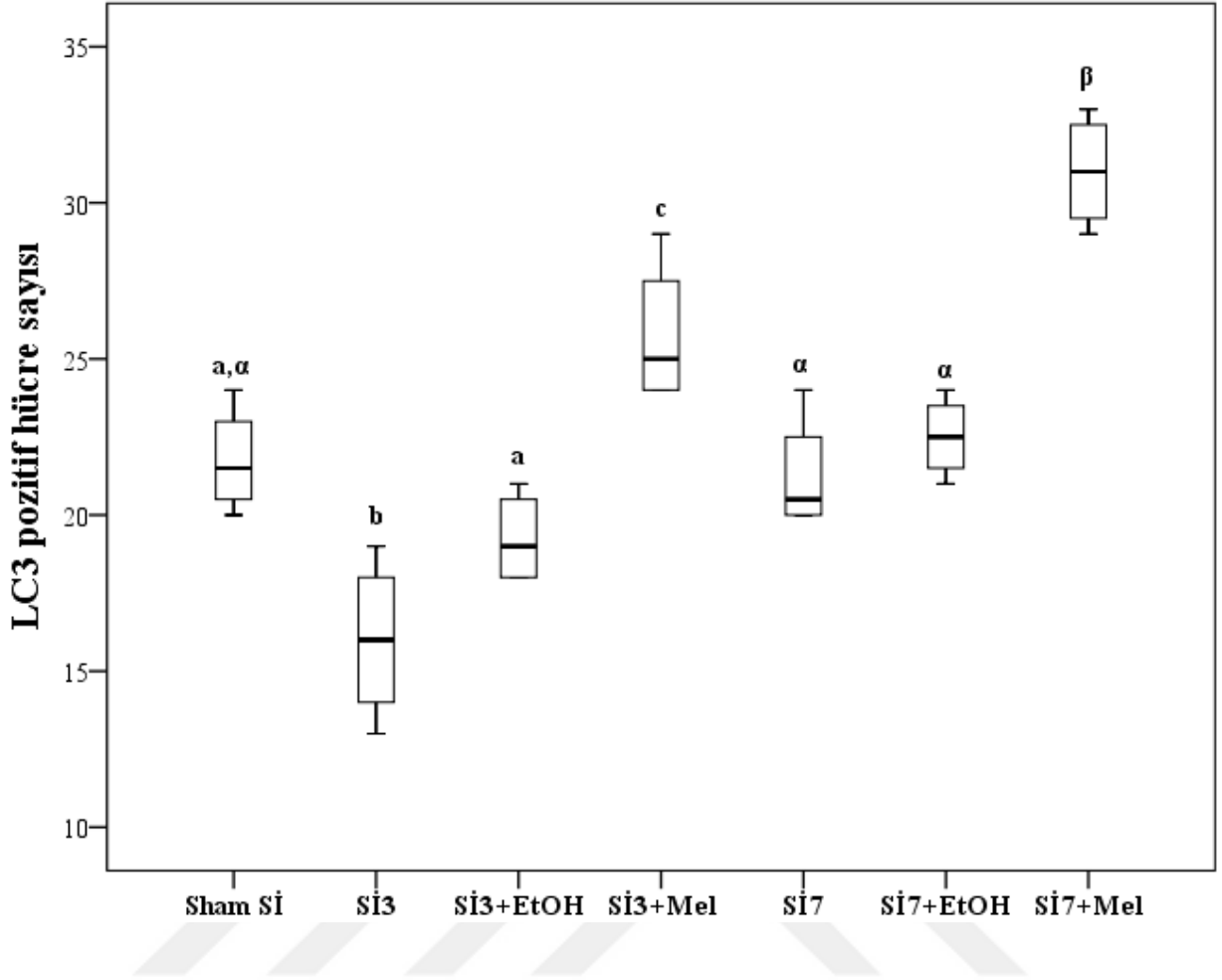
(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p<0.05$ ,  $n=4$ )

LC3 pozitif hücre sayısı bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3 grubunun LC3 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ( $p<0.05$ ). Sİ3+EtOH grubu ile Sham Sİ grubu arasında ise LC3 pozitif hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Sİ3+Mel grubunun LC3 pozitif hücre sayısının Sham Sİ, Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarının LC3 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak değişiklik göstermediği gözlemlendi. Ayrıca Sİ7+Mel grubunun LC3 pozitif hücre sayısının Sham Sİ, Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.11.** Grupların ipsilateral korteks alanındaki LC3 proteininin immüno Floresan görüntüleri  
(Yeşil: LC3, Mavi: Çekirdek, Merge: Çakıştırılmış. Skala bar=50 µm)





**Şekil 4.12.** Melatoninin LC3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

(Grafikte farklı harf taşıyan gruplar 3 günlük reperfüzyon gruplarının, farklı sembol taşıyan gruplar 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=4$ )

#### 4.4.3. Melatoninin p62 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi

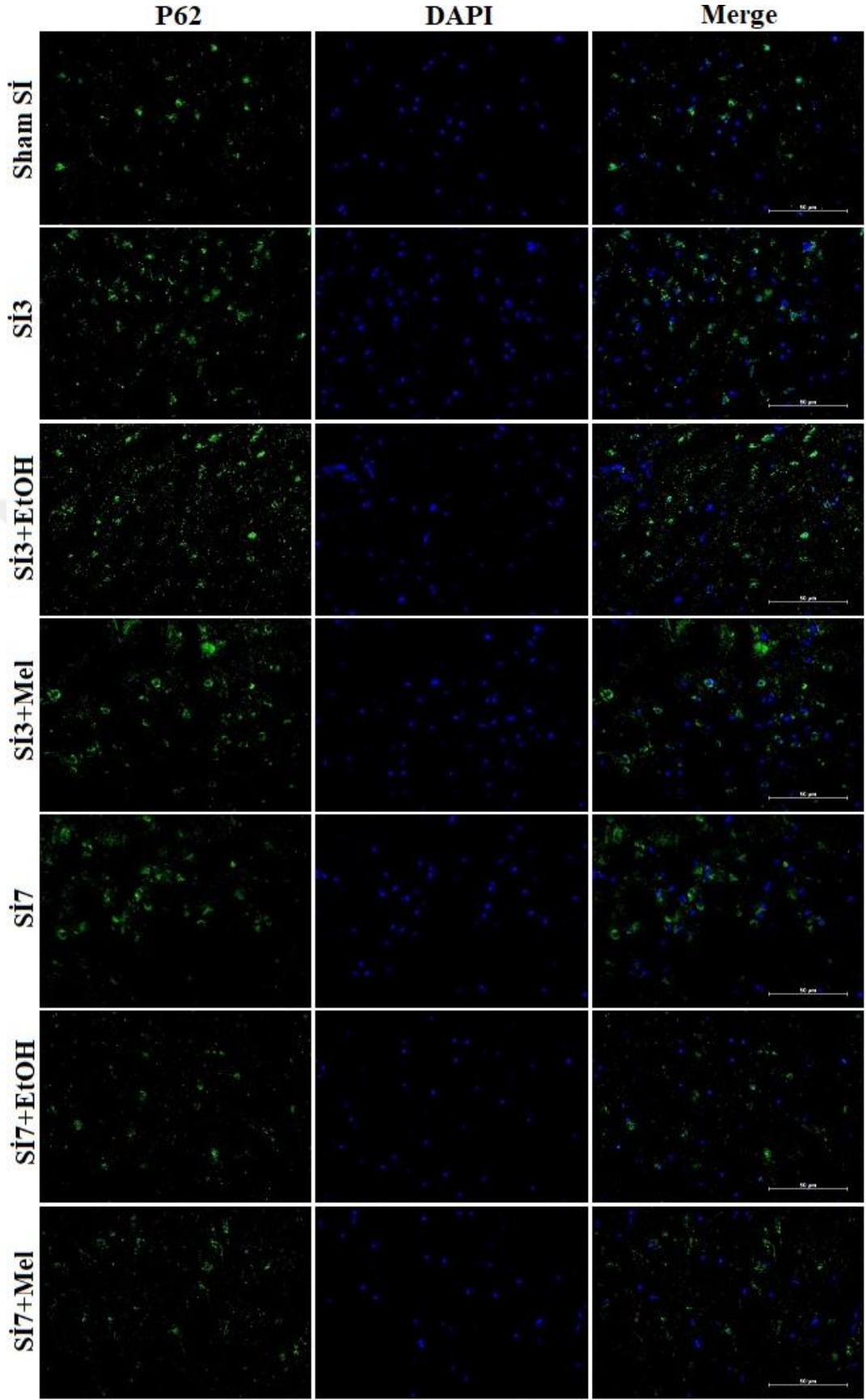
Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların p62 pozitif hücre sayıları immüno Floresan yöntemi ile karşılaştırıldı. Grupların p62 pozitif boyanan hücre sayıları Tablo 4.11.'de verilmiştir.

**Tablo 4.11.** Melatoninin p62 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

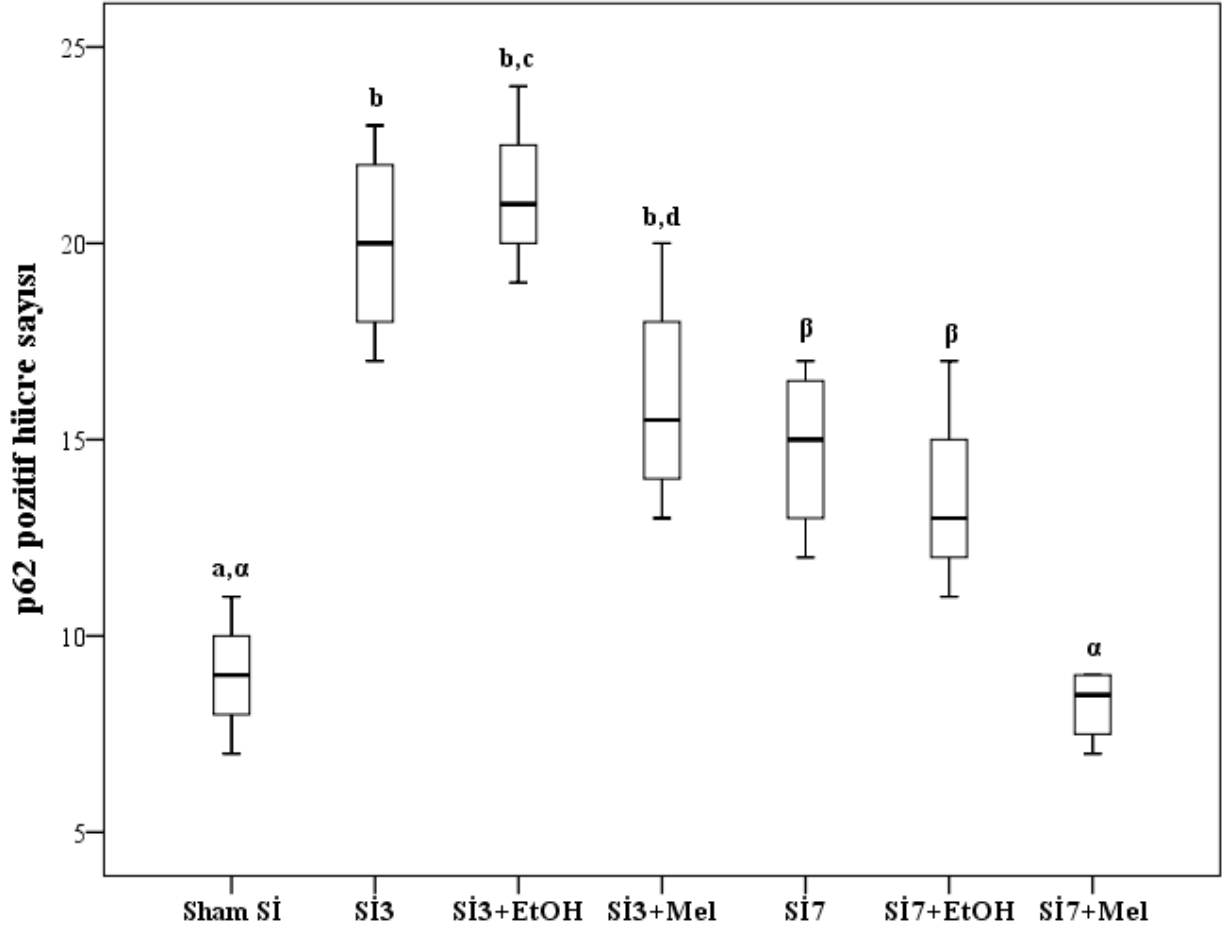
| <b>Gruplar</b>    | <b>P62 Pozitif Hücre Sayısı</b> |
|-------------------|---------------------------------|
| <b>Sham Sİ</b>    | 9 (7-11) <sup>a,α</sup>         |
| <b>Sİ3</b>        | 20 (17-23) <sup>b</sup>         |
| <b>Sİ3 + EtOH</b> | 21 (19-24) <sup>b,c</sup>       |
| <b>Sİ3 + Mel</b>  | 15.5 (13-20) <sup>b,d</sup>     |
| <b>Sİ7</b>        | 15 (12-17) <sup>β</sup>         |
| <b>Sİ7 + EtOH</b> | 13 (11-17) <sup>β</sup>         |
| <b>Sİ7 + Mel</b>  | 8.5 (7-9) <sup>a</sup>          |

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir, p<0.05, n=4)

P62 pozitif hücre sayısı bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarının p62 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi (p<0.05). Sİ3+Mel grubunun p62 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre yüksek olduğu, Sİ3+EtOH grubuna göre düşük olduğu bulundu (p<0.05). Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarının p62 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi (p<0.05). Sİ7+Mel grubunun p62 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubu ile arasında istatistiksel olarak anlam olmadığı ancak Sİ7+Mel grubunun p62 pozitif hücre sayısının Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu bulundu (p<0.05).



**Şekil 4.13.** Grupların ipsilateral korteks alanındaki p62 proteininin immüno Floresan görüntüleri  
 (Yeşil: P62, Mavi: Çekirdek, Merge: Çakıştırılmış. Skala bar=50 µm)



**Şekil 4.14.** Melatoninin p62 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=4$ )

#### 4.4.4. Melatoninin Cleaved Caspase-3 Pozitif Hücre Sayısı Üzerine Etkisi

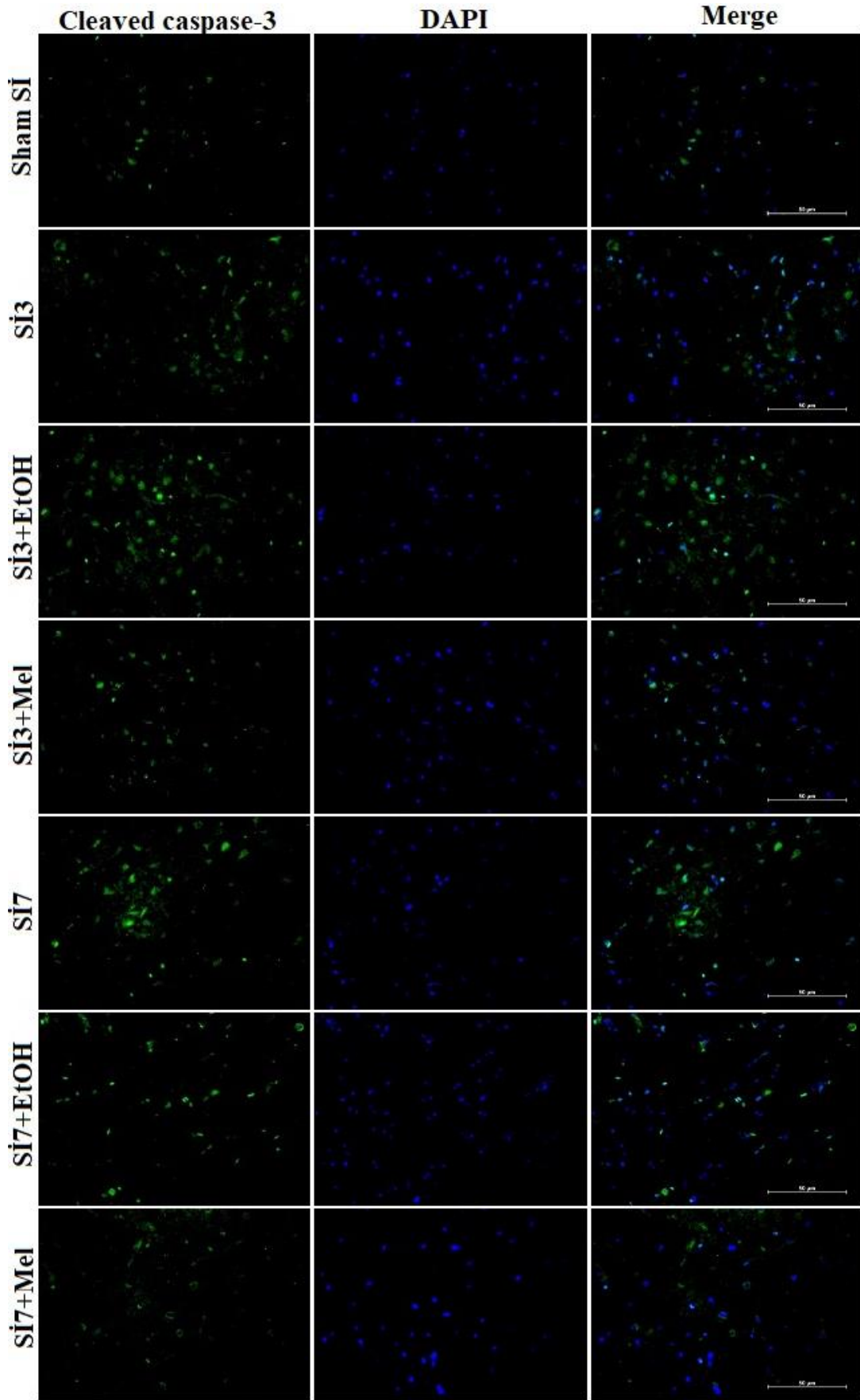
Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların cleaved caspase-3 pozitif hücre sayıları immünofloresan yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Grupların cleaved caspase-3 pozitif boyanan hücre sayıları Tablo 4.12.'de verilmiştir.

**Tablo 4.12.** Melatoninin cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

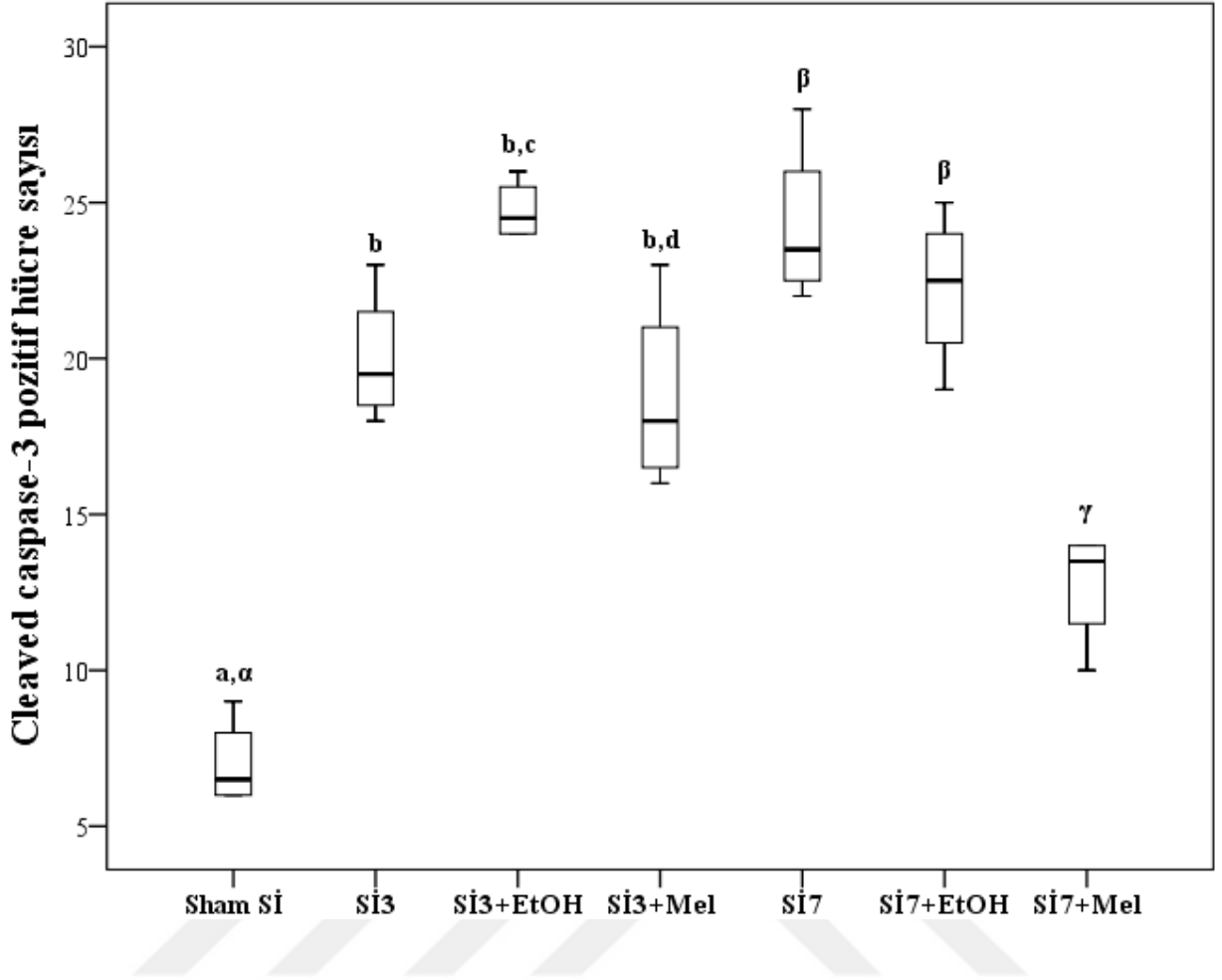
| Gruplar    | Cleaved caspase-3 Pozitif Hücre Sayısı |
|------------|--|
| Sham Sİ    | 6.5 (6-9) <sup>a,α</sup>               |
| Sİ3        | 19.5 (18-23) <sup>b</sup>              |
| Sİ3 + EtOH | 24.5 (24-26) <sup>b,c</sup>            |
| Sİ3 + Mel  | 18 (16-23) <sup>b,d</sup>              |
| Sİ7        | 23.5 (22-28) <sup>β</sup>              |
| Sİ7 + EtOH | 22.5 (19-25) <sup>β</sup>              |
| Sİ7 + Mel  | 13.5 (10-14) <sup>γ</sup>              |

(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir, p<0.05, n=4)

Cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısı bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarının cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi (p<0.05). Sİ3+Mel grubunun cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısının ise Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu, Sİ3+EtOH grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulundu (p<0.05). Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarının cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısının Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu (p<0.05). Sİ7+Mel grubunun cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısının Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük olduğu ancak Sham Sİ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi (p<0.05).



**Şekil 4.15.** Grupların ipsilateral korteks alanındaki cleaved caspase-3 proteininin immüno Floresan görüntüleri  
(Yeşil: P62, Mavi: Çekirdek, Merge: Çakıştırılmış. Skala bar=50 µm)



**Şekil 4.16.** Melatoninin cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısı üzerine etkisi

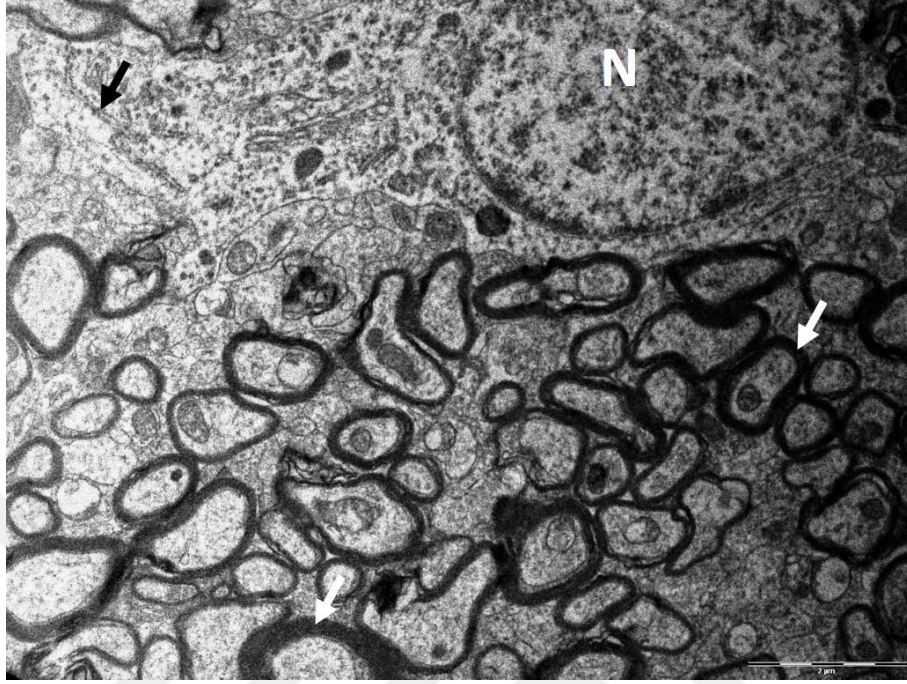
(Grafikte farklı harfler 3 günlük, farklı semboller ise 7 günlük reperfüzyon gruplarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu anlamına gelmektedir. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir,  $p < 0.05$ ,  $n=4$ )

#### 4.5. Melatoninin Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları Üzerine Etkisi

Serebral iskemi sonrası reperfüzyon sürecinde melatonin uygulanması sonrası grupların beyin dokuları transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi.

Sham Sİ grubuna ait kesitlerin transmisyon elektron mikroskop incelenmesinde nöronlar, glia hücreleri ve vasküler yapılar normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Nöronların nükleusları genel olarak iri, oval-yuvarlak şekilli, düzgün konturlu, ökromatik görünümde izlendi. Nöron ve glial hücrelerde sitoplazma ve organeller normal yoğunluk ve yapıda saptandı. Miyelinli aksonların miyelin kılıfları elektron yoğun tabakalar şeklinde normal görünümde izlendi. Miyelinli ve miyelinsiz aksonlarda aksoplazma

içinde mitokondriler, agranüler endoplazmik retikulum sisternaları, nörofilament ve nörotübül yapıları olağan görünüm ve yoğunlukta izlendi.

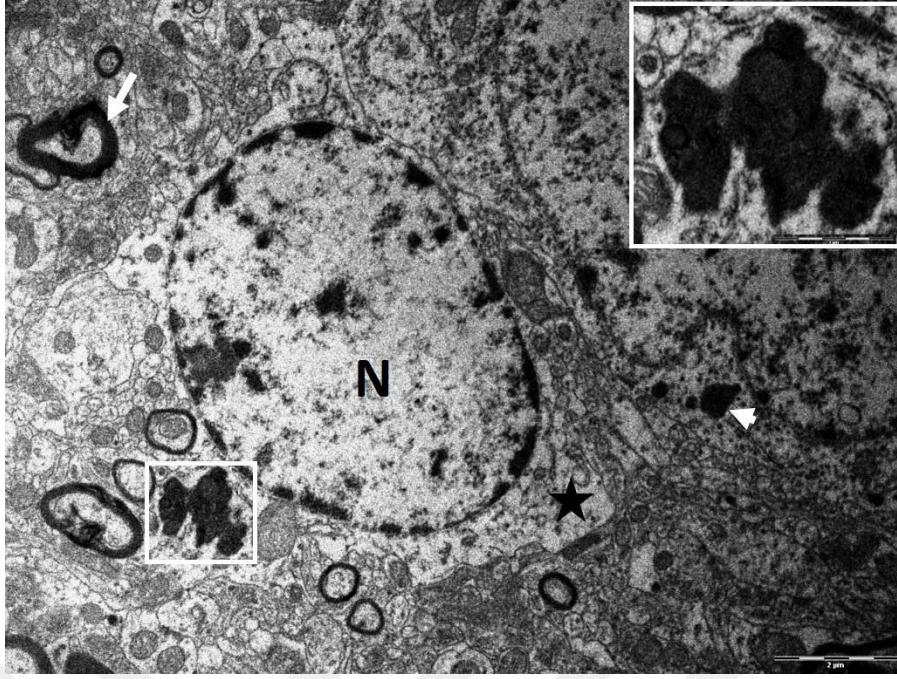


**Şekil 4.17.** Sham Sİ grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nükleus (N), granüler endoplazmik retikulum (siyah ok), miyelinli akson (beyaz ok), uranil asetat-kurşun sitrat, x8000)

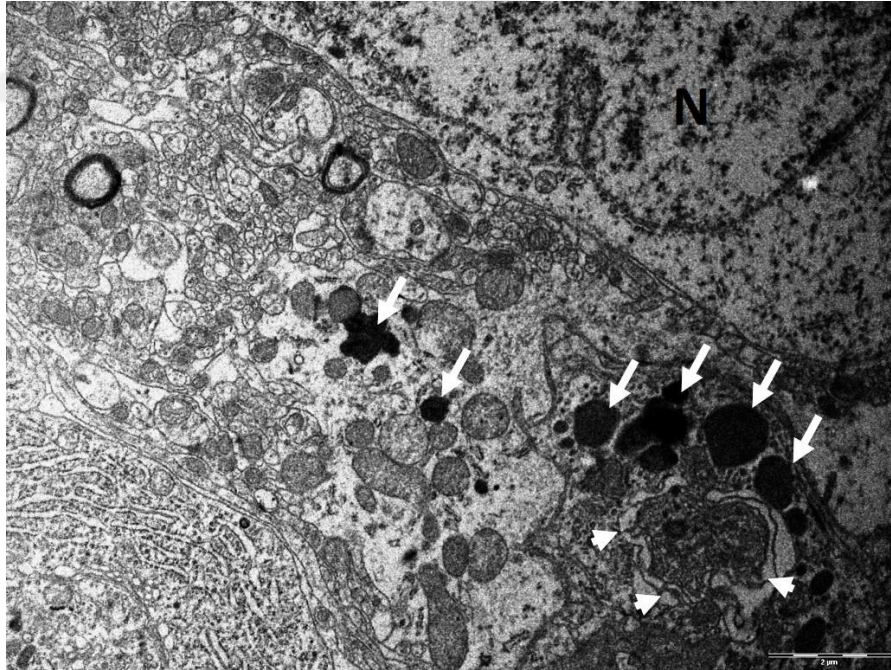
Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına ait kesitlerin transmisyon elektron mikroskopik incelenmesinde nöronların sitoplamlarında lizozomlar ve otofagozomlar tespit edildi. Lizozom ve otofagozomlar elektron yoğunluğu ve boyut açısından heterojenite gösteriyordu. Nöronlarda yer yer intrasitoplazmik ödem ve bu ödem alanları içinde hasarlı dejenere organel yapıları saptandı. Granüler endoplazmik retikulum kabalaşması, sisternalarda dilatasyon ve yer yer dejenerasyon izlendi. Bir kısım mitokondrilerde matriks yoğunlaşması ve piknoz izlenirken bazı mitokondrilerde ise dilatasyon, krista hasarı ve total krista kaybı saptandı. Bazı nöronlarda değişik derecelerde kromatolizis ve karyolizis izlenirken bazı nöronlarda ise nükleoplazma ve kromatin yoğunlaşması ile nükleus sırlarında düzensizlik/ondülasyon dikkati çekti. Miyelinli aksonların miyelin kılıflarında incelmeye, miyelin tabakaları arasında ayrılmalar ve miyelin hasarı saptandı.





**Şekil 4.18.** Sİ3 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

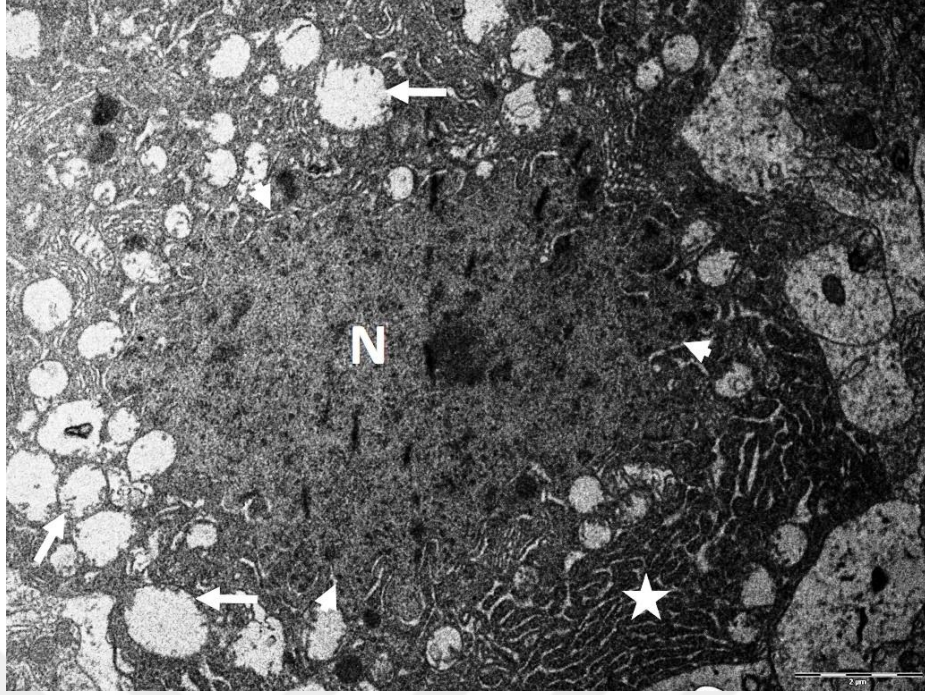
(Nukleus (N), miyelinli akson (ok), perinuklear alanda intrasitoplazmik ödem (yıldız), lizozom (ok başı), otofagozom (dikdörtgen), uranil asetat-kurşun sitrat, büyük resim x6300, küçük resim x16000)



**Şekil 4.19.** Sİ3 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

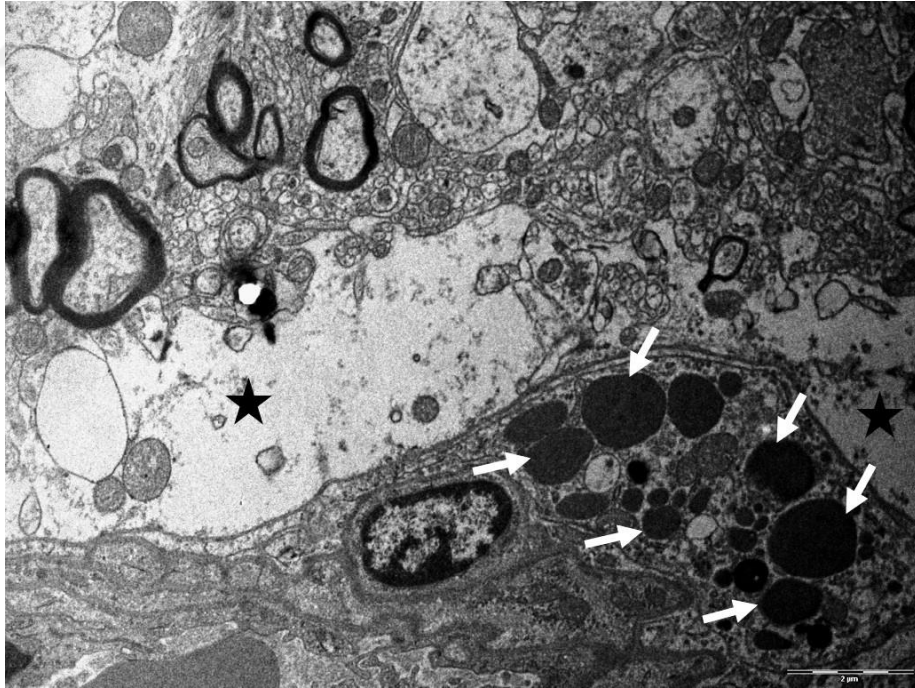
(Nukleus (N), otofagozom-lizozom (ok), granüler endoplazmik retikulum dilatasyonu ve ribozom kaybı (ok başı), lizozom, Uranil asetat-kurşun sitrat, x10000)





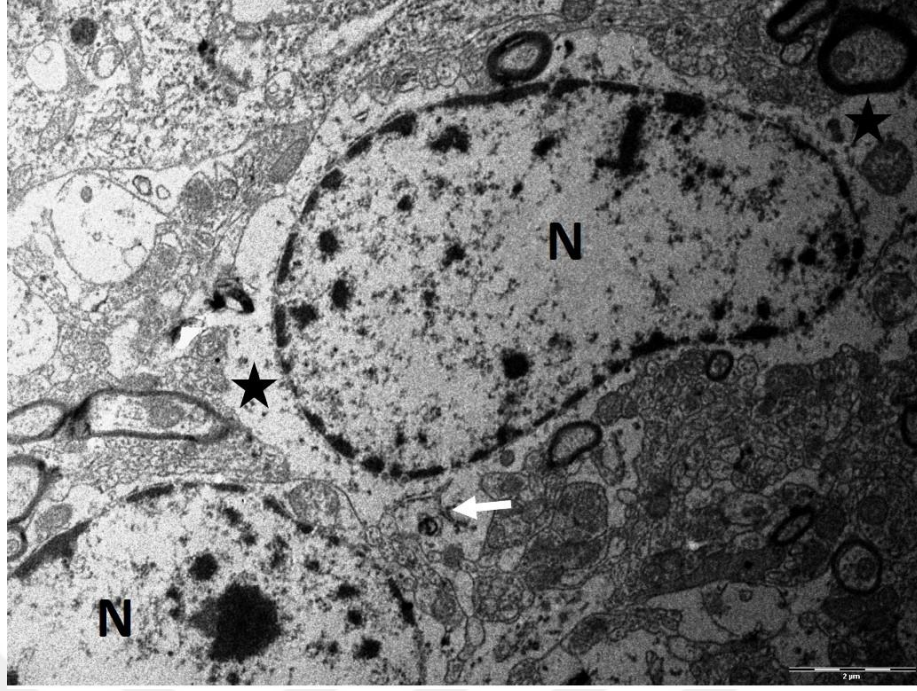
**Şekil 4.20.** Sİ3 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleus (N), nukleus sınırında düzensizlik (ok başı), mitokondriyonlarda krista kaybı (ok), granüler endoplazmik retikulum dilatasyonu (yıldız), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)



**Şekil 4.21.** Sİ3+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(İntrasitoplazmik ödem ve organel kaybı (yıldız), otofagozom-lizozom (ok), uranil asetat-kurşun sistrat, x6300)

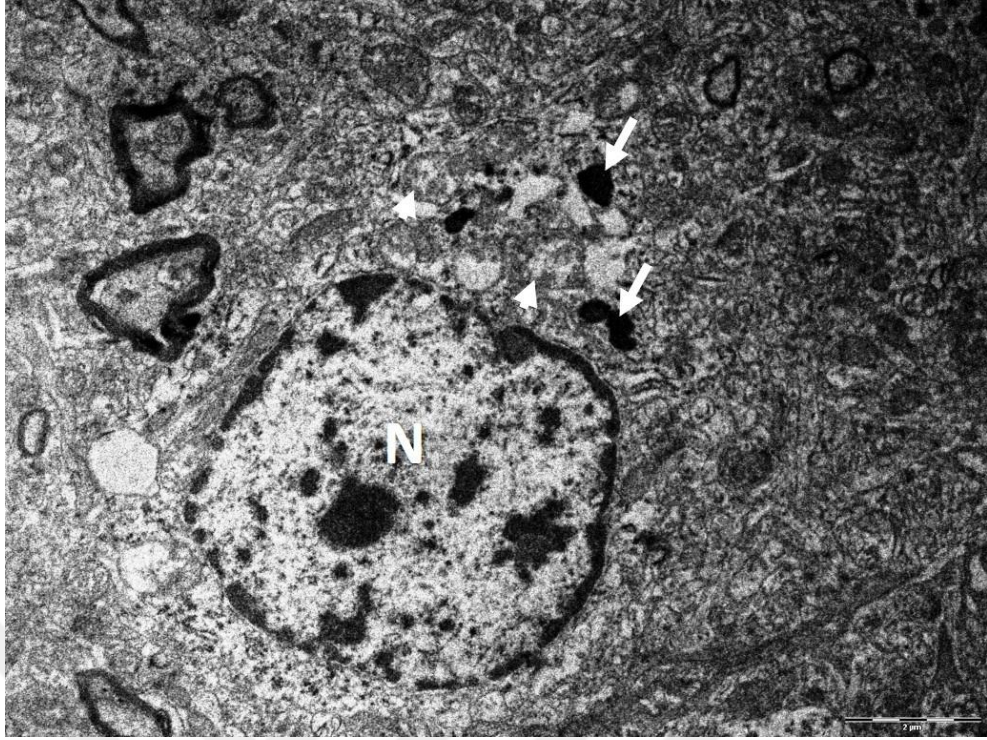


**Şekil 4.22.** S13+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleusta kromatolizis ve periferal kromatin yoğunlaşması (N), perinuklear alanda İntrasitoplazmik ödem ve organel kaybı (yıldız), granüler endoplazmik retikulum hasarı (ok), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)

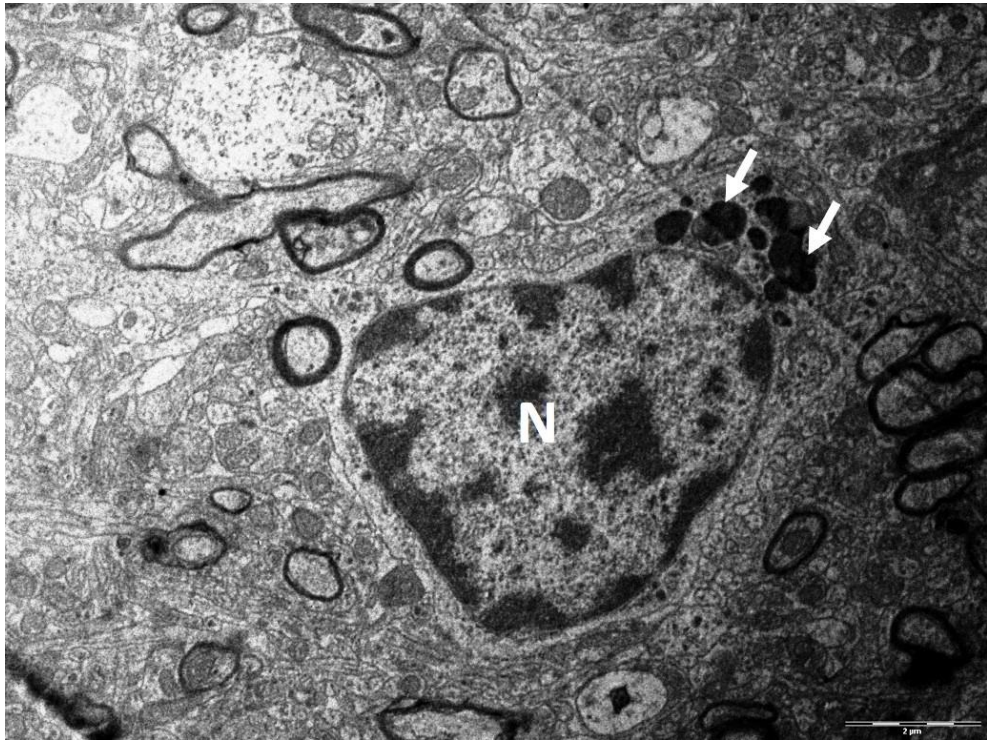
S13+Mel grubuna ait kesitlerin transmisyon elektron mikroskopik incelenmesinde nöronların sitoplazmasında lizozom ve otofagozomlar izlenmekle birlikte S13 ve S13+EtOH gruplarındakine göre genel olarak daha az sayıda ve daha küçük boyutlarda saptandı. Nöronlarda intrasitoplazmik ödem ve organel hasarı minimal düzeyde olup bazı mitokondrilerde kısmi krista hasarı gözlemlendi. Genel olarak nöronların nukeus sınırları düzgün, karyoplazma ve kromatini normal görünümde değerlendirildi. Miyelinli aksonlarda miyelin kılıflar kontrol ve sham gruplarında gözlenenenden daha ince ancak düzgün ve homojen elektron yoğunlukta izlendi.





**Şekil 4.23.** Sİ3+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

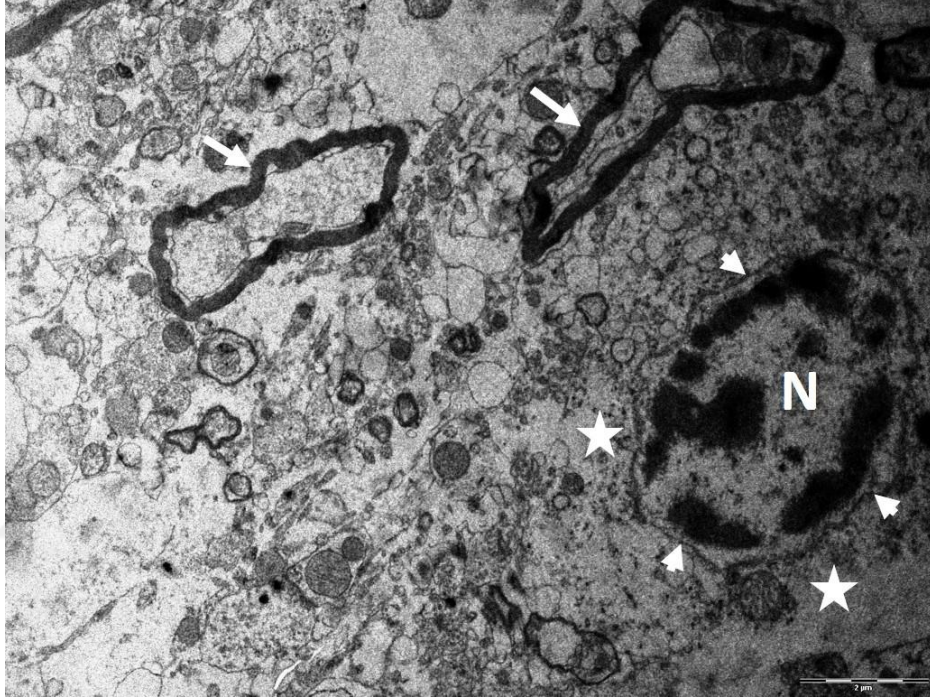
(Nukleus (N), lizozom (ok), mitokondrilerde krista hasarı (ok başı), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)



**Şekil 4.24.** Sİ3+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleus (N), lizozom (ok), mitokondrilerde krista hasarı (ok başı), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)

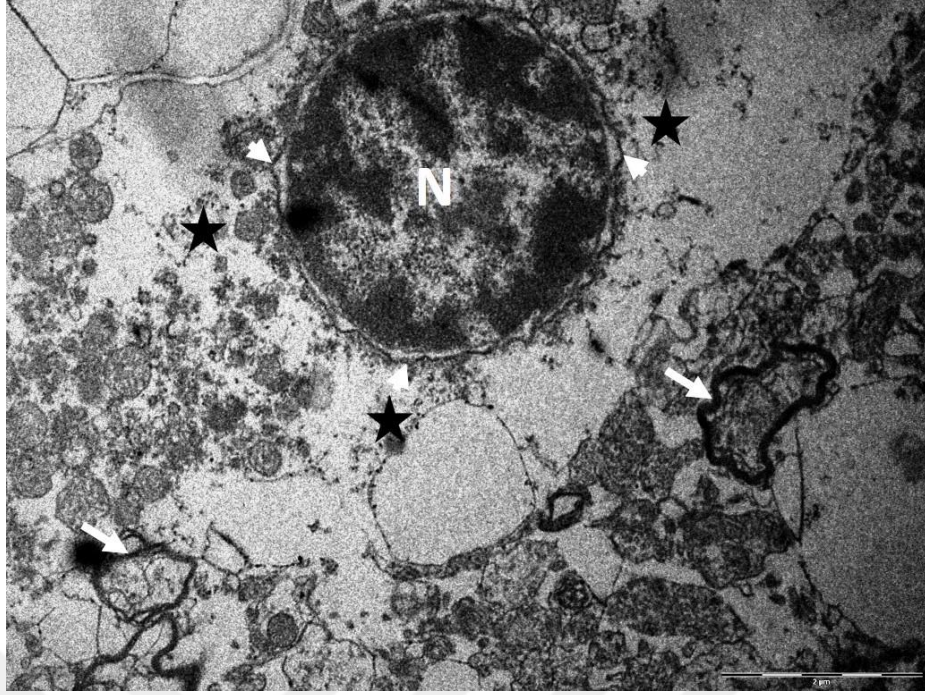
Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına ait kesitlerin transmisyon elektron mikroskopik incelenmesinde nöron ve glia hücrelerinde yaygın şekilde intrasitoplazmik ödem ve organel hasarı saptandı. Nöron sitoplazmalarında yaygın şekilde farklı genişliklerde vakuoller izlendi. Bu vakuollerin içinde ve çevresinde dejenere organel yapıları tespit edildi. Ayrıca nekrotik dejenerasyona uğramış nöronlar saptandı. Miyelinli aksonların miyelin kılıfları, ince, düzensiz görünümde olup yer yer miyelin tabakaları arasında ayrılmalar dikkati çekti.



**Şekil 4.25.** Sİ7 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

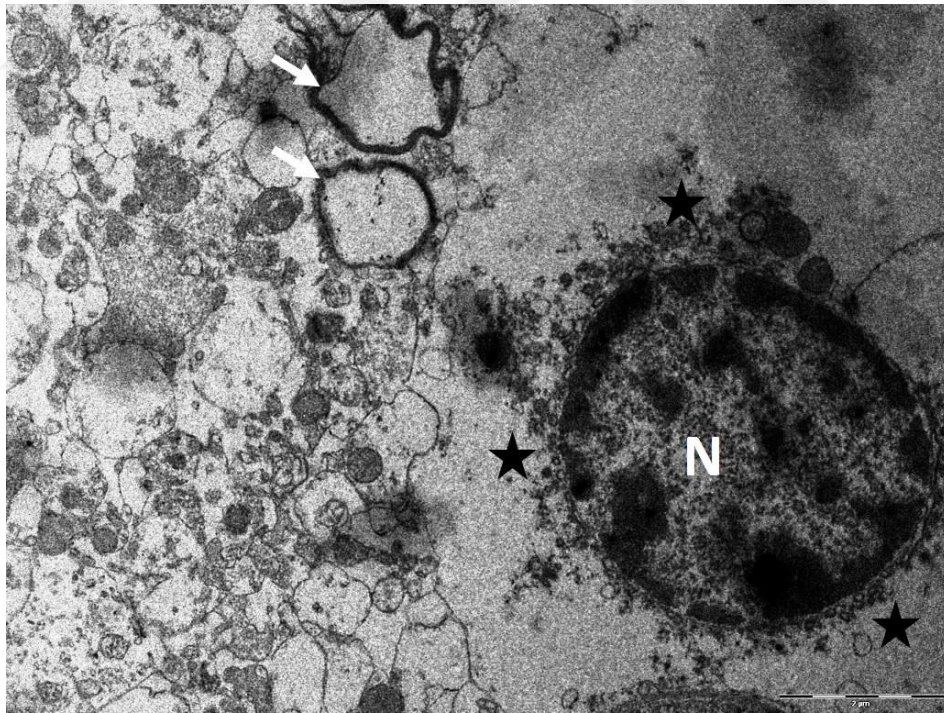
(Nukleusta periferik kromatin yoğunlaşması (N), nukleus zarında düzensizlik-hasar (ok başı, miyelinli akson (ok), perinuklear alanda intrasitoplazmik ödem ve organel kaybı (yıldız)., uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)





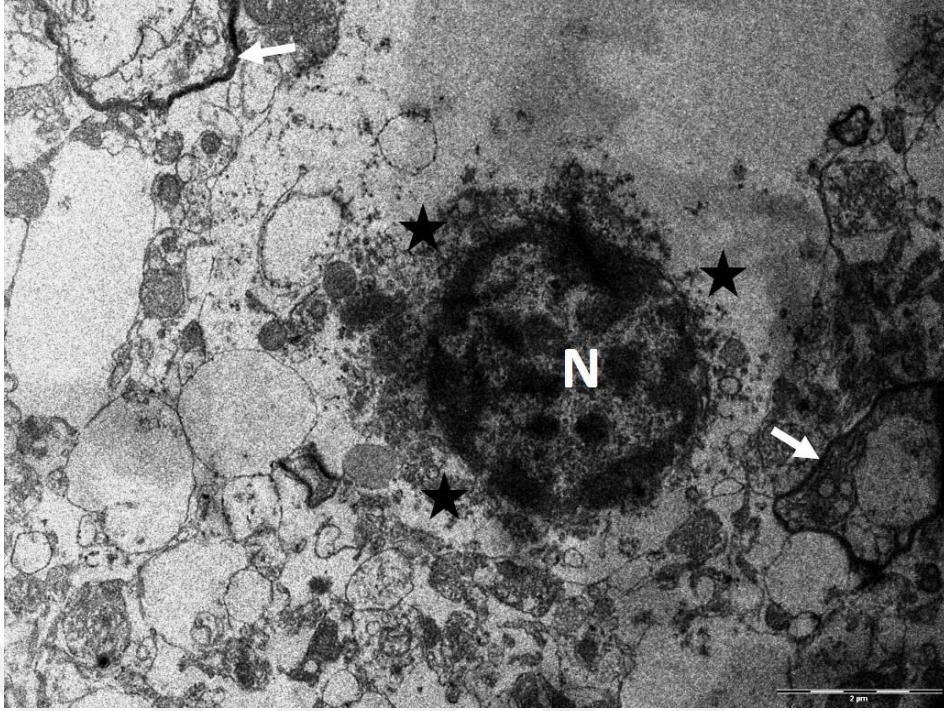
**Şekil 4.26.** S17 grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleus (N), nukleus zarında düzensizlik (ok başı), miyelinli akson (ok), perinuklear alanda intrasitoplazmik ödem ve organel kaybı (yıldız), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)



**Şekil 4.27.** S17+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleus (N), nukleus zarında düzensizlik (ok başı), miyelinli akson (ok), perinuklear alanda intrasitoplazmik ödem ve organel kaybı (yıldız), uranil asetat-kurşun sitrat, x8000)

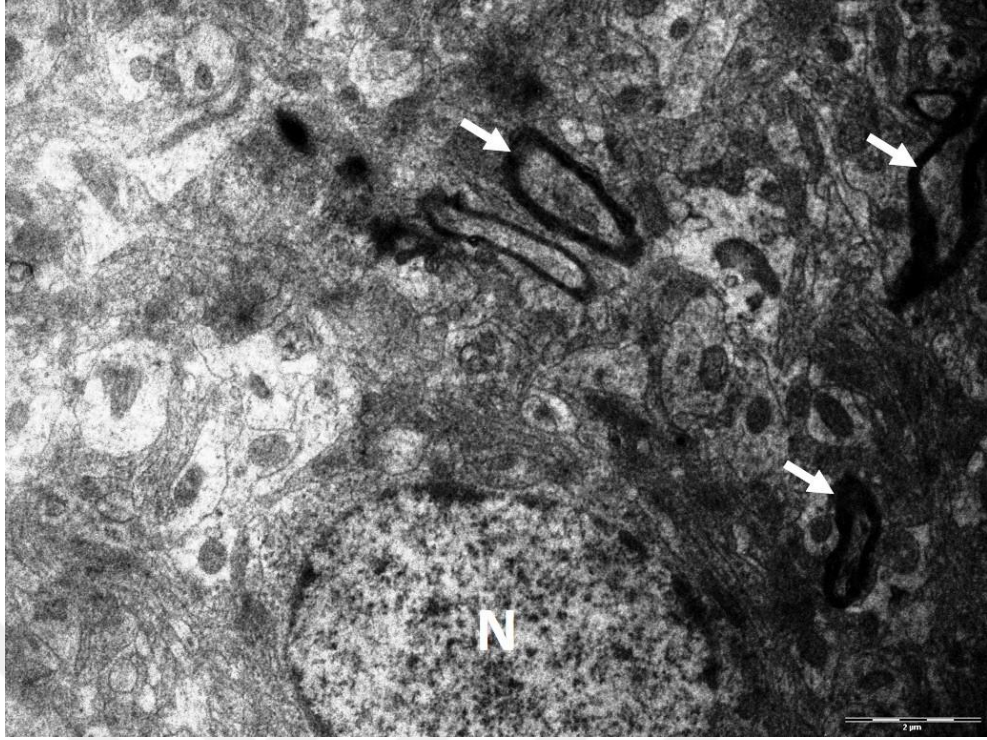


**Şekil 4.28.** Sİ7+EtOH grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleus (N), nukleus zarında düzensizlik (ok başı), miyelinli akson (ok), perinuklear alanda intrasitoplazmik ödem ve organel kaybı (yıldız), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)

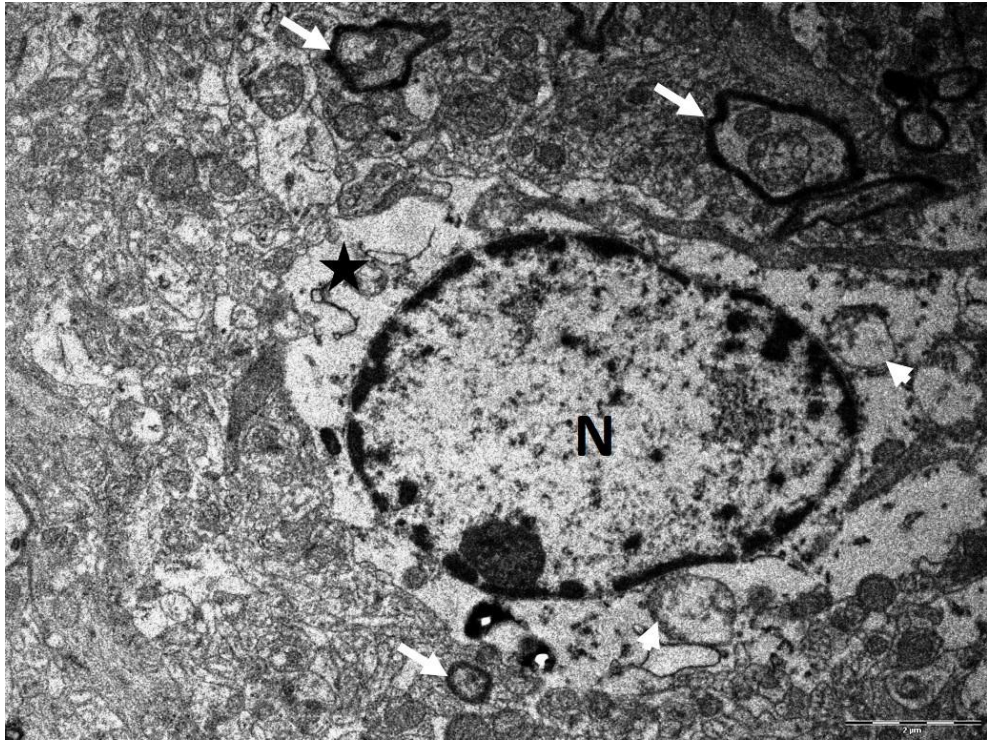
Sİ7+Mel grubuna ait kesitlerin transmisyon elektron mikroskopik incelenmesinde nöronların sitoplazmasında lizozom ve otofagozomlar izlendi. Bazı nöronlarda perinuklear alanda intrasitoplazmik ödem ve organel hasarı tespit edildi. Yer yer mitokondrielerde dilatasyon ve kısmi krista hasarı gözlemlendi. Nöron nukleusları genel olarak ökromatik görünümde ve normal yapıda izlenmekle birlikte özellikle intraselüler ödem ve organel hasarı görülen nöronların nukleuslarında periferik kromatin yoğunlaşması dikkati çekti. Miyelinli aksonların miyelin kılıfları genel olarak Sham Sİ grubundan daha ince ancak düzgün-homojen görünümde izlendi. Miyelin kılıfların, Sİ3+Mel grubundaki ile benzer yapıda olduğu değerlendirildi.





**Şekil 4.29.** S17+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleus (N), miyelinli akson (ok), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)



**Şekil 4.30.** S17+Mel grubunun transmisyon elektron mikroskop görüntüsü

(Nukleusta periferel kromatin yoğunlaşması (N), miyelinli akson (ok), perinuklear alanda intrasitoplazmik ödem ve organel kaybı (yıldız), mitokondrilerde krista kaybı (ok başı), uranil asetat-kurşun sitrat, x6300)



## 5. TARTIŞMA

Son on yılda yapılan çalışmalarla birlikte melatoninin çok güçlü bir serbest radikal temizleyici ve anti-oksidan olduğu kanıtlanmıştır. Melatoninin oksiradikaller ve peroksinitrit üretimini engelleyerek inme nedeniyle nöronların kaybına karşı doğrudan koruma sağladığı belirtilmiştir. Son zamanlarda melatoninin iskemik inmeye karşı olan nöroproteksiyonunu mitokondriyal sitokrom-c salınımını inhibe ederek ve inflamatuvar yanıtları azaltarak gösterdiği belirtilmiştir (167). Ayrıca yine son yıllarda yapılan çalışmalar kan beyin bariyerini kolayca geçebilen melatonin ve metabolitlerinin anti-inflamatuvar, anti-oksidatif, anti-apoptotik ve analjezik gibi özelliklere sahip olduğunu ve otofaji üzerinden iskemik hasara karşı koruyucu etkiler gösterebileceğini ileri sürmüştür (146, 168).

### 5.1. Melatoninin Nörolojik Defisit Skoru, Rotarod Test Süresi, Yapışkan Çıkarma Test Süresi ve İnfarkt Alanı Üzerine Etkisi

Serebral iskemi/reperfüzyon modelinde melatonin enjeksiyonu sonrası davranış testlerinin incelendiği çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatürde genellikle 24 saat reperfüzyon sağlanarak testler sadece bir kere yaptırılmıştır. Ayrıca serebral iskemi/reperfüzyon modelinde melatonin enjeksiyonu sonrası infarkt alanının incelendiği çalışmalarda genellikle 24 saat reperfüzyon sağlanarak infarkt alanı belirlenmiştir. Yapılan 120 dk'lık serebral iskemi/reperfüzyon çalışmalarında iskemiden önce 7 gün boyunca 10 mg/kg/gün (146), iskemiden önce tek doz 5 mg/kg (169), pinealektomi yapılan sıçanlarda iskemiden ve reperfüzyondan önce 4 mg/kg (155), serebral iskemiden 90 dk sonra, reperfüzyonun başlama anında ve reperfüzyon başladıktan 60 dk sonra 20 mg/kg (170) ve iskeminin başlama anında, iskemi başladıktan 60 dk sonra, reperfüzyonun başlama anında ve reperfüzyon başladıktan 60 dk sonra 20 mg/kg (171), konsantrasyonlarında melatonin uygulanmıştır. Bu çalışmalarda reperfüzyonun 24. saatinde yapılan testlerde melatonin enjeksiyonunun nörolojik defisit skorunu ve rotarod test süresini geliştirdiğini (170) göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmalarda 24 saatlik reperfüzyon sonunda dekapite edilen hayvanların beyinlerinde oluşan infarkt alanı da belirlenmiş ve melatonin uygulamasının infarkt alanını azalttığı tespit edilmiştir (146,

155, 170). Yapılan 90 dk'lık serebral iskemi/reperfüzyon çalışmalarında da iskeminin 60. dakikasında 5 mg/kg ve 10 mg/kg (149), iskemi sonrası 5 mg/kg (172), iskemi başlamadan 6 gün önce elektro akupunktur ve 30 dk önce 10 mg/kg (173) intraperitoneal melatonin enjeksiyonundan 24 saat sonra hayvanlara nörolojik muayene yapılmış ve sonra dekapite edilmişlerdir. Bu çalışmalarda da melatonin uygulamasının hayvanların nörolojik defisit skorunu geliştirdiği ve infarkt alanını azalttığı, bir çalışmada ise doz bağımlı olarak nörolojik defisit skorunu geliştirip, infarkt alanını azalttığı (149) belirtilmiştir. Ayrıca yapılan 60 dk'lık bir serebral iskemi/reperfüzyon çalışmasında iskemiden 60 dk sonra (174), bir çalışmada reperfüzyonun başlama anında 5 mg/kg (175) ve 30 dk'lık bir serebral iskemi/reperfüzyon çalışmasında da iskeminin ve reperfüzyonun başlama anlarında 10 mg/kg (176) melatonin enjeksiyonundan 24 saat sonra hayvanlara yapılan nörolojik muayenede melatonin gruplarının nörolojik defisit skorunun ve rotarod test süresinin (174) geliştiği, hayvanların infarkt alanının da azaldığı belirtilmiştir.

Serebral iskemi/reperfüzyon çalışmalarında 24 saatten daha uzun reperfüzyon sağlanıp nörolojik defisit skorum ve davranış testlerinin incelendiği çalışmalar oldukça sınırlıdır. Örneğin bu çalışmalardan bir tanesinde 60 dk'lık serebral iskemi modelinde reperfüzyon başlamadan önce 20 mg/kg melatonin uygulanmış ve reperfüzyonun 5. gününde hayvanlara nörolojik değerlendirme yapılmış ve hayvanlar dekapite edilmiştir. Melatonin grubunun nörolojik defisit skorunun geliştiği ve infarkt alanının azaldığı tespit edilmiştir (177). Liu ve ark.'da (167), distal middle serebral arter oklüzyonundan sonra reperfüzyonun başlama anında ve 24 saat sonra 20 mg/kg intraperitoneal olarak melatonin uygulamışlar. Reperfüzyonun 1. ve 3. gününde yapılan testlerde melatonin grubunun nörolojik defisit skorunun ve yapışkan çıkarma test süresinin azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca reperfüzyonun 3. gününde dekapite edilen hayvanların infarkt alanının azaldığı tespit edilmiştir (167). Yapılan başka bir çalışmada 30 dk'lık serebral iskemi sonrası 29 gün boyunca intraperitoneal 4 mg/kg/gün melatonin uygulanmış ve hayvanlara reperfüzyonun 7. ve 30. günlerinde rotarod testi yaptırılmıştır. Bu çalışmada melatonin uygulamasının rotarod test süresini 7. ve 30. günlerde arttırdığı ifade edilmiştir (159). 90 dk'lık serebral iskemi sonrası 7 gün boyunca 5 mg/kg/gün melatonin uygulanan bir çalışmada da sıçanlara reperfüzyonun 3. ve 7. gününde yapılan testlerde melatonin uygulanan sıçanların nörolojik defisit skorunun azaldığı bulunmuştur. Reperfüzyonun 7. gününde hayvanlara rotarod testi yaptırıldıktan sonra dekapite edilmiştir. Melatonin uygulamasının rotatod test süresini arttırdığı ve infarkt alanını azalttığı belirtilmiştir (178).

Yaptığımız bu çalışmada 3 ve 7 gün reperfüzyon süresince uygulanan melatoninin hayvanların nörolojik defisit skoru, rotarod ve yapışkan çıkarma test süresi üzerine olan etkileri gün-gün incelendi.

Çalışmamızda nörolojik defisit skorlaması bakımından gruplar karşılaştırıldığında, Sham Sİ grubunun nörolojik defisit skoru 1.ve 7. günler arasında tüm gruplara göre istatistiksel olarak düşük bulundu ancak hem 3 gün hem de 7 gün reperfüzyon sağlanan gruplar karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamızın sonuçlarına göre 90 dk'lık serebral iskemi sonrası 3 ve 7 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin uygulamasının nörolojik defisit skorlaması üzerine anlamlı bir etki göstermediğini söyleyebiliriz. Reperfüzyon sürecinde gün-gün olarak karşılaştırmada Sİ7+Mel grubunun nörolojik defisit skorunda bir azalma söz konusudur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Nörolojik defisit skorlamasının gün-gün azalması göz önünde bulundurulduğunda reperfüzyon süreci 7 günden daha uzun olsaydı melatoninin istatistiksel olarak anlamlı etkisinin gözlenebileceği düşüncesindeyiz. Bugüne kadar yapılan 90 dk'lık serebral iskemi çalışmalarında melatonin uygulamasının 24 saat sonra (149, 172, 173) ve reperfüzyonun 3. gününde (178) nörolojik defisit skorunu geliştirdiği belirtilmiştir. Bu anlamda çalışmamız literatürde yer alan çalışmalarla uyum göstermemektedir.

Çalışmamızda rotarod ve yapışkan çıkarma test süresi bakımından gruplar karşılaştırıldığında, Sham Sİ grubunun 1. ve 7. günler arasında tüm gruplara göre rotarod test süresinin yüksek olduğu, yapışkan çıkarma test süresinin ise düşük olduğu belirlendi. 3 gün reperfüzyon sağlanan Sİ3, Sİ3+EtOH ve Sİ3+Mel grupları rotarod ve yapışkan çıkarma test süresi bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Reperfüzyon süresi 7 gün olan gruplar karşılaştırıldığında ise 5., 6. ve 7. günlerde Sİ7+Mel grubunun Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre rotarod test süresinin yüksek olduğu, yapışkan çıkarma test süresinin ise düşük olduğu tespit edildi. Çalışmamızın sonuçlarına göre 90 dk'lık serebral iskemi sonrası 3 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin uygulamasının rotarod ve yapışkan çıkarma test süresi üzerine olumlu etkiler göstermediğini söyleyebiliriz. Ancak reperfüzyon sürecinde 7 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin uygulamasının 5. günden itibaren etkisini göstermeye başladığını, rotarod test süresini arttırdığını ve yapışkan çıkarma test süresini azalttığını söyleyebiliriz. Literatürde 90 dk'lık serebral iskemi sonrası 7 gün boyunca 5 mg/kg/gün melatonin uygulanan bir çalışmada yalnızca 7. günde rotarod testi uygulanmış ve melatonin uygulamasının rotatod test süresini arttırdığı belirtilmiştir (178). Ayrıca

serebral iskemi sonrası melatoninin yapışkan çıkarma testi üzerine etkisinin incelendiği yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada serebral arter oklüzyonundan sonra reperfüzyonun başlama anında ve 24 saat sonra 20 mg/kg melatonin uygulanmış ve melatonin verilen grupta yapışkan çıkarma test süresinin 1. ve 3. gününde azaldığı bildirilmiştir (167). Sonuçlarımıza göre 10 mg/kg melatonin uygulaması motor koordinasyonu belirlemek için yaptığımız test olan rotarod testi ve somatosensoriyel ihmali belirlemek için yaptığımız test olan yapışkan çıkarma testi üzerine olan etkisi 5. günden itibaren göstermeye başlamıştır. Kılıç ve ark. (159), melatoninin iskemi sonrası nöronal hücre ölümünü azaltıp, nörogenezisi uyararak hayvanların motor koordinasyonlarını geliştirdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca melatonin uygulamasının omurilik yaralanmasında lokomotor iyileşmeyi teşvik etmek için apoptoz aracılı hücre ölümünü azaltıp, otofajiyi indükleyerek hasarlı nöronların iyileştirilmesinde faydalı olabileceği gösterilmiştir (179). Bu çalışmalar ile birlikte bizim sonuçlarımız da göz önünde bulundurulduğunda 90 dk'lık iskemi sonrası 10 mg/kg melatonin uygulamasının 5. günden itibaren otofaji aracılığıyla hasarlı organeller ve proteinler bulunduran nöronların kurtarıldığı, nörogenezisin uyarılarak motor koordinasyonların tekrar kademeli olarak geri kazanıldığını söylebiliriz.

Ayrıca yaptığımız bu çalışmada 3 ve 7 gün reperfüzyon süresince uygulanan melatoninin hayvanların beyinde oluşan infarkt alanı üzerine olan etkisi incelendi.

İnfarkt alanı bakımından gruplar karşılaştırıldığında Sİ3, Sİ3+EtOH ve Sİ3+Mel gruplarının infarkt alanının Sham Sİ grubuna göre yüksek olduğu tespit edildi. Bununla beraber Sİ3+Mel grubunun infarkt alanının da Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre düşük olduğu belirlendi. Ayrıca Sİ7, Sİ7+EtOH ve Sİ7+Mel gruplarının infarkt alanının Sham Sİ grubuna göre yüksek olduğu bulundu. Bununla beraber Sİ7+Mel grubunun infarkt alanının Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre düşük olduğu belirlendi. Çalışmamızın sonuçlarına göre 90 dk'lık serebral iskemi sonrası 3 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin uygulamasının infarkt alanını azalttığını, 7 gün boyunca 10 mg/kg/gün melatonin uygulamasının ise infarkt alanını çok daha fazla azalttığını söyleyebiliriz. Ayrıca reperfüzyon süresi uzadıkça infarkt alanında bir miktar azalmanın görülebileceğini ancak melatonin uygulamasının infarkt alanındaki azalmayı çok daha büyük oranda gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. Bugüne kadar yapılan 90 dk'lık serebral iskemi/reperfüzyon çalışmalarında intraperitoneal melatonin enjeksiyonunun 24 saat sonra infarkt alanını azalttığı belirtilmiştir (149, 172, 173). Serebral iskemi/reperfüzyon çalışmalarında 24 saatten daha uzun reperfüzyon sağlanan çalışmalardan birisinde

reperfüzyonun 3. gününde (167), bir diğesinde ise reperfüzyonun 5. gününde infarkt alanı belirlenmiş ve melatonin verilen gruplarda infarkt alanının azaldığı bildirilmiştir (177). Bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada da 90 dk'lık serebral iskemi sonrası 7 gün boyunca 5 mg/kg/gün melatonin uygulanmış ve melatoninin infarkt alanını azalttığı belirtilmiştir (178). Bu anlamda çalışmamız literatürdeki çalışmalar ile uyum göstermektedir. Literatürde melatoninin mitokondriden sitokrom-c salınımını önleyerek, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 seviyesini arttırıp, pro-apoptotik proteinler olan kaspazları inhibe ederek nöroproteksiyon sağladığı belirtilmiştir (167, 180, 181). Sonuçlarımıza göre 90 dk'lık iskemi sonrası 10 mg/kg melatonin uygulaması sayesinde apoptozun inhibe edilerek penumbra alanında nöronal hücre kaybının önüne geçildiği ve otofaji aracılığıyla da penumbra alanındaki hasarlanmış nöronların geri kazanılarak infarkt alanının azaldığı söylenebilir. Melatonin verilen gruplarda azalan infarkt alanı göz önünde bulundurulduğunda, penumbra alanındaki nöronların geri kazanılmasının 5. günden itibaren motor koordinasyon (rotarod testi) ve duysal fonksiyonlarda (yapışkan çıkarma testi) olan iyileşmeye yansıdığı söylenebilir.

## **5.2. Melatoninin Otofaji Üzerine Etkisi**

Son zamanlarda yayınlanan çok sayıda çalışma serebral iskemide otofajinin koruyucu bir rol oynadığını savunurken (182-184), çok sayıda çalışma da otofajinin serebral iskemide bir hücre ölüm yolağı olarak rol oynadığını belirtmektedir (185-187). Serebral iskemide melatoninin otofaji yolağı üzerine etkili olabileceği ileri sürülmüş ancak bu çalışmalarda otofajinin serebral iskemide yararlı mı yoksa zararlı mı olduğu henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Serebral iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulan bir çalışmada 120 dakikalık iskemiden 7 gün önce 10 mg/kg melatonin uygulanmış ve 24 saatlik reperfüzyon sürecin sonunda otofaji üzerine etkisi incelenmiştir. İskemi/reperfüzyon grubunun Beclin-1, LC3-II/I protein seviyelerinin ve otofagolizom seviyelerinin yüksek olduğu ancak melatonin verilen grupta bu parametrelerin azaldığı ifade edilmiştir. Çalışmada melatoninin endoplazmik retikulum-bağımlı otofajiyi azalttığı ileri sürülmüştür (146). Yang ve ark.'da (169), 120 dk'lık serebral iskemi/reperfüzyon çalışmasında iskemi başlamadan önce 5 mg/kg melatonin uygulamışlar ve 24 saat sonra LC3-I/II ve p62 seviyeleri üzerine olan etkisi incelemişlerdir. 5 mg/kg melatonin uygulamasının LC3-II protein seviyesini azaltıp, p62 protein seviyesini arttırarak otofajiyi inhibe ettiğini ve serebral iskemide koruyucu rol

oyunadığını ileri sürmüşlerdir (169). Başka bir serebral iskemi/reperfüzyon çalışmasında ise 90 dk'lık iskeminin 60. dakikasında intraperitoneal 5 ve 10 mg/kg konsantrasyonlarında melatonin enjeksiyonunun otofaji üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada 24 saatlik reperfüzyon sürecinin sonunda 5 mg/kg melatonin enjeksiyonunun LC3-II/I protein seviyesini ve LC3 pozitif hücre sayısını değiştirmediği, 10 mg/kg melatonin enjeksiyonunun Beclin-1 protein seviyesini, Beclin-1 pozitif hücre sayısını ve otofagozom sayısını azalttığı gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda melatonin uygulamasının otofajiyi inhibe ederek iskemik hasara karşı koruyucu rol oynayabileceği bildirilmiştir (149). Lin ve ark. (188), 50 dk'lık serebral iskemi oluşturduktan 90 dk sonra 50 mg/kg; 1. ve 2. günde de 20 mg/kg melatonin uygulamışlar. Lin ve ark. ilk 2 gün melatonin uygulamalarına rağmen LC3-II/I oranını iskemiden 28 gün sonra belirlemişlerdir. LC3-II/I oranını azaldığını belirleyen Lin ve ark. otofaji için hücre ölüm yolağı ya da hücre sağ kalım yolağı olarak bir çıkarımda bulunmamışlardır (188).

Bugüne kadar melatoninin otofajinin rolü üzerine olan etkisi yalnızca serebral iskemi/reperfüzyon hasarında incelenmemiştir. Hipoksik-iskemi modellerinde de melatoninin otofaji üzerine olan etkisi incelenmiştir. Hu ve ark. (189), neonatal serebral hipoksik-iskemi modelinde hipoksik-iskemiden bir saat önce 15 mg/kg melatonin uygulamışlar ve melatonin uygulamasının 24 saat sonra Beclin-1 ve LC3-II/I ve caspase-3 protein seviyelerini azalttığını, p62 protein seviyesini de arttırdığını ifade etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda da melatonin uygulamasının otofajiyi ve apoptozu inhibe ederek hipoksik-iskemi hasarını azaltabileceğini ileri sürmüşlerdir (189). Başka bir neonatal serebral hipoksik-iskemi modelinde ise hipoksik-iskemiden 5 dakika sonra tek doz 15 mg/kg melatonin uygulandıktan bir saat sonra hayvanlar dekapite edilerek apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü azalttığı, LC3-II/I seviyesini arttırıp p62 seviyesini azaltarak otofajik aktivasyonu arttırdığı ve böylece koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir (190).

Yaptığımız bu çalışmada 3 ve 7 gün reperfüzyon süresince uygulanan melatoninin Beclin-1, LC3-I/II, p62, cleaved caspase-3 seviyeleri ve transmisyon elektron mikroskopik bulguları üzerine olan etkisi incelendi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre Sİ3+Mel grubunun Sİ3 ve Sİ3+EtOH gruplarına göre Beclin-1 ve LC3-II protein seviyelerinin ve pozitif hücre sayılarının arttığı, p62 ve cleaved caspase-3 protein seviyelerinin ve pozitif hücre sayılarının da azaldığı belirlenmiştir. Aynı şekilde Sİ7+Mel grubunun Sİ7 ve Sİ7+EtOH gruplarına göre Beclin-1 ve LC3-II protein seviyelerinin ve pozitif hücre sayılarının yüksek olduğu, p62 ve cleaved caspase-3 protein seviyelerinin ve pozitif hücre sayılarının da düşük olduğunu

belirledik ( $p < 0.05$ ). Sonuçlarımıza göre 3 gün melatonin uygulamanın otofajiyi uyardığını ve 7 gün melatonin uygulamasının otofaji seviyesini daha fazla arttırdığını söyleyebiliriz. Ayrıca 3 günlük reperfüzyon sürecinde cleaved caspase-3 protein seviyesinin arttığını ancak devam eden reperfüzyon sürecinde zamanla azaldığı da belirlendi. Zhang ve ark. (145), herhangi bir ajan vermeden yalnızca otofajinin süre ile olan ilişkisini incelediği çalışmada kalıcı serebral iskemi sonrası 7 gün reperfüzyon sağlayarak gün-gün LC3-II ve cleaved caspase-3 protein seviyelerini incelemişlerdir. İskemi sonrası LC3-II ve cleaved caspase-3 protein seviyelerinin ilk 12 saat içerisinde beraber arttığını, 4 gün sonra cleaved caspase-3 protein seviyesinin azaldığını, LC3-II protein seviyesinin ise 3. günde çok büyük oranda azaldığını ancak 4. günden itibaren tekrardan arttığını ifade etmişlerdir (145). Biz de penumbra alanında melatoninin otofaji üzerine olan etkisini incelediğimiz bu çalışmada 3 ve 7 günlük reperfüzyon sürelerinin karşılaştırılması bakımından Zhang ve ark.'nın yaptıkları çalışma sonucu ile uyum göstermektedir. Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada LC3-II protein seviyesinin ilk 5 saat içerisinde pik yaptığını ve 24 saat boyunca yüksek kaldığını göstermişlerdir (145). Serebral iskemide melatonin verilip otofajinin incelendiği bu çalışmalarda 24 saat reperfüzyon yapılmıştır (146, 149, 169). Ancak ilk 24 saatte hücre ölüm yolağı bakımından otofaji ve apoptozun ayırımını yapmak oldukça zor olabilir çünkü bir çalışmada diğer organlara göre nöronal otofajinin uyarılmasının daha geç olduğu, 48 saat sonra indüklendiği belirtilmiştir (191). Fizyolojik stres koşulları hücrenin adaptif stres şartlarını aştığı zaman apoptoz ile birlikte otofaji bir hücre ölüm yolağı davranabilmektedir. Bu nedenle serebral iskemide ilk 24 saatte otofaji incelendiğinde hücre ölüm yolağı olarak belirlenebilir. Serebral iskemide otofajinin hücre ölüm yolağı mı hücre sağ kalım yolağı mı olduğunun açıklanamamasının nedenlerinden bir tanesi de yapılan çalışmalarda otofajinin incelendiği alanın genellikle infarkt alanını da kapsamı olabilir. Ancak otofajinin asıl incelenmesi gereken kısım penumbra alanıdır çünkü infarkt alanı kor bölgesini içerir ve bu hücreler zaten ölüm yolağını seçmektedir. Halbuki penumbradaki hücrelerde uygun otofajik aktivite, hücreyi ölüme götürmek yerine hasarlanmış organelleri ve hücresel kısımları ortadan kaldırarak hücrenin yaşamını devamını sağlayabilmektedir.

Son yıllarda otofaji ile apoptoz arasında karmaşık bir etkileşim olduğu, otofaji ile apoptozun ortak moleküler indükleyicileri ve düzenleyici mekanizmaları paylaşabileceği ve otofajinin kaspaz-aracılı apoptozu modüle edebileceği bildirilmiştir (192, 193). Yapılan çalışmalarda iskemik beyin hasarı sonrasında nöronal hücre ölümünün apoptoz

temelli olarak gerekleŖtiđi ileri sürlmektedir (194, 195). İŖkemi sırasında nöronlarda artan kalsiyum ile indüklenen mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımı ile caspase-3 aktive edilir (195). Caspase-3, nükleer DNA'yı parçalamak için endonukleazları aktive eden ve bunun sonucunda hücre ölümüne yol açan DNA fragmantasyonunu aktive ettiği için apoptozun yürütücü faktörüdür (194). Ayrıca caspase-3 için Beclin-1 üzerinde iki tane bağlanma bölgesi vardır ve caspase-3 Beclin-1'e bağlanıp yıkımlanmasına neden olursa hücre otofajiyi değil apoptoz yolağını tercih etmektedir (196). Melatoninin anti-oksidatif etkileri olmasının yanı sıra anti-apoptotik protein olan Bcl-2 proteinini indükleyerek ve caspase-3 inhibe ederek apoptozu engelliği ve bu özellikleri sayesinde de nöronlarda nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiŖtir (180, 181).

alıŖmamızın Western Blot ve immünofloresan sonuçlarına göre, Beclin-1 ve LC3 seviyelerinin arttığını, p62 ve cleaved caspase-3 seviyelerinin azaldığını belirledik. Ayrıca transmisyon elektron mikroskop bulgularına göre serebral iskemi gruplarının nöronlarında yer yer intrasitoplazmik ödem ve ödem alanları içinde hasarlı dejenere organel yapıları bulunurken, melatonin verilen gruplarda bu durumun kısmen düzeldiği belirlenmiŖtir. alıŖmamızın sonuçlarına göre, melatonin uygulamasının penumbra alanında cleaved caspase-3 seviyesini azaltıp yani apoptozu inhibe edip, otofajik proteinlerin (Beclin-1 ve LC3-I/II) sentezini uyararak serebral iskemide koruyucu rol oynadığı söylenilebilir.

alıŖmamızda melatonin çözücüsü olarak verilen etanolün istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Beclin-1, LC3 seviyelerini arttırdığı ve p62 seviyesini ise azalttığı belirlenmiŖtir. Xu ve ark. (197), 2019 yılında yaptıkları bir alıŖmada serebral iskemiden önce oral olarak 8 hafta boyunca her gün 0.7 g/kg/gün verilen etanolün iskemi sonrası oluŖan pro-inflamtuar sitokin/kemokinleri azaltıp, anti-inflamtuar sitokin/kemokinleri arttırarak serebral iskemide koruyucu rol oynadığını gstermiŖlerdir. Li ve ark. (198), 2020 yılında yaptıkları bir alıŖmada serebral iskemiden önce oral olarak 8 hafta boyunca her gün 0.7 g/kg/gün verilen etanolün Beclin-1 zerine etki etmediğini ancak cleaved caspase-3 ve LC3 seviyesini azalttığını ifade etmiŖlerdir. Ayrıca hafif etanol tüketiminin iskemi sonrası apoptozu baskılayarak serebral iskemi/reperfüzyon hasarına karŖı koruyabileceğini, ağır etanol tüketiminin ise otofajiyi baskılayarak serebral iskemi/reperfüzyon hasarını Ŗiddetlendirebileceđini belirtmiŖlerdir (198). Bizim sonuçlarımızda göz önünde bulunduurulduğunda etanolün doz bağımlı olarak apoptoz/otofaji üzerine etkilerinin olabileceği söylenilebilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarına göre 90 dk'lık serebral iskemide sonrası melatonin uygulanan gruplarda nörolojik defisit skorlarında düşüş söz konusudur ancak anlamlı bir etki bulunmamıştır.

Çalışmamızda serebral iskemide melatonin uygulamasının 5. günden itibaren rotarod test süresini arttırdığı, yapışkan çıkarma test süresini ise azalttığı belirlenmiştir. Bu sonucumuza göre serebral iskemide sonrası melatoninin 5. günden itibaren otofaji aracılığıyla hasarlı organeller ve proteinler bulundurulmuş nöronların kurtarıldığı, nörogenezisin uyarılarak motor koordinasyonların tekrar kademeli olarak geri kazanıldığı ortaya konmuştur.

Yaptığımız bu çalışmada serebral iskemide sonrası reperfüzyon sürecinde 3 gün melatonin uygulamasının infarkt alanını azalttığı, 7 gün melatonin uygulamasının ise infarkt alanını çok daha fazla azalttığı belirlenmiştir. Reperfüzyon süresi uzadıkça infarkt alanında bir miktar azalmanın görülebileceğini ancak melatonin uygulamasının infarkt alanındaki azalmayı çok daha büyük boyutlarda gerçekleştirdiğini söylenebilir. Bunu da 90 dk'lık iskemide sonrası 10 mg/kg melatonin uygulaması sayesinde apoptozun inhibe edilerek nöronal hücre kaybının önüne geçildiği ve otofaji aracılığıyla hasarlanmış nöronların geri kazanılarak infarkt alanının azaldığı ortaya konmuştur. Bu çalışmalar ve bizim çalışmamız da göz önünde bulundurulduğunda yeni çalışmalar tasarlanırken melatonin çözücüsü olarak etanolün de bir etkisinin olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Otofajinin uyarılmasının nöronal hasarın önlenmesindeki blokajından daha avantajlı olduğu ve otofajinin uyarılmasının serebral iskemiyi takiben nöronal hayatta kalmaya fayda sağladığı belirtilmiştir (145). Sonuçlarımıza göre reperfüzyon süresi ile ilişkili olarak iskemide sonrası otofajinin koruyucu olarak indüklendiğini, otofaji aracılığıyla hasarlı yapıların sindirilerek ortamdaki uzaklaştırıldığını ve infarkt alanının azaldığı ortaya konmuştur. Ayrıca melatonin uygulamasının serebral iskemide apoptozu inhibe edip, otofajik proteinlerin sentezini uyararak serebral iskemide koruyucu rol oynadığı söylenebilir.

Yapılan çalışmalarda melatoninin serebral iskemide tedavi kombinasyonunda yer alması gerektiği belirtilmiştir. Sonuçlarımıza göre 90 dk'lık serebral iskemide sonrası 10 mg/kg/gün melatoninin uygulanmasının otofaji aracılığıyla iskemide sonrası oluşan infarkt

alanının azalmasında ve motor koordinasyonların geri kazanılmasında rol oynadığı ortaya konmuştur. Melatoninin serebral iskemi tedavisinde otofaji aracılı olan etkilerinin daha fazla aydınlatılması gerektiği ve serebral iskeminin tedavisinde moleküler düzeyde önemli roller oynayabileceği düşünülmektedir. Bu alanda yapılacak yeni çalışmalara çalışmamızın da önemli bir referans olabileceği söylenebilir.



## KAYNAKLAR

1. Rawat A. Potential Biomarkers in Stroke and Current Therapeutics *Int J Life Sci Res* 2016,2(4):415-25.
2. Ramos E, Patino P, Reiter RJ, Gil-Martin E, Marco-Contelles J, Parada E, de los Rios C, Romero A, Egea J. Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radic Biol Med* 2017,104:32-53.
3. Li J, Yuan M, Liu Y, Zhao Y, Wang J, Guo W. Incidence of constipation in stroke patients: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2017,96(25):e7225.
4. Cimarosti H, Henley JM. Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation. *Neuroscientist* 2008,14(6):626-36.
5. Duehrkop C, Rieben R. Ischemia/reperfusion injury: effect of simultaneous inhibition of plasma cascade systems versus specific complement inhibition. *Biochem pharm* 2014,88(1):12-22.
6. Watts LT, Lloyd R, Garling RJ, Duong T. Stroke neuroprotection: targeting mitochondria. *Brain sciences* 2013,3(2):540-60.
7. Yemisci Muge GG, Turgay Dalkara. İskemik İnmede Gelişen Fیزیopatolojik Olaylar. *Turkiye Klinikleri (Journal of Neurology)* 2004,2(1):22-30.
8. Pengyue Z, Tao G, Hongyun H, Liqiang Y, Yihao D. Breviscapine confers a neuroprotective efficacy against transient focal cerebral ischemia by attenuating neuronal and astrocytic autophagy in the penumbra. *Biomed Pharmacother* 2017,90:69-76.
9. Deng YH, He HY, Yang LQ, Zhang PY. Dynamic changes in neuronal autophagy and apoptosis in the ischemic penumbra following permanent ischemic stroke. *Neural regen res* 2016,11(7):1108-14.
10. Wei K, Wang P, Miao CY. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury. *CNS Neurosci Ther* 2012,18(11):879-86.
11. Wang P, Shao BZ, Deng Z, Chen S, Yue Z, Miao CY. Autophagy in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 2018,163-164:98-117.
12. Guo Y. Role of HIF-1a in regulating autophagic cell survival during cerebral ischemia reperfusion in rats. *Oncotarget* 2017,8(58):98482-94.

13. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* 2013,20(1):21-30.
14. Lamark T, Kirkin V, Dikic I, Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* 2009,8(13):1986-90.
15. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011,7(3):279-96.
16. Yu J, Bao C, Dong Y, Liu X. Activation of autophagy in rat brain cells following focal cerebral ischemia reperfusion through enhanced expression of Atg1/pULK and LC3. *Mol Med Rep* 2015,12(3):3339-44.
17. Akkoc Y, Gozuacik D. Autophagy and liver cancer. *Turk J Gastroenterol* 2018,29(3):270-82.
18. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Jr., Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, Hoh B, Jauch EJ, Kidwell CS, Leslie-Mazwi TM, Ovbiagele B, Scott PA, Sheth KN, Southerland AM, Summers DV, Tirschwell DL. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2013,44(3):870-947.
19. Pamerter ME, Perkins GA, McGinness AK, Gu XQ, Ellisman MH, Haddad GG. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra. *PloS one* 2012,7(12):e51469.
20. Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, eKelestimur T, Gundogdu RZ, Yulug B, Yilmaz B, Kerman BE, Kilic E. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox Biol* 2017,12:657-65.
21. Lin C, Chao H, Li Z, Xu X, Liu Y, Hou L, Liu N, Ji J. Melatonin attenuates traumatic brain injury-induced inflammation: a possible role for mitophagy. *J Pineal Res* 2016,61(2):177-86.
22. Ding K, Xu J, Wang H, Zhang L, Wu Y, Li T. Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice. *Neurochem Int* 2015,91:46-54.

23. Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY. Melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity. *J Pineal Res* 2012,53(2):138-46.
24. Wei J, Ma LS, Liu DJ, Guo J, Jiang WK, Yu HJ. Melatonin regulates traumatic optic neuropathy via targeting autophagy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017,21(21):4946-51.
25. Chen J, Wang L, Wu C, Hu Q, Gu C, Yan F, Li J, Yan W, Chen G. Melatonin-enhanced autophagy protects against neural apoptosis via a mitochondrial pathway in early brain injury following a subarachnoid hemorrhage. *J Pineal Res* 2014,56(1):12-9.
26. Sun B, Yang S, Li S, Hang C. Melatonin Upregulates Nuclear Factor Erythroid-2 Related Factor 2 (Nrf2) and Mediates Mitophagy to Protect Against Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Med Sci Monit* 2018,24:6422-30.
27. Smith KJ, Ainslie PN. Regulation of cerebral blood flow and metabolism during exercise. *Exp Physiol* 2017,102(11):1356-71.
28. Şahan M, Satar S, Koç AF, Sebe A. İskemik İnme ve Akut Faz Reaktanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2010,19(2):85-140.
29. Dhar R, Diring M. *Neurocritical care:Cerebral Blood Flow Physiology and Metabolism in the Neurocritical Care Unit*. Cambridge: Cambridge University Press; 2019. 11.
30. Rink C, Khanna S. Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxid Redox Signal* 2011,14(10):1889-903.
31. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 2013,36(10):587-97.
32. Balkan S. *Serebrovasküler hastalıklar*. 3. baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009.
33. Oğul E. *Klinik nöroloji*. İstanbul: Nobel&Güneş Tıp Kitabevleri; 2002.
34. Putz R, Pabst R. *Sobotta-Atlas of Human Anatomy: Head, Neck, Upper Limb, Thorax, Abdomen, Pelvis, Lower Limb*; Two-volume set 2006.
35. Yıldırım M. *Resimli İnsan Anatomisi*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi 2015.
36. Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2006,26(7-8):1057-83.
37. Lee RM. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* 1995,66(1):149-73.

38. Wang-Fischer Y. *Manual of stroke models in rats*: CRC press; 2008.
39. Mallick AA, O'Callaghan FJ. The epidemiology of childhood stroke. *Eur J of Paediatr Neurol* 2010,14(3):197-205.
40. Salcı Y, Balkan AF, Ceren AN, Karanfil E, Çetin B, Cengiz MS, Uca AU, Armutlu K. İnme Sonrası Erken Mobilizasyon Hakkında Profesyonel Görüşlerin İncelenmesi. *Dicle Tip Dergisi* 2019,46(2):261-8.
41. Li H, Wu J, Shen H, Yao X, Liu C, Pianta S, Han J, Borlongan CV, Chen G. Autophagy in hemorrhagic stroke: Mechanisms and clinical implications. *Prog Neurobiol* 2018,163-164:79-97.
42. Sekerdag E, Solaroglu I, Gursoy-Ozdemir Y. Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Curr Neuropharmacol* 2018,16(9):1396-415.
43. Van der Cruyssen K, Vereeck L, Saeys W, Remmen R. Prognostic factors for discharge destination after acute stroke: a comprehensive literature review. *Disabil Rehabil* 2015,37(14):1214-27.
44. Phipps MS, Cronin CA. Management of acute ischemic stroke. *BMJ* 2020,368:l6983.
45. Boot E, Ekker MS, Putaala J, Kittner S, De Leeuw FE, Tuladhar AM. Ischaemic stroke in young adults: a global perspective. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry* 2020,91(4):411-7.
46. Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics* 2011,8(3):319-29.
47. Türkiye İstatistik Kurumu Ölüm Nedeni İstatistikleri 2018. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?jsessionid=5MrKpM8YnhgXMJ24m6Ywz63y6Dn9SqLZhzBD1Tv1XKXVTFBK2gZg!-1080899417?id=30626>. Son Erişim Tarihi: 30 Haziran 2020.
48. Altun Y, Aydın İ, Algın A. Adıyaman İlinde İnme Tiplerinin Demografik Özellikleri. *Türk Noroloji Dergisi* 2018,24(1):26.
49. Midi İ, Afşar N. İnme risk faktörleri. *Klinik Gelişim* 2010,10(1):1-14.
50. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MS. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res* 2017,120(3):472-95.
51. Chen RL, Balami JS, Esiri MM, Chen LK, Buchan AM. Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence. *Nat Rev Neurol* 2010,6(5):256-65.

52. Mensah GA. Epidemiology of stroke and high blood pressure in Africa. *Heart* 2008,94(6):697-705.
53. Khare S. Risk factors of transient ischemic attack: An overview. *J Midlife Health* 2016,7(1):2-7.
54. Andersen KK, Andersen ZJ, Olsen TS. Age- and gender-specific prevalence of cardiovascular risk factors in 40,102 patients with first-ever ischemic stroke: a Nationwide Danish Study. *Stroke* 2010,41(12):2768-74.
55. Soler EP, Ruiz VC. Epidemiology and risk factors of cerebral ischemia and ischemic heart diseases: similarities and differences. *Curr Cardiol Rev* 2010,6(3):138-49.
56. Sacco RL, Boden-Albala B, Gan R, Chen X, Kargman DE, Shea S, Paik MC, Hauser WA. Stroke incidence among white, black, and Hispanic residents of an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. *Am J Epidemiol* 1998,147(3):259-68.
57. Atlas SW. *Magnetic resonance imaging of the brain and spine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 773 p.
58. Mendelow AD, Lo EH, Sacco RL, FAAN MMF, Wong LK. *Stroke*. Elsevier Health Sciences; 2015.
59. Ay H, Dalkara T. *Iskemik penumbra ve terapötik zaman aralığını etkileyen faktörler*. 1. Baskı, editor: Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009. 29-36.
60. Chuen R, Chang C. *Neurodegenerative Diseases: Processes, Prevention, Protection and Monitoring*. Hırvatistan: InTech; 2011. 106.
61. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 1977,8(1):51-7.
62. Klehmet J, Harms H, Richter M, Prass K, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A, Meisel C. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 2009,158(3):1184-93.
63. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999,22(9):391-7.
64. Zechariah A, ElAli A, Doepfner TR, Jin F, Hasan MR, Helfrich I, Mies G, Hermann DM. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke* 2013,44(6):1690-7.

65. Yao H, Takasawa R, Fukuda K, Shiokawa D, Sadanaga-Akiyoshi F, Ibayashi S, Tanuma S, Uchimura H. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 2001,91(1-2):112-8.
66. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981,12(6):723-5.
67. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 1994,17(6):251-7.
68. Dirnagl U, Endres M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes. *Stroke* 2014,45(5):1510-8.
69. Endres M, Dirnagl U. Ischemia and stroke. *Adv Exp Med Biol* 2002,513:455-73.
70. Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996,8(3):195-208.
71. Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke* 1995,26(2):318-22; discussion 22-3.
72. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008,55(3):310-8.
73. Aydemir O, Çelebi S. Deneysel retinal iskemi ve reperfüzyon oluşturulan kobaylarda vitamin E türevlerinin glutatyon düzeyine etkisi. *F.Ü. Med J Health Sci* 2002,16(3-4):257-61.
74. Ortadeveci A, Öz S. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Bir Derleme. *Osmangazi Tıp Dergisi* 2017,39(3):115-24.
75. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 2009,22(3):5-14.
76. Nisari M, İnanç N, Soylu M, Yaşar Y, Başmısırlı E, Kavutçu M. İskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda melatoninin böbrek fonksiyonları üzerine etkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2018,27(3):217-20.
77. Ozcan O, Erdal H, Yonden Z. İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. *MKÜ Tıp Dergisi* 2015,6(23):27-33.
78. Akkoç H. Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı. *Dicle Med J* 2008,35(3):211-5.



79. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins basic pathology*. 10. Baskı: Elsevier Health Sciences; 2017.
80. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990,137:1-53.
81. Akkuş İ. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.
82. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J of Biochem Cell Biol* 2007,39(1):44-84.
83. Sugawara T, Chan PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2003,5(5):597-607.
84. Gonzalez B, Leroux P, Lamacz M, Bodenant C, Balazs R, Vaudry H. Somatostatin receptors are expressed by immature cerebellar granule cells: evidence for a direct inhibitory effect of somatostatin on neuroblast activity. *Proc Natl Acad Sci* 1992,89(20):9627-31.
85. Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, Czernska S, Bielewicz J. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. *Int J Neurosci* 2014,124(10):707-16.
86. Chaturvedi M, Kaczmarek L. Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 2014,49(1):563-73.
87. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005,38(11):1433-44.
88. Bayram S. İntestinal İskemi ve Reperfüzyon. *ODÜ Tıp Dergisi* 2015,2(3):166-71.
89. Şenol PŞ, Tunçtan B. Miyokardiyal ve Renal İskemi/Reperfüzyon Zedelenmesi ve Deneysel Modelleri. *Türkiye Klinikleri (J Pharm Sci)* 2016,5(2):93-109.
90. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* 2009,11(13):1050-62.
91. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004,23(16):2891-906.
92. Mak T. The E. Donnall Thomas Lecture--apoptosis: "'tis death that makes life live". *Biol Blood Marrow Transplant* 2003,9(8):483-8.
93. Wang SY, Yu QJ, Zhang RD, Liu B. Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int J Biochem Cell Biol* 2011,43(9):1263-6.

94. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008,132(1):27-42.
95. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon H, Simonsen A, Thorburn AM, Velasco G, Ryan KM, Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO journal* 2015,34(7):856-80.
96. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011,27:107-32.
97. Anding AL, Baehrecke EH. Autophagy in Cell Life and Cell Death. *Curr Top Dev Biol* 2015,114:67-91.
98. Zare-Shahabadi A, Masliah E, Johnson GV, Rezaei N. Autophagy in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 2015,26(4):385-95.
99. Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 2007,6(4):352-61.
100. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010,40(2):280-93.
101. Levine B, Kroemer G. SnapShot: Macroautophagy. *Cell* 2008,132(1):162 e1- e3.
102. Sun Y, Zhu Y, Zhong X, Chen X, Wang J, Ying G. Crosstalk Between Autophagy and Cerebral Ischemia. *Front Neurosci* 2018,12:1022.
103. Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, Vandenabeele P. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy* 2012,8(1):6-17.
104. Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 2008,410(1):1-17.
105. Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 2007,14(9):1576-82.
106. He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* 2010,22(2):140-9.
107. Ruck A, Attonito J, Garces KT, Nunez L, Palmisano NJ, Rubel Z, Bai Z, Nguyen KCQ, Sun L, Grant BD, Hall DH, Melendez A. The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy* 2011,7(4):386-400.

108. Wang W, Fan H, Zhou Y, Duan P, Zhao G, Wu G. Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line. *Mol Med Rep* 2013,7(5):1501-5.
109. Evangelisti C, Evangelisti C, Chiarini F, Lonetti A, Buontempo F, Neri LM, McCubrey JA, Martelli AM. Autophagy in acute leukemias: a double-edged sword with important therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 2015,1853(1):14-26.
110. Jawhari S, Ratinaud MH, Verdier M. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'menage-a-trois'. *Cell Death Dis* 2016,7(10):e2434.
111. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001,2(3):211-6.
112. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol* 2011,12(7):226.
113. Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem* 2012,3(1):1-6.
114. Islam MA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic Regulation of p62 is Critical for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2018,19(5).
115. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett* 2016,21:29.
116. Lippai M, Low P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int* 2014,2014:832704.
117. Ülgenalp O, Koç BT, Oğuzoğlu TÇ. Viral enfeksiyonlarda otofaji. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2018,75(3).
118. Chen W, Sun Y, Liu K, Sun X. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 2014,9(12):1210-6.
119. Hou K, Xu D, Li F, Chen S, Li Y. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: Mechanisms, roles and research methods. *Neurol Sci* 2019,400:72-82.
120. Kang C, Avery L. To be or not to be, the level of autophagy is the question: dual roles of autophagy in the survival response to starvation. *Autophagy* 2008,4(1):82-4.
121. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin--an emerging mystery. *Biochem Pharmacol* 1998,56(10):1265-72.

122. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997,336(3):186-95.
123. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009,61(3):383-410.
124. Semak I, Korik E, Antonova M, Wortsman J, Slominski A. Metabolism of melatonin by cytochrome P450s in rat liver mitochondria and microsomes. *J Pineal Res* 2008,45(4):515-23.
125. Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *Eurasian J Med* 2016,48(2):135-41.
126. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 2011,93(3):350-84.
127. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008,85(3):335-53.
128. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. *The FASEB J* 2010,24(10):3603-24.
129. Sener G. Karanlığın hormonu: melatonin. *J Res Pharm* 2010,14(3):112-20.
130. Kus I, Sarsilmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri (J Med Sci)* 2002,22(2):221-6.
131. Carocci A, Catalano A, Sinicropi MS. Melatonergic drugs in development. *Clin Pharmacol* 2014,6:127-37.
132. Çam A, Erdogan MF. Melatonin. *J Ankara Univ Fac Med* 2003,56(02).
133. Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 1998,2(3):175-90.
134. Özçelik F, Erdem M, Bolu A, Gülsün M. Melatonin: Genel özellikleri ve psikiyatrik bozukluklardaki rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar* 2013,5(2):179-203.
135. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* 2015,61(2-3):77-84.
136. Galano A, Castaneda-Arriaga R, Perez-Gonzalez A, Tan DX, Reiter RJ. Phenolic Melatonin-Related Compounds: Their Role as Chemical Protectors against Oxidative Stress. *Molecules* 2016,21(11).

137. Huang CC, Lai CJ, Tsai MH, Wu YC, Chen KT, Jou MJ, Fu PI, Wu CH, Wei IH. Effects of melatonin on the nitric oxide system and protein nitration in the hypobaric hypoxic rat hippocampus. *BMC Neuroscience* 2015,16:61.
138. Atasoy ÖB, Erbaş O. Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri. *FNG Tıp Dergisi* 2017,3(1):52-62.
139. Gül M, Dikmetaş C, Cander B, Önal MA, DüNDAR ZD, Harmankaya A. Melatonin Poisoning: A Case Report. *J Emerg Med Case Rep* 2012,3(4):132-3.
140. Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Der* 2009,19(3).
141. Özüm Büke Atasoy, Erbaş O. Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri. *FNG Tıp Dergisi* 2017,3(1):52-62.
142. Escribano BM, Colin-Gonzalez AL, Santamaria A, Tunes I. The role of melatonin in multiple sclerosis, Huntington's disease and cerebral ischemia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014,13(6):1096-119.
143. Kourtis N, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* 2009,16(1):21-30.
144. Li H, Qiu S, Li X, Li M, Peng Y. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J Transl Med* 2015,13:359.
145. Zhang P, Yang L, He H, Deng Y. Differential variations of autophagy and apoptosis in permanent focal cerebral ischaemia rat model. *Brain Inj* 2017,31(8):1151-8.
146. Feng D, Wang B, Wang L, Abraham N, Tao K, Huang L, Shi W, Dong Y, Qu Y. Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy via PERK and IRE1 signalings. *J Pineal Res* 2017,62(3).
147. Gao L, Jiang T, Guo J, Liu Y, Cui G, Gu L, Su L, Zhang Y. Inhibition of autophagy contributes to ischemic postconditioning-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats. *PloS one* 2012,7(9):e46092.
148. Arslan AK, Colak C. RAY: Rasgele Atama Yazılımı [Web-tabanlı yazılım] 2019 [Available from: <http://biostatapps.inonu.edu.tr/RAY/>].
149. Zheng Y, Hou J, Liu J, Yao M, Li L, Zhang B, Zu H, Wang Z. Inhibition of autophagy contributes to melatonin-mediated neuroprotection against transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci* 2014,124(3):354-64.

150. Demir M, Yilmaz U, Colak C, Cigremis Y, Ozyalin F, Tekedereli İ, Kilincli A, Sandal S. The effects of lack of melatonin in experimental rat model of Alzheimer's Disease: relationship with FEZ1 gene expression. *Med-Science* 2017,6(2):217-23.
151. Demir M, Yilmaz U, Colak C, Cigremis Y, Ozyalin F, Tekedereli I, Sandal S. Is there a new pathway relationship between melatonin and FEZ1 in experimental rat model of Alzheimer's disease? *Bratisl Med J* 2019,120(1):70-7.
152. Altintas R, Parlakpınar H, Beytur A, Vardi N, Polat A, Sagir M, Odabas GP. Protective effect of dexpanthenol on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Kidney Blood Press Res* 2012,36(1):220-30.
153. Milas U. *The Effects of Melatonin and Memantine on Brain Injury After Stroke*. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Yeditepe Üniversitesi, 2010.
154. Yulug B, Cam E, Yildiz A, Kilic E. Buprenorphine does not aggravate ischemic neuronal injury in experimental focal cerebral ischemia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2007,19(3):331-4.
155. Kilic E, Ozdemir YG, Bolay H, Kelestimur H, Dalkara T. Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999,19(5):511-6.
156. Zhang Y, Cao RY, Jia X, Li Q, Qiao L, Yan G, Yang J. Treadmill exercise promotes neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury via downregulation of pro-inflammatory mediators. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2016,12:3161-73.
157. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986,17(3):472-6.
158. Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Protoc* 1997,2(1):75-84.
159. Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, Guo Z, Abdallah NB, Wolfer DP, Reiter RJ, Hermann DM, Bassetti CL. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 2008,45(2):142-8.
160. Freret T, Valable S, Chazalviel L, Saulnier R, Mackenzie ET, Petit E, Bernaudin M, Boulouard M, Schumann-Bard P. Delayed administration of deferoxamine

- reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur J Neurosci* 2006,23(7):1757-65.
161. Guo Y, Chen X, Li D, Liu H, Ding Y, Han R, Shi Y, Ma X. PR-957 mediates neuroprotection by inhibiting Th17 differentiation and modulating cytokine production in a mouse model of ischaemic stroke. *Clin Experimen Immunol* 2018,193(2):194-206.
  162. Ma J, Zhang L, Niu T, Ai C, Jia G, Jin X, Wen L, Zhang K, Zhang Q, Li C. Growth differentiation factor 11 improves neurobehavioral recovery and stimulates angiogenesis in rats subjected to cerebral ischemia/reperfusion. *Brain Res Bull* 2018,139:38-47.
  163. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986,17(6):1304-8.
  164. Zhang F, Chen J. *Infarct measurement in focal cerebral ischemia: TTC staining*. Springer: Animal Models of Acute Neurological Injuries II 2012, 93-8.
  165. Park S, Shin J, Hong Y, Kim S, Lee S, Park K, Lkhagvasuren T, Lee SR, Chang KT, Hong Y. Forced exercise enhances functional recovery after focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Brain Sciences* 2012,2(4):483-503.
  166. Lee S, Lee M, Hong Y, Won J, Lee Y, Kang SG, Chang KT, Hong Y. Middle cerebral artery occlusion methods in rat versus mouse models of transient focal cerebral ischemic stroke. *Neural Regen Res* 2014,9(7):757-8.
  167. Liu ZJ, Ran YY, Qie SY, Gong WJ, Gao FH, Ding ZT, Xi JN. Melatonin protects against ischemic stroke by modulating microglia/macrophage polarization toward anti-inflammatory phenotype through STAT3 pathway. *CNS Neurosci Ther* 2019,25(12):1353-62.
  168. Luo C, Yang Q, Liu Y, Zhou S, Jiang J, Reiter RJ, Bhattacharya P, Cui Y, Yang H, Ma H, Yao J, Lawler SE, Zhang X, Fu J, Rozental R, Aly H, Johnson MD, Chiocca EA, Wang X. The multiple protective roles and molecular mechanisms of melatonin and its precursor N-acetylserotonin in targeting brain injury and liver damage and in maintaining bone health. *Free Radic Biol Med* 2019,130:215-33.
  169. Yang B, Zang LE, Cui JW, Zhang MY, Ma X, Wei LL. Melatonin Plays a Protective Role by Regulating miR-26a-5p-NRSF and JAK2-STAT3 Pathway to

- Improve Autophagy, Inflammation and Oxidative Stress of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Drug Des Devel and Ther* 2020,14:3177-88.
170. Gupta YK, Chaudhary G, Sinha K. Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in a middle cerebral artery occlusion model of acute ischemic stroke in rat. *Can J Physiol Pharmacol* 2002,80(3):210-7.
  171. Sinha K, Degaonkar MN, Jagannathan NR, Gupta YK. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Pharmacol* 2001,428(2):185-92.
  172. Hung YC, Chen TY, Lee EJ, Chen WL, Huang SY, Lee WT, Lee MY, Chen HY, Wu TS. Melatonin decreases matrix metalloproteinase-9 activation and expression and attenuates reperfusion-induced hemorrhage following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 2008,45(4):459-67.
  173. Liu L, Cheung RT. Effects of pretreatment with a combination of melatonin and electroacupuncture in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013,2013:953162.
  174. Bhattacharya P, Pandey AK, Paul S, Patnaik R. Melatonin renders neuroprotection by protein kinase C mediated aquaporin-4 inhibition in animal model of focal cerebral ischemia. *Life Sciences* 2014,100(2):97-109.
  175. Lee EJ, Lee MY, Chen HY, Hsu YS, Wu TS, Chen ST, Chang GL. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Pineal Res* 2005,38(1):42-52.
  176. Yang Y, Jiang S, Dong Y, Fan C, Zhao L, Yang X, Li J, Di S, Yue L, Liang G, Reiter R, Qu Y. Melatonin prevents cell death and mitochondrial dysfunction via a SIRT1-dependent mechanism during ischemic-stroke in mice. *J Pineal Res* 2015,58(1):61-70.
  177. Liu L, Chen H, Jin J, Tang Z, Yin P, Zhong D, Li G. Melatonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through SIRT3 activation. *Life Sciences* 2019,239:117036.
  178. Chen HY, Hung YC, Chen TY, Huang SY, Wang YH, Lee WT, Wu TS, Lee EJ. Melatonin improves presynaptic protein, SNAP-25, expression and dendritic spine density and enhances functional and electrophysiological recovery following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 2009,47(3):260-70.



179. Li Y, Guo Y, Fan Y, Tian H, Li K, Mei X. Melatonin Enhances Autophagy and Reduces Apoptosis to Promote Locomotor Recovery in Spinal Cord Injury via the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Neurochem Res* 2019,44(8):2007-19.
180. Li J, Zhang G, Meng Z, Wang L, Liu H, Liu Q, Buren B. Neuroprotective effect of acute melatonin treatment on hippocampal neurons against irradiation by inhibition of caspase-3. *Exp Ther Med* 2016,11(6):2385-90.
181. Shi L, Liang F, Zheng J, Zhou K, Chen S, Yu J, Zhang J. Melatonin Regulates Apoptosis and Autophagy Via ROS-MST1 Pathway in Subarachnoid Hemorrhage. *Front Mol Neurosci* 2018,11:93.
182. Zhang X, Yan H, Yuan Y, Gao J, Shen Z, Cheng Y, Shen Y, Wang RR, wang X, hu WW, Wang G, Chen Z. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy* 2013,9(9):1321-33.
183. Wu M, Zhang H, Kai J, Zhu F, Dong J, Xu Z, Wong M, Zheng LH. Rapamycin prevents cerebral stroke by modulating apoptosis and autophagy in penumbra in rats. *Ann Clin Transl Neurol* 2018,5(2):138-46.
184. Guo H, Zhao L, Wang B, Li X, Bai H, Liu H, Yue L, Guo W, Bian Z, Gao L, Feng D, Qu Y. Remote limb ischemic postconditioning protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by activating AMPK-dependent autophagy. *Brain Res Bull* 2018,139:105-13.
185. Ni Y, Gu WW, Liu ZH, Zhu YM, Rong JG, Kent TA, Li M, Qiao SG, An JZ, Zhang HL. RIP1K Contributes to Neuronal and Astrocytic Cell Death in Ischemic Stroke via Activating Autophagic-lysosomal Pathway. *Neuroscience* 2018,371:60-74.
186. Bu Q, Liu X, Zhu Y, Liu Y, Wang Y. w007B protects brain against ischemia-reperfusion injury in rats through inhibiting inflammation, apoptosis and autophagy. *Brain Research* 2014,1558:100-8.
187. Yang Z, Zhong L, Zhong S, Xian R, Yuan B. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. *Exp Mol Pathol* 2015,98(2):219-24.
188. Lin KC, Chen KH, Wallace CG, Chen YL, Ko SF, Lee MS, Yip HK. Combined Therapy With Hyperbaric Oxygen and Melatonin Effectively Reduce Brain Infarct Volume and Preserve Neurological Function After Acute Ischemic Infarct in Rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 2019,78(10):949-60.

189. Hu Y, Wang Z, Liu Y, Pan S, Zhang H, Fang M, Jiang H, Yin J, Zou S, Li Z, Zhang H, Lin Z, Xiao J. Melatonin reduces hypoxic-ischaemic (HI) induced autophagy and apoptosis: An in vivo and in vitro investigation in experimental models of neonatal HI brain injury. *Neuroscience Lett* 2017,653:105-12.
190. Carloni S, Riparini G, Buonocore G, Balduini W. Rapid modulation of the silent information regulator 1 by melatonin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Pineal Res* 2017,63(3).
191. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004,15(3):1101-11.
192. Jiang X, Niu X, Guo Q, Dong Y, Xu J, Yin N, Qianqian Q, Jia Y, Gao L, He Q, Lv P. FoxO1-mediated autophagy plays an important role in the neuroprotective effects of hydrogen in a rat model of vascular dementia. *Behav Brain Res* 2019,356:98-106.
193. Grishchuk Y, Ginet V, Truttmann AC, Clarke PG, Puyal J. Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy* 2011,7(10):1115-31.
194. Chen A, Wang H, Zhang Y, Wang X, Yu L, Xu W, Xu W, Lin Y. Paeoniflorin exerts neuroprotective effects against glutamate-induced PC12 cellular cytotoxicity by inhibiting apoptosis. *Int J Mol Med* 2017,40(3):825-33.
195. Choi IY, Hwang L, Jin JJ, Ko IG, Kim SE, Shin MS, Shin KM, Kim CJ, Park SW, Han JH, Yi JW. Dexmedetomidine alleviates cerebral ischemia-induced short-term memory impairment by inhibiting the expression of apoptosis-related molecules in the hippocampus of gerbils. *Exp Ther Med* 2017,13(1):107-16.
196. Zhu Y, Zhao L, Liu L, Gao P, Tian W, Wang X, Jin H, Xu H, Chen Q. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell* 2010,1(5):468-77.
197. Xu G, Li C, Parsiola AL, Li J, McCarter KD, Shi R, Mayhan WG, Sun H. Dose-Dependent Influences of Ethanol on Ischemic Stroke: Role of Inflammation. *Front Cell Neurosci* 2019,13:6.
198. Li C, Li J, Xu G, Sun H. Influence of Chronic Ethanol Consumption on Apoptosis and Autophagy Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Male Mice. *Sci Rep* 2020,10(1):6164.

# EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ


T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

| TOPLANTI TARİHİ | KARAR SAYISI | HAYBİS KAYIT NO | BAŞVURU SAHİBİ            |
|-----------------|--------------|-----------------|---------------------------|
| 02.06.2020      | 2020/8-7     | 9833            | Prof. Dr. Süleyman SANDAL |

| Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü             | : Sıçan                 | Araştırmacılar             |
|--|-------------------------|----------------------------|
| Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyu             | : <i>Wistar Albino</i>  | 1. Arş. Gör. Kevser TANBEK |
| Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti        | : Erkek                 | 2. Arş. Gör. Ümit YILMAZ   |
| Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı           | : 105 adet              |                            |
| Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı | : 3-4 Aylık/220-280 gr. |                            |

## KARAR:

"Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Otofaji Üzerine Melatoninin Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma kapsamında kullanılacak deney hayvanlarında yapılacak girişimlerde araştırmacılar tarafından "hayvan kullanım etiği ilkelerine" uyulacağı beyan edilmiştir. Bu çerçevede, söz konusu araştırmanın Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" hükümleri göz önüne alındığında çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna; **oy birliği ile karar verildi.**

| BAŞKAN | Doç. Dr. Suat TEKİN |  |
|--------|---------------------|---|
|--------|---------------------|---|

## ÜYELER

|  |   |                                      |   |
|--|---|--------------------------------------|---|
| Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE<br>Başkan Yardımcısı |  | Prof. Dr. Başak KAYHAN<br>Üye        | Katılmadı   |
| Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN<br>Üye           |  | Prof. Dr. Şengül YÜKSEL<br>Üye       |  |
| Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CANBOLAT<br>Üye       |  | Veteriner Hekim Engin KORKMAZ<br>Üye |  |
| Avukat Mustafa Umut YALÇIN<br>Sivil Üye      | Katılmadı   | Öğretmen Kaan Akın ÖZ<br>Sivil Üye   |  |

## EK 2. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|               |                           |                |             |
|---------------|---------------------------|----------------|-------------|
| <b>Adı</b>    | Ümit                      | <b>Soyadı</b>  | YILMAZ      |
| <b>E-mail</b> | umit.yilmaz@hotmail.co.uk | <b>Telefon</b> | 05392574659 |

### Eğitim Düzeyi

|                      | <b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>  | <b>Mez. Yılı</b> |
|----------------------|--|------------------|
| <b>Lisans</b>        | Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü                                  | 2009             |
| <b>Yüksek Lisans</b> | İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı | 2012             |
| <b>Yüksek Lisans</b> | İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı                          | 2015             |
| <b>Doktora</b>       | İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı | 2017             |
| <b>Doktora</b>       | İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı                          | -                |

### İş Deneyimi

|    | <b>Görevi</b>       | <b>Kurum</b>                     | <b>Süre (Yıl - Yıl)</b> |
|----|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| 1. | Araştırma Görevlisi | İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi | 2013-                   |