

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI



ARDKOŞULLANMA VE MELATONİNİN
SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
MİTOFAJİ ARACILI ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Gölnur ASLAN

2020

ONAY SAYFASI

.....

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Uzmanlık Tezi Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora
Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Danışman : Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulguların elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışımın olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gülner".

Gülnur ASLAN

22.06.2020

TEŞEKKÜR

Lisanüstü eğitim süreci boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, bilimsel bakış açısı nedir öğrenmemi sağlayan, akademik eğitim sürecinin yanında yaşadığım sıkıntılı ve zor günlerde desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya tüm emeği, desteği, sabrı ve samimiyeti için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deney çalışmaları sürecinde yardımlarıyla bizi destekleyen Dr. Öğr. Üyesi Özgür BULMUŞ'a ve Öğr. Gör. Ebru GÖKDERE'ye, immunofloresan boyamadaki destekleri için Meryem Sedef DOĞRU'ya, biyokimyasal analizlerimizi yapan Prof. Dr. Kazım ŞAHİN ve ekibine, bilimsel bilgisiyle destek olan Prof. Dr. Sinan CANPOLAT'a teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım diyebileceğim, her zaman sabırla beni destekleyen sevgili eşim Ecz. Bahadır ASLAN'a; dünyaya gelişiyle hayatıma baharlar getiren, kendisine ayıracağım zamandan kısıtığım canım oğlum Kayra'ya; bana her zaman inanan ve yanımda olan anneme, babama ve abim Erol OSMA'ya ve her zaman destek olan kayınvalidem ve kayınbabama sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 318S080 no.lu proje ile destekleyerek çalışmanın gerçekleşmesine olanak tanıyan TUBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Gülnur ASLAN

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Serebral İskemi-reperfüzyon Hasarının Patofizyolojik Mekanizması	6
3.2. Serebral IR hasarının tedavisi	8
3.3. İskemik koşullanmalar	9
3.3.1. İskemik önkoşullanma (PreC)	10
3.3.2. İskemik perkoşullanma (PerC)	11
3.3.3. Farmakolojik koşullanma	11
3.3.3.1. Melatonin	11
3.3.3.1.1. Melatoninin Serebral IR hasarında koruyuculuğu	12
3.3.4. İskemik ardkoşullanma (PostC)	13
3.3.4.1. Serebral PostC'nin moleküler mekanizması	16
3.3.4.1.1. Eksitotoksisite	16
3.3.4.1.2. Antienflamatuvar mekanizmalar	17
3.3.4.1.3. Antioksidan mekanizmalar	17
3.3.4.1.4. PI3K /Akt ve diğer kinazlarla ilişkili mekanizmalar	18
3.3.4.1.5. Antiapoptotik aktivite	18
3.3.4.1.6. Nörovasküler ünite (NVU) temelli mekanizma	18
3.3.4.1.7. Otofajiye dayalı mekanizmalar	19
3.4. Mitokondri	20
3.4.1. Mitofaji	21
3.4.1.1. Mitofaji Sinyalizasyon Yolları	22
3.4.1.1.1. PINK1-Parkin sinyal yolağı	22
3.4.1.1.2. BNIP3 ve NIX sinyal yolağı	23

3.4.1.1.3. FUNDC1 sinyal yolağı	24
3.5. Beyin Natriüretik Peptid (BNP)	25
3.6. Davranış testleri	25
3.8. Hedef ve Amaç	26
4. GEREÇ VE YÖNTEM	24
4.1. Deney hayvanları	28
4.2. Deney grupları	28
4.3. Cerrahi uygulamalar	29
4.4. İlaç uygulaması	31
4.5. Nörolojik bulgu skorlaması	31
4.6. Davranış testleri	32
4.6.1. Açık alan testi:	32
4.6.2. Dikey çubuk testi (Vertical Pole test)	32
4.6.3. Işın Yürüme Testi (Beam walking test)	33
4.7. Trifenil tetrazolyum klorid (TTC) boyama	34
4.8. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama	35
4.9. Western blot analizi	37
4.10. İstatistik	38
5.BULGULAR	39
5.1. Nörolojik bulgu skorlaması	39
5.2. Açık alan testi	39
5.3. Dikey Çubuk Testi	40
5.4. Işın yürüme testi	41
5.5. DAPI boyama	41
5.6. BNP protein ekspresyon düzeyleri	43
5.7. Parkin protein ekspresyon düzeyleri	44
5.8. PINK1 protein ekspresyon düzeyleri	45
5.9. BNIP3 protein ekspresyon düzeyleri	46
5.10. FUNDC1 protein ekspresyon düzeyleri	47
6. TARTIŞMA	48
7. KAYNAKLAR	62
8. ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Koşullanma çeşitlerinin şematik gösterimi	10
Şekil 2.	RepostC'nin koruyuculuğuna aracılık eden olası yollar	15
Şekil 3.	Mitofaji sinyalizasyon yolları	22
Şekil 4.	Çalışmanın hedefinin şematizasyonu	27
Şekil 5.	Deney grupları	29
Şekil 6.	Karotid arter ligasyonu	30
Şekil 7.	OSA oklüzyonu deney protokolü	31
Şekil 8.	Açık alan testi	32
Şekil 9.	Dikey çubuk testi (Vertical Pole test)	33
Şekil 10.	Işın Yürüme Testi (Beam walking test)	34
Şekil 11.	OSA oklüzyonuna bağlı nekroz alanının TTC boyama ile gösterilmesi	35
Şekil 12.	Fare beyin atlasında primer somatosensör kortex-barrel alanı	36
Şekil 13.	DAPI boyaması yapılan beyin kesitinin panoramik görüntüsü	36
Şekil 14.	Nörolojik bulgu skorlamasının gruplara göre değişimi.	39
Şekil 15.	Açık alan testinde geçilen çizgi sayısının gruplara göre değişimi.	40
Şekil 16.	Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre değişimi.	40
Şekil 17.	Işın yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi.	41
Şekil 18-a.	Hücre yoğunluğu yüzdesinin gruplara göre değişimi.	42
Şekil 18-b.	Apoptoz göstergesi nükleer yapılar	42
Şekil 19.	BNP protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi	43
Şekil 20.	Parkin protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.	44
Şekil 21.	PINK1 protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.	45
Şekil 22.	BNIP3 protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.	46
Şekil 23.	FUNDC1 protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.	47

KISALTMALAR LİSTESİ

ASIC'ler	: Asit algılayan iyon kanalları
Bad	: Bcl-2 ilişkili hücre ölümü agonisti
Bax	: Bcl-2 ilişkili X
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
BNIP3	: Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3
BNIP3	: BCL2 ile etkileşen protein 3
CMA	: Şaperon aracılı otofaji
DRP1	: Dynamin ile ilgili protein 1
EKA	: Eksternal karotid arter
ER	: Endoplazmik retikulum
ERK 1/2	: Hücre dışı sinyal ayarlı kinazlar
ETZ	: Elektronik taşıma zincirinin
FBN1	: Fibrillin
Fisl	: Fisyon 1 proteini
FUNDC	: FUN14 alanı içeren protein 1
FUNDC1	: FUN14 alanı içeren protein 1
GABA	: G-aminobutirik asit
GR	: Glutatyon redüktaz
HIF- α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör α
IKA	: İnternal karotid arter
IL	: İnterlökin
IR	: İskemi-reperfüzyon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	: c-Jun N-terminal kinazları
KA	: Kainit

KBB	: Kan beyin bariyeri
KKA	: Kommon karotid arter
LC3	: Hafif zincir 3
MA	: 3-metiladenin
MAPK	: Mitojenle aktiveştirilen protein kinaz
MDA	: Malondialdehit
Mfn	: Mitofusin
mPTP	: Mitokondriyal permeabilite geçiş gözeneği
mTOR	: Rapamisin kinazın mekanik hedefi
NFκB	: Nükleik faktör kappa B
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
NSE	: Nöron spesifik enolaz
NVU	: Nörovasküler nite
PostC	: İskemik ardkoşullanma
Opa1	: Optik atrofi protein 1
OSA	: Orta serebral arter
PCNA	: oğalan hücre nükleer antijeni
PerC	: İskemik perkoşullanma
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PINK1	: PTEN induklu kinaz 1
PreC	: İskemik nkoşullanma
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
RePostC	: Uzak iskemik ardkoşullanma
RePreC	: Uzak iskemik önkoşullanma
ROS	: Reaktif oksijen türleri

SERCA2	: Sarkoplazmik retikulum Ca 2+ ATPaz-2
SOD	: Süperoksit dismutaz
TGF-β1	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü- α
TTC	: Tetrazolyum klorid
ULK1	: Unc-51 otofaji aktive edici kinaz gibi-1



1. ÖZET

İskemik ardkoşullanma (PostC), dokunun reperfüzyon esnasında iskemi-reperfüzyon (IR)' un kısa bölümlerine maruz kaldığında, hasara karşı tolerans artışını hedefleyen güçlü, endojen, koruyucu bir yöntemdir. Uzak iskemik ardkoşullanma (RePostC) ise uzak organlardaki girişimlerle iskemiye duyarlı vital organları koruyan noninvaziv bir metoddur. Mitofaji ile mitokondriyal biyoenerjetikğin düzenlenmesinin inme tedavisinde umut verici olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada PostC, RePostC ve beyin dokusunda koruyucu etkileri bilinen melatoninin serebral IR hasarında hasar göstergesi BNP; mitofajide farklı yollarda görevli proteinler Parkin-PINK1, BNIP3 ve FUNDC1 ekspresyon düzeyleri ve lokomotor aktiviteyi değerlendirmek amacıyla kullanılan davranış testleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Sıçanlar 5 gruba ayrıldı (n:10). Orta serebral arter (OSA) oklüzyonu sonrası reperfüzyon başlangıcında, 3 siklus 30 sn reperfüzyon/10 sn iskemi şeklinde PostC; sağ arka bacağa 5'er dk 3 siklus reperfüzyon-iskemi şeklinde RePostC; reperfüzyon öncesinde tek doz melatonin uygulandı. Protein ekspresyon düzeyleri Western Blot ile tespit edilirken; nöronal canlılığın tespiti için DAPI boyama ve motor koordinasyonun analizi için açık alan, dikey çubuk ve ışın yürüme testleri gerçekleştirildi.

BNP, Parkin-PINK1, BNIP3 ve FUNDC1 düzeyleri IR hasarı ile anlamlı arttı. Tedavilerle Parkin ve PINK1 düzeyleri değişmezken; BNP, FUNDC1 ve BNIP3 düzeyleri IR'ye göre anlamlı azaldı. Davranış testlerinde lokomotor aktivite, IR ile anlamlı azalırken tedavi uygulamaları anlamlı bir değişiklik göstermedi.

Sonuç olarak; Parkin-PINK1, FUNDC1 ve BNIP3 protein ekspresyon düzeylerinin artışı, tüm mitofaji yollarının OSA oklüzyonuna bağılı serebral IR ile aktif olduğunu gösterebilir. PostC, RePostC ve melatonin, BNIP3 ve FUNDC1 aracılı mitofajiyi inhibe ederek koruyuculuk sağlayabilir. Serebral IR hasarına bağılı olarak artan BNP düzeyleri IR hasarının teşhisinde ve tedavinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olabilir. Ardkoşullanmalarla benzer mekanizmalar ile koruyuculuk sağlayan melatonin farmakolojik koşullanma yapan bir ajan olarak düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: ardkoşullanma, melatonin, mitofaji, BNIP3, FUNDC1, Parkin-PINK1, BNP

2. ABSTRACT

Mitophagy Mediated Effects Of Postconditioning And Melatonin In Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury.

Ischemic postconditioning (PostC) is a strong endogenous protective phenomenon, which targets the increased tolerance of the myocardium against injury when the tissue is subjected to short intervals of ischemia-reperfusion (IR) in reperfusion. Remote ischemic postconditioning (RePostC) is a noninvasive method that protects vital organs susceptible to ischemia by measures in remote organs. Melatonin released from the pineal gland is a hormone that plays an important role in reducing cerebral injury. Mitophagy is a type of autophagy that removes damaged mitochondria to protect the cell. In this study, it was aimed to investigate the effects of PostC, RePostC and melatonin on the expression levels of cerebral injury markers BNP; Parkin-PINK1, BNIP3 and FUNDC1 proteins involved in mitophagy in cerebral IR damage.

Rats were divided into 5 groups (n: 10). PostC was performed as three sessions as ischemia for 10 sec and reperfusion for 30 sec. RePostC underwent sequential I/R of the right hind limb, using 3 cycles of 5 min of ischemia and 5 min of reperfusion following MCA reperfusion. Melatonin was administered as a single dose at the beginning of reperfusion. Protein expression levels were determined with Western Blot; Open field, vertical pole and beam walking tests were performed for motor coordination analysis. Besides that, DAPI staining was applied to detect neuronal viability.

BNP, Parkin-PINK1, BNIP3 and FUNDC1 levels increased with IR injury. In treatment groups, Parkin and PINK1 levels did not change, while BNP, FUNDC1 and BNIP3 levels decreased when compared to IR group. In the behavioral tests, the locomotor activity decreased significantly with IR but it did not change statistically with treatments.

As a result; PostC, RePostC and melatonin may provide protection by inhibiting mitophagy through the FUNDC1 and BNIP3. Increased levels of BNP due to cerebral IR injury may be used as biomarkers in the diagnosis and treatment of IR injury. Melatonin, which procures protection with similar mechanisms to postconditioning, may be a pharmacological conditioning agent.

Keywords: Postconditioning, melatonin, mitophagy, BNIP3, FUNDC1

3. GİRİŞ

İnme, dünya çapında önde gelen ölüm ve sakatlık nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü 2018 yılı raporlarına göre inmeye bağlı ölüm, en sık karşılaşılan ikinci ölüm nedenidir (1). Türkiye’ de ise Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2018 yılında toplam ölümün % 9,27’si serebrovasküler hastalıklara bağlı olarak gerçekleşmiştir (2).

İnme; iskemik ve hemorajik inme olmak üzere iki çeşittir ve iskemik inmenin görülme oranı yaklaşık olarak % 80-85’tir. İskemik inme; serebral dokuya kan akışının, oksijen ve besin maddelerinin ulaşımında ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasındaki işleyiş bozukluğu olarak ortaya çıkar ve buna bağlı olarak nöronal işleyişi bozar. Beyin dokusu bu değişikliklere son derece duyarlıdır ve geri dönüşümlü iskemik hasarın nekroza dönüşmesini önlemek için gerekli terapötik pencere dardır. Bu önemli zaman dilimi, nörolojik semptomların invaziv veya non-invaziv akut girişimsel yaklaşımlarla kısmen veya tamamen tersine çevrilmesi için bir “fırsat penceresi” sunar (3).

İskemi-reperfüzyon (IR) hasarı, oksijensiz dokunun yeniden sirkülasyonu ile oluşan patofizyolojik değişiklikler serisidir. IR hasarında kullanılan tedavilerin daha etkili olabilmesi için semptomlar başlamasıyla mümkün olan en kısa sürede uygulanabilmesi büyük önem taşır. Hastanın transportunda her bir dakikalık gecikmenin intraarteriyel tedavi şansını %2,5 oranında azalttığı bildirilmektedir. Hastaneye varış ile tedaviye başlanmasına kadar geçen sürenin 10 dakika azalmasının mortalite ve ilk 36 saatlik süreçte görülen kanama oranlarında azalma ve eve taburcu edilen hasta oranlarında anlamlı artış sağladığı bildirilmektedir (4). Bunun yanında, son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda, inme sırasında kullanılan

nöron koruma ajanlarının etkisinin beklenen düzeyde olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle nörokoruma için beynin kendi endojen koruyucu stratejilerini ortaya çıkarmanın önemli olduğu düşünülmektedir (5).

IR hasarına karşı endojen savunma mekanizmalarından mitokondriyal biyoenerjiğin düzenlenmesinin umut verici olabileceği düşünülmektedir (6). Nöronlar, mitokondrilerin hassas dağılım ve onarımını gerektiren benzersiz enerji taleplerine sahiptir. Mitokondriyal dinamikler, tüm hücrelerin ve özellikle nöronların düzgün çalışması için kritik öneme sahiptir. İşlevsel olmayan ve gereksiz mitokondri birikimi, hücreler ve organizmalar için risk teşkil edip nörodejeneratif hastalık oluşumuna neden olabilir (7).

3.1. Serebral İskemi-reperfüzyon Hasarının Patofizyolojik Mekanizması

IR hasarının mekanizmaları arasında oksidatif stres, lökosit infiltrasyonu, trombosit ve kompleman aktivasyonu ve sonuçta ödem veya kan beyin bariyeri (KBB)'nin dejenerasyonu bulunur (8).

IR ile indüklenen doku hasarı iskemik hasar ve reperfüzyon hasarı olarak iki kısma ayrılır. İskemi başlangıçta hipoksi ve hiponutrisyona neden olurken, sürecin uzamasıyla hücrelerde metabolik ürünler birikerek asidoz görülür. Kan akışı tekrar sağlandığında, lokal inflamasyon ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artar ve ikincil yaralanmaya yol açar. IR hasarı farklı patojenez yollarına bağlı olarak farklı hücre ölüm mekanizmaları oluşturulabilir (9).

Apoptoz, IR hasarında aktive edilen programlanmış hücre ölümü sürecidir. Apoptotik mekanizmalar dışsal ve içsel olarak iki ana yoldan oluşur. Ölüm reseptörü yolu olarak da bilinen dışsal yolak, Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve

Fas ligandı dahil olmak üzere ölüm ligandları ve reseptörleri tarafından aktive edilir. Bu ölüm sinyali kompleksi, kaspaz-3'ü ayırmak için kaspaz-8'i aktive eder ve hasarlı hücrelerde proteoliz yoluyla hücre ölümünü indükler. Mitokondriyal yol olarak da bilinen içsel yolak, mitokondriyal membranın bütünlüğünü değiştirerek B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ailesinin proapoptotik üyelerinin aktivasyonuna yol açar. IR hasarında sitoplazmik Bcl-2 ilişkili hücre ölümü agonisti (Bad) artar ve Bcl-2'ye bağlanır. Paralel olarak, Bcl-2 ilişkili X (Bax) Bax regülasyonu sonrasında apoptozu teşvik etmek için bir kaspaz kaskadı indüklenir. Apoptoza lokal enflamatuar yanıt eşlik etmez (9).

Nekroz, plazma membran geçirgenliği ve organel şişmesi ile karakterize pasif ve düzensiz bir hücre ölüm şeklidir. Hücre parçalanması, organel şişmesi ve mitokondriyal disfonksiyon nekrozun ana özellikleridir ve süreç iskemik dokuda çok sayıda lokal inflammatuar yanıtı indükler. Nekroptoz, ölüm sinyalleri tarafından kontrol edilen ve nekroza benzer bir ölüm paterni gösteren programlanmış hücre ölümü biçimidir (9).

Otofaji, sitoplazmada biyolojik makromoleküllerin ve hasarlı organellerin membran veziküllerinde parçalandığı biyolojik bir süreçtir. Otofajiyle ilişkili protein (Atg) 13 ve Atg17 tarafından oluşturulan kompleks otofajinin başlaması için gereklidir. Rapamisin kinazın mekanik hedefi (mTOR), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-Protein kinaz B (PKB-Akt olarak da bilinir) sinyalini regüle ederek otofaji başlangıç sürecini inhibe eder. Besin ve enerji yokluğunda, hücreler mTOR aktivitesini inhibe ederken, Atg13 aracılı otofajik membran oluşmaya başlar. Otofajik vezikül uzantısı, iki ubiquitin bağlama sistemi olan Atg12-Atg5-Atg16 kompleksinin ve Atg8 ile Hafif zincir-3 (LC3)'ün katılımını gerektirir.

Reperfüzyonun başlangıcında, mitokondri, otofajiyi indükleyen ATP üretir ve mitokondride kalsiyum birikime neden olabilir. Otofaji artışı reperfüzyon basıncını tamamen nötralize edemediğinde, hücre hasarı meydana gelir (9).

3.2. Serebral IR hasarının tedavisi

Doku plazminojen aktivatörü alteplaz ile iv tromboliz tedavisi, semptom başlangıcından 4,5 saat sonrasına kadar başvuran hastalarda kontrendikasyon yoksa ilk uygulanacak tedavi olarak kabul edilir (4).

Söz konusu iv tedavi ile rekanalizasyonun sağlanamaması, hastanın inme geçirdiği esnada antikoagülan tedavi alıyor olması ve hastanın 6 saatten sonra başvurması gibi durumlarda nörolojik skorları da göz önüne alınarak endovasküler tedavi (mekanik trombektomi veya intraarteryal trombolitik tedavi ile kombinasyonu) uygulanmaktadır. Nöroendovasküler tedavi akut rekanalizasyon tekniklerini içerdiği gibi, ekstrakraniyal ve intrakraniyal stent ve anjiyoplasti gibi iskemik inmede ikincil koruma için kullanılan endovasküler işlemlerini de kapsar (4).

Antiplatelet tedavi, hastayı ikinci bir inmeden korumayı amaçlar. Aspirin, klopidoğrel, prasugrel, tikagrelor ve uzatılmış salımlı dipiridamol tedavide kullanılabilecek diğer ajanlardır (3).

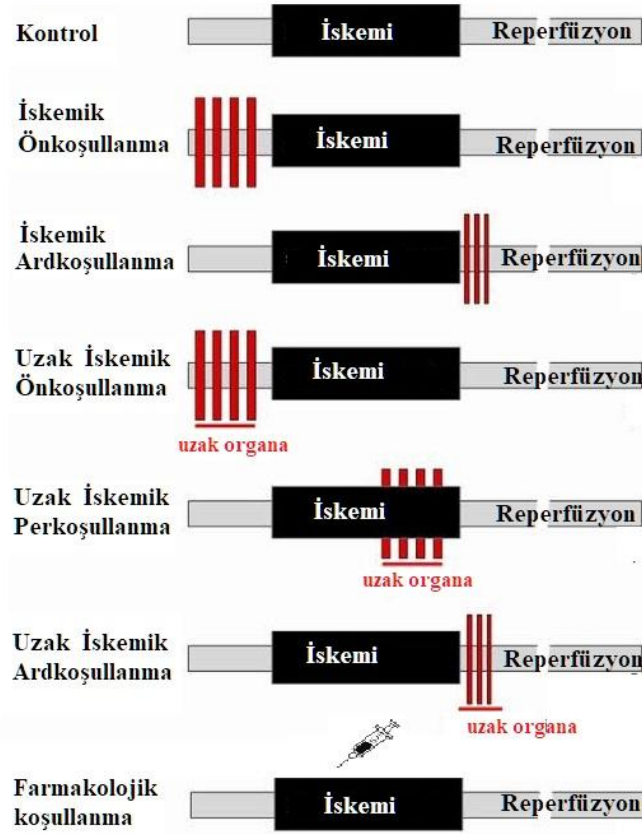
Deneyisel çalışmalar; glukokortikoidler, altın tuzları ve d-penisilamin, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, demir-şelasyon bileşikleri, potasyum kanal açıcıları, kalsiyum kanal blokerleri, anti-oksidatif ajanlar, anti-inflamatuar ilaçlar, östrojen, progesteron, katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve E vitamini gibi antioksidanlarla yapılan tedavilerin IR hasarını önleyebildiğini/hafiflettiğini göstermiştir (3).

İnmeye müdahalede kanıta dayalı tek uygulama olan iv doku plazminojen aktivatörünün kullanım protokülündeki sınırlılıklar ve nörolojik bozukluğu kötüleştirebilen veya ölümcül olabilen intrakraniyal kanama riski araştırmacıları yeni tedavi protokolleri arayışına itmiştir. Bu protokollerin arasında öne çıkan proseslerden biri olan serebral dokunun endojen koruma kapasitesini ortaya çıkarmanın umut verici olabileceği düşünülmektedir.

3.3. İskemik koşullanmalar

Uzun yıllardır iskemi sırasında ve reperfüzyon sonrasında hücre ölümünü azaltmaya yönelik girişimler yapılmaktadır. Hayvan modellerinde birçok tedavi potansiyeline rağmen görece az sayıda çalışma klinikte başarılı olmuştur. İskeminin ne zaman gerçekleşeceği öngörülemez olduğundan, beyne kan akışının durması sırasında veya sonrasında etkili nöroprotektif stratejilerin bulunması çok önemlidir. Endojen nöroproteksiyon, beynin hasara tepki verme kabiliyetidir. Yapılan çalışmalar beynin subletal dozda advers olaylara adapte olabildiğini ve hasara maruz kaldığında hücre dayanıklılığını geliştirebildiğini göstermiştir (10).

Serebral arterin oklüzyonu ve kan akımının restorasyonu IR hasarının nedenidir. Öte yandan oklüzyon ve reperfüzyonun kısa döngüleri IR hasarından korumak için uyarıcıdır. İskemik koşullanma, IR'nin kısa bölümlerine maruz kaldığında, dokunun iskemiye karşı tolerans artışı hedefleyen güçlü, endojen protektif bir olgudur. İskemik koşullanmanın çeşitleri Şekil 1' de şematize edilmiştir (11).



Şekil 1. Koşullanma çeşitlerinin şematik gösterimi

3.3.1. İskemik önkoşullanma (PreC)

PreC ilk olarak 1986' da Murry ve ark. (12) tarafından uygulanmış ve tavşan kalbinde, uzun süreli iskemiden önce hafif oklüzyon sikluslarının, dokuyu daha sonraki öldürücü iskemik hasara karşı daha toleranslı hale getirdiğini göstermişlerdir. Serebral IR hasarına bağlı fizyopatolojiyi azalttığı da rapor edilmiştir (13). Ancak PreC' in nöroprotektif strateji olarak uygulanabilirliği deneysel çalışmalarla sınırlıdır. Bu nedenle klinik karşılığı olması açısından PostC daha fazla dikkat çekmiştir (14).

Uzak iskemik önkoşullanma (RePreC) ise vital bir organı majör iskemik hasardan korumak için kol veya bacak gibi vital olmayan ve daha erişilebilir bir organın iskemik strese maruz bırakılması olarak tanımlanır. Buna karşılık, akut

inmenin başlangıcının öngörülelemeyeceğinden RePreC'in de uygulanması sınırlıdır (15).

3.3.2. İskemik perkoşullanma (PerC)

PerC, vital organı ölümcül iskemiden korumak için, iskemi sırasında uzak bir organa kısa süreli IR uygulanmasıdır. Kalp krizi geçiren hastaların hastaneye transferi sırasında PerC uygulaması ile infarkt boyutunda azalma gösterilmiştir (16). Sıçan geçici orta serebral arter (OSA) oklüzyonu modelinde de infarkt boyutunda azalma saptanmıştır (10).

3.3.3. Farmakolojik koşullanma

İskemik koşullanmanın koruyucu etkisinin ve fizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasıyla başlanmasıyla, bu korumayı sağlayan farmakolojik ajanlar geliştirmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Farmakolojik koşullanma; iskemiye karşı geniş yelpazede koruma sağlayan, evrimsel olarak korunan sinyallerin endojen tolerans mekanizmalarını tetiklemek ya da hasara neden olan yolakları inhibe etmek için inme başlangıcından önce veya kısa bir süre sonra kimyasal ajanların kullanımı olarak tanımlanabilir (17). Başta uçucu anestezikler olmak üzere birçok anestezik ilaç serebral IR hasarında nöroprotektif etkiye sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, izofluran ve sevofluran PostC'nin, birçok hayvan modelinde kısa ve uzun vadede nörolojik bulguları iyileştirdiği gösterilmiştir (18).

3.3.3.1. Melatonin

Melatonin başta pineal bez olmak üzere lens, over ve kemik iliği hücreleri, safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan ve gece-gündüz ritmini düzenlemekle görevli olan bir hormon olup, 1993 yılında antioksidan etkinliği

gösterilmiştir. Yüksek lipofilitesi ve küçük boyutundan dolayı, tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır ve yüksek konsantrasyonda birikme özelliğine sahiptir (19).

Melatonin sentezi triptofandan başlar. Plazmada yaklaşık %70 oranında albumine bağlanarak taşınır. Büyük oranda karaciğerde, az miktarda böbrekte metabolize edilir. Karaciğerde 6-hidroksimelatonine dönüşür; böbrekte sülfat ve glukuronik aside bağlanarak itrah edilir. Melatonin seviyesi karanlık başladığında yükselmeye başlar. Gece yarısından sonra (02.00-04.00) maksimum seviyesine ulaşır ve sonra giderek düşer. Serum melatonin yoğunluğu, yaşa göre de anlamlı olarak değişir. Yaşlanma ile birlikte melatonin düzeyinin de giderek azaldığı bilinmektedir (20). Felç geçiren hastalarda sağlıklı deneklere göre epifiz kalsifikasyonunda artış olduğu bildirilmiştir (21).

Melatonin, mitokondrinin normal metabolizması sırasında üretilen ROS'u doğrudan temizleyebilen bir antioksidandır. Bunun yanında SOD, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GRd) ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini teşvik eder. Bunun yanında, normal koşullar altında elektron taşıma zinciri (ETZ) I ve IV komplekslerinin aktivitelerini ve ekspresyonunu artırır ve bazı patolojik durumlarda aktivitelerini indükleyerek mitokondride glutatyon (GSH) homeostazının sürdürülmesini sağlar. Ayrıca, melatonin bazı proteinlere elektron sağlayabilir (22,23).

3.3.3.1.1. Melatoninin Serebral IR hasarında koruyuculuğu

Melatonin tedavisi serebral IR hasarında nöron kaybını, enfarktüs hacmini ve beyin ödemi azaltır ve nörolojik skorları iyileştirir (24). Benzer şekilde, reoksijenasyon sırasında melatonin uygulamasının, mitokondriyal membran potansiyel kaybını, sitokrom c salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe ettiğini

gösterilmiştir (25). OSA oklüzyonu sonrası sirtuin-3 (SIRT3) ekspresyonunu arttırarak serebral IR hasarını hafiflettiği de bildirilmiştir (26).

Melatonin çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda NO seviyesini, pro-inflamatuar sitokinleri ve COX2 ve iNOS gibi çeşitli enzimleri düzenler. Ayrıca, MT2 reseptörü yoluyla inflammatuar hücre lökositleri ve mikroglia infiltrasyonunu azaltarak iyileşmeye yardımcı olur (27).

Melatonin, PI3K/Akt yolağını ve mTOR'u hedefleyerek survival kinazları aktif hale getirir ve ayrıca c-Jun N-terminal kinazları (JNK) 1/2 ve ERK 1/2 fosforile düzeylerini indükleyebilir (27).

Melatonin öncülü ve metabolitinin de IR hasarında nöroprotektif etkileri saptanmıştır. Melatoninin öncülü N-asetilserotonin mPTP açılması, mitokondriyal fragmentasyon ve daha sonraki proapoptotik faktör salımını inhibe ederek primer serebrokortikal nöronlarda primer hipokampal nöronlar ve organotipik hipokampal dilimde oksijen-glikoz eksikliği ve H₂O₂ ile indüklenen hücre ölümünü azaltmıştır (28). Melatonin metaboliti 6-hidroksimelatoninin, ROS'u temizlediği, mPTP'yi koruduğu ve laktat dehidrojenaz ve sitokrom c salımını ve kaspaz-3 aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (29).

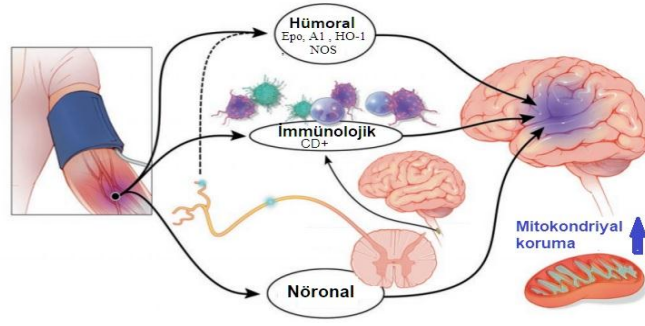
3.3.4. İskemik ardkoşullanma (PostC)

İskemik PostC, uzun süreli iskemiyi takiben, endojen koruyucu mekanizmaları tetiklemek için, reperfüzyon sırasında kısa iskemi siklusları uygulama prensibine dayanır. PostC ilk olarak Zhao ve ark. (30) tarafından köpeklerde kardiyak iskemi sonrası uygulanmıştır. Nöroprotektif etkisi ise 2006 yılında gösterilmiştir (31). Zhao ve ark. (31) sıçan modelinde kalıcı distal OSA oklüzyonu ve geçici bilateral kommon karotid arter oklüzyonuna bağlı fokal serebral iskemiden

sonra, reperfüzyonun başlangıcında bilateral kommon karotid artere üç siklus 30 sn /10 sn RI ile uygulanan PostC'nin penumbra infarkt hacmini ve apoptozu azalttığını bildirmişlerdir. Daha sonraki çalışmalar, iskemik PostC'nin etkilerini endojen nöroprotektif mekanizmaların aktivasyonu yoluyla gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur (32,33).

İskemik PostC uygulama bölgesine göre klasik veya **uzak iskemik PostC** (Remote ischemic postconditioning: RePostC) olarak tanımlanabilir. Klasik iskemik PostC genellikle oklüze edilen arter üzerinde gerçekleşirken; RePostC ise alt ekstremitedeki arterin iskemiye maruziyetiyle uygulanır. Klasik iskemik PostC güçlü bir nöroproteksiyon sağlamasına rağmen klinik uygulaması beyinde ek bir iskemi riski nedeni ile sınırlıdır. Bu nedenle, iskemik PostC kavramını RePostC ve farmakolojik PostC ile genişletmek uygun bir yol olabilir. RePostC, daha kolay uygulama şekli ve daha güvenli bir yöntem olması nedeniyle inmede dikkat çekmektedir. RePostC hayvan modellerinde genellikle, PostC' de olduğu gibi güçlü ve uzun süreli nöroproteksiyona sahiptir (5).

RePostC' nin nöron koruyucu etkisinin hüморal, nöronal ve immünolojik yolak olmak üzere 3 farklı yolak ile sağlandığı düşünülmektedir (Şekil 2) (34).



Şekil 2. RePostC'nin koruyuculuğuna aracılık eden olası yollar (35) no.lu kaynaktan çevirilmiştir. RePostC nöron koruyucu etkisini hümorale, nöronal ve immünolojik yolar olmak üzere 3 farklı yolar aracılığı ile sağlar.

Hümorale yolun olası varlığı iki nedenden dolayı kabul edilir: İlki, RePostC uygulanan uzak organda salınan koruyucu moleküllerin kan dolaşımı ile hedef organa ulaştığı düşünülmektedir. İkincisi ise uzaktan koşullanma uygulanan tavşanlardan alınan kan, işlem görmemiş başka bir tavşana transfer edildiğinde alıcı tavşanda da iskemiye karşı koruyuculuk gözlenmiştir (36). Bu koruyuculuğa aracılık eden ve iskemik inme çalışmaları ile doğrulanmış hümorale faktörler; eritropoietin, adenosin A1 reseptörü, heme oksijenaz 1 ve NOS' tur (34).

Nöronal yolağı ilişkin şu çalışmalar yapılmıştır: Afferent sinir blokörü kapsaisin uygulanmasının, sıçanlarda RePostC'nin beyin iskemisine karşı koruyuculuğunu inhibe ettiği gösterilmiştir (37). Başka bir çalışmada ise OSA oklüzyonuna maruz sıçanlarda RePreC'in nöroproteksiyonunun ganglion blokörü heksametonyum ile inhibe edilebileceği bildirilmiştir (38). Ayrıca vagal preganglionik nöronların nöronal yolun sinyal iletiminde önemli rol oynadığını rapor edilmiştir (39). Bununla birlikte, parasempatik efferentlerin aktivasyonunun nöroprotektif etkileri olduğu (40) ve vagal stimülasyonun serebral enfarktüs

boyutunu azaltarak parasempatik efferentlerin bu yoldaki katılımını azalttığını bildirilmiştir (39).

İmmünolojik yolak ile ilgili olarak; kolda geçici iskemiye maruz kalmış sağlıklı gönüllülerde proinflatuar genlerde aşağı, antienflatuar genlerde ise yukarı düzenlenme meydana geldiği (41), nötrofil aktivasyonun ise azaldığı (36) gösterilmiştir. Sıçanlarda uzaktan koşullanma ile OSA oklüzyonundan sonra kandaki $CD3^+/CD8^+$ T hücrelerinin ve $CD3^+/CD161a^+$ doğal öldürücü T hücrelerinin azalmasında iyileşme ve periferik kandaki B hücreleri ve $CD43^+/CD172a^+$ non-enflatuar monositlerin yüzdesinde artış görülmüş ve bu değişikliklerin nörolojik fonksiyonların iyileşmesiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (42).

3.3.4.1. Serebral PostC'nin moleküler mekanizması

3.3.3.4.1. Eksitotoksisite

Glutamat, memeli beyinde ana uyarıcı nörotransmitterdir. Serebral IR'nin erken fazında aşırı glutamat salınımı, bir dizi iskemik kaskad reaksiyonu ve eksitotoksisiteye neden olur (43). Sinaptik aralıkta inhibitör nörotransmitter g-aminobutirik asit (GABA) birikimi ise beyinde koruyucu bir rol oynar (44). PostC'nin sinapslarda glutamat düzeylerini azaltarak (43) ve GABA'yı artırarak (44) eksitotoksisiteyi iyileştirdiği ve sinaptik fonksiyonu koruyabileceği gösterilmiştir.

Glutamat reseptörlerinden N-metil-D-aspartik asit ve kainitin glutamat ile aktivasyonu, eksitotoksisite hasarını indüklemenin ana yollarından biridir ve PostC koruyuculuğunda rol oynadığı gösterilmiştir (5,45).

3.3.4.1.2. Antienflamatuar mekanizmalar

Enflamasyonun, akut iskemiyi takiben şiddetli şekilde doku hasarına neden olduğu rapor edilmiştir. İskemik PostC, beyindeki mikrogliya, makrofajlar, CD4 ve CD8 T hücreleri ve B lenfositlerinin sayısındaki artışları anlamlı şekilde ortadan kaldırmıştır (33). Bazı çalışmalar PostC'nin Interlökin (IL)-1b, IL-6, TNF- α ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) pro-enflamatuar faktörlerini aşağı regüle edebileceğini ve anti-enflamatuar faktör olan Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF-b1)'düzenleyebileceğini göstermiştir (46).

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), endojen veya ekzojen inflamasyonu açıklayan ana sinyal yolları olarak bilinir. Serebral iskemik stres altında TLR2 ve TLR4 nöronlar, mikrogliya ve astrositler üzerinde eksprese edilir. PostC'nin TLR2 ve TLR4 ekspresyonunu ve proinflammatuar transkripsiyon faktörü olan Nükleik faktör kappa B (NF κ B)'nin aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (47). Bunun yanında, galektin-9/Tim-3 (T hücresi immünoglobulin ailesinin bir üyesi) hücre sinyal yolağı, iskemik PostC tarafından da düzenlenebilir (48).

3.3.4.1.3. Antioksidan mekanizmalar

Antioksidasyon iskemik inme için potansiyel terapötik stratejilerden biri olarak sayılabilir. Deneysel çalışmalarda PostC'nin iskemi modellerinde antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak oksidatif stresi inhibe ettiği gösterilmiştir. PostC'nin, ROS, malondialdehit (MDA) ve 3-nitrotirozin birikimini azaltarak ve antioksidanlar perioksiredoxin-1, 2 ve 3'ü ve manganez (SOD) seviyelerini yükselterek oksidatif hasarı hafiflettiği bildirilmiştir (49).

3.3.4.1.4. PI3K /Akt ve diğer kinazlarla ilişkili mekanizmalar

PI3K/Akt yolu, sinyal iletiminde, esas olarak apoptotik süreçleri ve hücre büyümesini inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasında rol oynayan önemli bir medyatör yolaktır. PostC' nin Akt fosforilasyonunu arttırdığı ve uzattığı, Akt aktivitesinin inhibisyonunun PostC ile tedavi edilen sıçanlarda enfarktüs boyutuna etki etmediği bildirilmiştir (50). Gao ve ark. (51) PostC'nin ölümü teşvik eden dPKC bölünmesini inhibe ettiğini ve hayatta kalmayı teşvik eden εPKC seviyelerinin fosforilasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca IR, hücre dışı sinyal ayarlı kinazlar (ERK 1/2) dahil mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yollarının fosforilasyonunu azaltır. PostC'nin ERK1/2 ve p38 MAPK'nın fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (50).

3.3.4.1.5. Antiapoptotik aktivite

Nöronlarda apoptozun inhibisyonu, serebral IR sonrası penumbra hasarını önlemede önemlidir. PostC'nin antiapoptotik etkisi çok sayıda çalışma ile desteklenmiştir. PostC, bölünmüş kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-9 ve Bax'ın proapoptotik proteinlerini aşağı regüle ederek nöronal apoptozu azaltabilir ve anti-apoptotik protein Bcl-2'yi yukarı regüle edebilir (52).

3.3.4.1.6. Nörovasküler ünite (NVU) temelli mekanizma

Yapılan araştırmalar NVU kavramının gelişmesiyle iskemik hasarda tek başına nöronları kurtarmak yerine tüm nörovasküler üniteye odaklanmıştır. PostC'nin astrositler, endotel hücreleri ve nöronlardaki hasarı azaltarak NVU'yu hasardan koruyan KBB geçirgenliğini minimize ettiği rapor edilmiştir (53). PostC ve RePostC'nin astrositlerde beyin ödemi ve KBB dejenerasyonuna katkıda bulunan

aquaporin-4' ün aşığı düzenlenmesi ile beyin ödemi ve KBB'nin geçirgenliğini azalttığı gösterilmiştir (54).

3.3.4.1.7. Otofajiye dayalı mekanizmalar

Otofaji, açlık ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli stres koşullarına yanıt veren, protein kalite kontrolüne katılan, hücresel bileşenlerin ayrıştırılması ve geri dönüştürülmesi için düzenlenmiş bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Otofajinin esas rolü, uzun ömürlü organellerde, özellikle mitokondride rastgele bozulmuş moleküler yük birikimini önlemektir (6). Otofaji prosesinde görülecek bir fonksiyon bozukluğu nörodejenerasyon, miyopati, kanser, yaşlanma ve diyabet gibi metabolik hastalıkların patolojileri ile ilişkilidir (55).

Memeli hücrelerinde üç tip otofaji vardır: makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA). Mitokondrinin otofajik bozunumu (mitofaji), endoplazmik retikulum (retikülofaji veya ERfaji) gibi spesifik protein mekanizmaları ile en az beş tür selektif otofaji belirlenmiştir (56).

Makrotofaji sitoplazmik materyali, biyosentetik proseslerde veya enerji üretiminde kullanılabilen ve hücre sağ kalımını sağlayan metabolitlere indirger. Makrotofaji rutinde düşük bir seviyede oluşur, enerji açlığı gibi stres koşulları altında daha da uyarılabilir (57).

Şaperon Aracılı Otofaji (CMA); hafif oksidatif stres, toksinler ve uzun süre besin yokluğu ile yukarı doğru düzenlenir. Sitoplazma yığını nonspesifik olarak yutabilir ve kargo izolasyonu için membranöz yapıları kullanmaz. Tüm CMA substratlarında ortak nokta pentapeptit hedefleme sekansı kapsamasıdır. Böylece sitozolik şaperonların hareketi ile açılır ve doğrudan lizozomal membran boyunca translokasyona tabi tutulurlar ve burada lümende bozunurlar (58).

Mikrotofaji, lizozomal membran içerisindeki rasgele invaginasyonların, sitoplazmik materyalin bozunmasına neden olan sitoplazmik içeriği lizozomal lümene ilettiği bir süreçtir (57).

3.4. Mitokondri

Hücre enerji santrali olarak tanımlanan mitokondri, yarı otonom bir organeldir ve "hücrenin güçlü evleri" olarak adlandırılır. Kalp, beyin, kas, karaciğer ve böbrek hücrelerinde 100-2000 adet mitokondri bulunmakta ve Ca^{2+} homeostazı, ATP ve ROS üretimi ve apoptoz gibi çeşitli hücresel proseslerde kilit rol oynamaktadır. Mitokondriyal disfonksiyonun diyabet, kalp yetmezliği, immünolojik ve nörolojik bozukluklar gibi birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir (6,59). Mitokondriyal ve hücresel homeostazın korunması ve hasar görmüş mitokondrinin onarımı/ortadan kaldırılması oldukça önemlidir. Mitokondriyal dinamikler de denilen birtakım antagonistik olaylar, mitokondrinin morfolojisini kontrol eder, hücre içi mitokondri dağılımını, biyogenez ve hücresel canlılığı etkiler (60).

Mitokondri dinamiğinin temel bileşenleri şunlardır:

Mitokondriyal füzyon, mitokondrinin iç ve dış zarlarının tamamen kaynaşması anlamına gelir. Füzyona, mitofusinler (Mfn1 ve Mfn2) ve optik atrofi protein 1 (Opa1) olarak adlandırılan dynamin ile ilgili GTPazlar aracılık etmektedir (60). Opa1'ın aşırı ekspresyonu artmış mitokondri füzyonuna ve azalmış mitofajiye yol açar (61).

Mitokondriyal fisyon, artmış veya azalmış membran potansiyeline sahip iki mitokondriye ayrılabilir; mitokondriyal fisyon 1 proteini (Fis1) ve dynamin ile ilgili protein 1 (DRP1) ile düzenlenir (62).

Mitokondriyal fragmentasyon, mitokondrinin hasarlı bölümünün kesilerek çıkartılmasıdır. Mitokondriyal oksidatif stres, fisyon-füzyon proteinlerinin diferansiyel modülasyonu mitokondriyal fragmentasyona neden olur. Mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da bu olayda ER ile mitokondri arasında bir “haberleşme” olduğu ve ER’den salınan Ca^{+2} un, fragmentasyonda rol oynadığı düşünülmektedir (62).

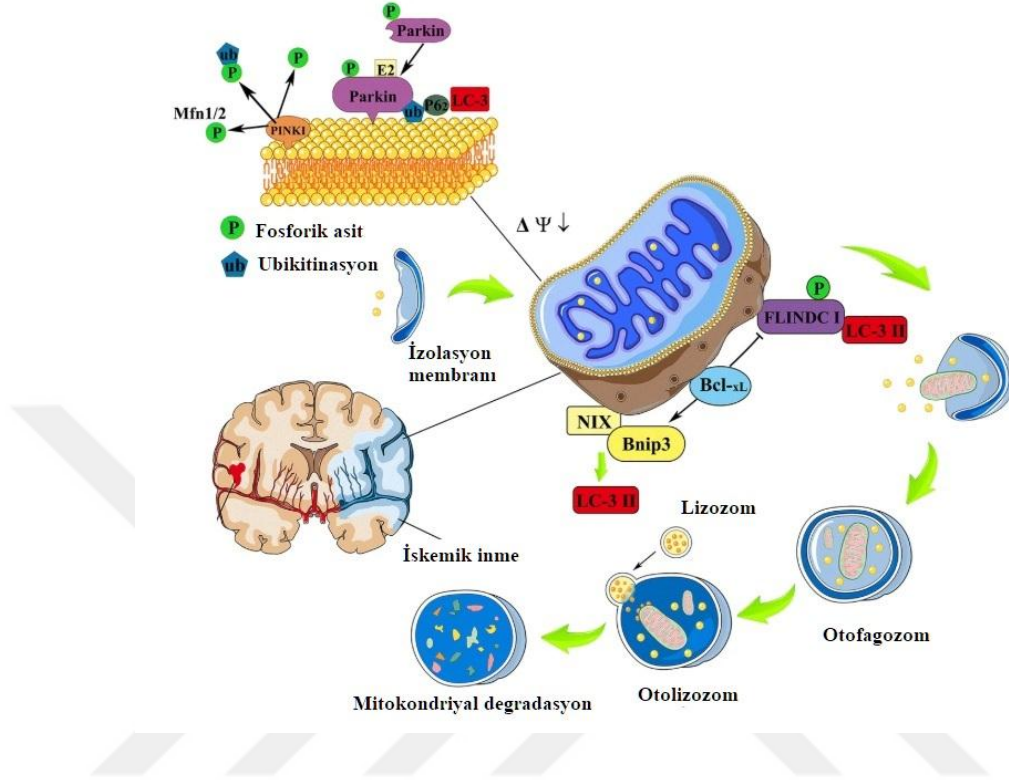
Güncel gözlemler, füzyonun hücre sağkalımı için uygun olduğunu ve fisyonun hücre ölümünü kolaylaştırdığını bildirmektedir (6).

3.4.1. Mitofaji

Mitokondriyal hasar antagonistik olaylarla giderilememiş ise selektif imhası gerçekleşir. Bu proses mitofaji olarak adlandırılır. "Mitofaji" terimi ilk kez Lemasters (63) tarafından 2005’ te ortaya atılmıştır. Mitokondri, zengin protein ve lipid kaynağıdır ve besin eksikliği sırasında otofajik olayların yaklaşık % 85'i mitokondride gerçekleşir. Mitofaji, ROS oluşturabilen ve hücre ölümüne neden olabilecek işlevsiz veya aşırı mitokondrileri ortadan kaldırarak mitokondrilerin kalitesini ve sayısını kontrol eder (6). Yetersiz veya fazla mitofaji hücre hasarını ve ölümünü teşvik edebilir. Mitofaji, proapoptotik proteinlerin salınmasına, ROS oluşumuna ve yaşlı, hasar görmüş ve depolarize mitokondrinin ATP' yi boşa hidrolize etmesine karşı koruyucu etki gösterir (64). Mitofaji ayrıca sitoplazmik yeniden biçimlenme sırasında hastalığı teşvik eden zarar görmüş ve mutasyon geçirmiş mitokondriyal DNA'yı parçalayarak mitokondriyal disfonksiyonu engeller (65).

3.4.1.1. Mitofaji Sinyalizasyon Yolları

Mitofaji sinyal yolları şekil 1’de şematize edilmiştir.



Şekil 3. Mitofaji sinyalizasyon yolları ((6) no.lu kaynaktan çevrilmiştir.)

3.4.1.1.1. PINK1-Parkin sinyal yolağı

Ubikitin ligaz ailesinden olan Parkin normalde sitozolde bulunur, mitokondri hasarında depolarize mitokondriye translokasyonu gerçekleşir. Mitokondride lokalize Parkin, otofaji markırı LC3’ü mitokondriye toplayabilir (66).

Fosfataz ve tensin homologu (PTEN) induklü kinaz 1 (PINK1), Parkin’in upregülatörüdür, sitozol ve mitokondri arasında gidip gelir. Sağlıklı hücrelerde, PINK1 mitokondride parçalanır. Ancak mitokondriyal depolarizasyonda mitokondrinin dış zarında birikir (66). Parkin-PINK1 ile fosforile edilebilir ve bu fosforilasyon Parkin'in translokasyonu için gereklidir (67).

PINK1 aynı zamanda mitofaji indüklemek için merkezi bir regülatördür. Parkin yokluğunda PINK1, mitokondrideki düşük bazal ubikitin düzeyleri nedeniyle mitofaji daha düşük seviyede indükler; Parkin varlığında ise, güçlü ve hızlı mitofaji indüksiyonu ve PINK1 fosforilasyonu için ubikitin substratı üreten amplifikatör görevi görür. Diğer E3 ubikitin ligazlarının Parkin gibi etki gösterip gösteremeyeceği belirsizdir (68).

ROS, Parkin/PINK1'e bağlı mitofaji için tetikleyici olarak kabul edilmiştir. Apoptozu düzenleyen proteinlerin mitofajiye aracılık eden faktörler olduğu bildirilmiştir. Bcl-2 ailesi proteinleri, Parkin/PINK1'e bağlı mitofaji dahil mitokondriyal homeostazı koruyan mekanizmanın çeşitli kısımlarında rol oynayabilir. Depolarize mitokondriye bağlı mitofajide Parkin translokasyonunun, Bcl-2 proteinleri (Bcl-xL ve Mcl-1 dahil) tarafından inhibe edildiği ve BH3 içeren proteinler (Bad, Bim ve Noxa) ile artırıldığı gösterilmiştir (6).

3.4.1.1.2. BNIP3 ve NIX sinyal yolağı

Bcl-2 ile etkileşen protein 3 (BNIP3), proapoptotik bir mitokondriyal proteindir ve NIX (BNIP3L), BNIP3'ün homologudur. BNIP3 ve NIX, mitofaji aktive etmek için ROS üretimini artırabilir ve Bcl-2-Becclin1 kompleksini ayırarak Becclin1 salınımını sağlayabilir (69). Bunun yanında, hipoksik koşullarda, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF- α), BNIP3 promotörüne bağlandığı ve BNIP3 ekspresyonunu indükleyerek ROS düzeylerindeki artış önlediği bildirilmiştir (70).

BNIP3 ve NIX proteinleri, farklı sinyal alanlarında apoptoz ve mitofaji sinyalini bütünleştirir, bu nedenle mitofaji ve apoptoz arasındaki çapraz konuşma, inme sırasında nöron hücresi ölümünü etkileyebilir. BNIP3'ün BH3 alanı proapoptotik aktivite sağlarken, C-terminal transmembran alanı mitokondriyal

lokalizasyon için gereklidir ve BNIP3'ün Bcl-2 veya Bcl-xL ile etkileşimlerinde rol oynar (6). BNIP3, Bcl-2 ailesi proapoptotik ve antiapoptotik etki gösteren üyelerinin regülasyonunu sağladığı gösterilmiştir (71).

BNIP3 ve NIX arasındaki fonksiyonel benzerliğe rağmen birçok çalışma farklılıklarını ortaya koymuştur. NIX upregülasyonu, BNIP3 azalması nedeniyle oluşan mitofaji defektlerini restore edemeyebilir (72). BNIP3 transkripsiyonu hipoksi ile artabilir ancak fenilefrin ile arttırılamaz; Aksine, NIX transkripsiyonu fenilefrin ile artmıştır, ancak hipoksiyle artmaz (70).

3.4.1.1.3. FUNDC1 sinyal yolağı

FUNDC1 alanı içeren protein 1 (FUNDC1), hipoksik koşullar altında LC3'e doğrudan bağlanarak mitokondrinin programlanmış eliminasyonunu düzenleyen bir mitofaji reseptörüdür. FUNDC1, mitokondri dışı membran proteinidir. Normoksik koşullarda, FUNDC1, inaktif formda bulunur, hipoksikde ULK1 (erken otofagosom oluşumu için gerekli olan bir Ser/Thr kinaz) arttırılır ve hasarlı mitokondriye biriktirilir, ardından mitofajiyi desteklemek için serin 17'de FUNDC1 fosforilasyonu yapılır, böylece FUNDC1 ve LC3 arasındaki etkileşim arttırılır (73).

Hipoksiye bağlı ULK1/FUNDC1 aracılı mitofaji artışının hücre apoptoz oluşumunu engelleyebileceği belirtilmiştir (74).

FUNDC1 aşırı ekspresyonu mitokondriyal fisyonu neden olurken FUNDC1'in düzeyinin azalması mitokondriyal füzyona neden olur (75). FUNDC1 ayrıca DRP1, OPA1 veya füzyon regülatörü kalneksin ile etkileşerek mitokondriyal dinamiklerin regülasyonunda yer alır. Hipoksik koşullar altında FUNDC1 ve kalneksin ilişkisi

zayıflarken, FUNDC1 ve DRP1 arasındaki etkileşim mitokondriyal fisyonu desteklemek için artmıştır (76).

3.5. Beyin Natriüretik Peptid (BNP)

BNP, somatik ve lokal dokularda önemli modülatör görevi gören bir peptid hormondur. Kan basıncını düşürmek için sodyum atılımı, diürez ve vazodilatasyonu teşvik eder ve renin anjiyotensin sistem aşırı salınımı ve antidiüretik hormonun salgılanmasını inhibe eder (77). BNP sadece kalpte değil, aynı zamanda beyin ve akciğerde de bulunur (78).

Akut serebral enfarktüs durumunda BNP düzeyinin belirgin arttığı ve BNP miktarının serebral iskemik hasarın şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (79). Beyindeki iskemik alanın potansiyel bir plazma BNP kaynağı olabileceği ve OSA oklüzyonunun sıçan beynindeki BNP mRNA ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (79,80). BNP'nin i.v. uygulanması, fare beyin hasarı modellerinde serebral kan akışını iyileştirmiş ve inflamasyonu azaltmış, böylece nörodejenerasyonun azalmasını sağlamıştır (81).

3.6. Davranış testleri

Son yıllarda motor koordinasyon, depresyon, anksiyete ve strese yanıt gibi davranışsal koşullarının nörolojik temele sahip olduğu keşfedilmiştir. Davranış testi, klinik öncesi çalışmalarda, belirli bir hastalık veya tedavinin hayvan üzerindeki fenotipik etkilerini ve sonuçlarını değerlendirmek için kullanılır (82). Bazı raporlar, serebral iskemiden sonra lokomotor aktivitenin baskılandığını göstermiştir (83). Ayrıca, lokomotor davranış, yatay veya dikey hareketler ve stereotipik aktivite ile baş ve vücut yönelimi gibi birçok bileşen içerir. Genel olarak, mezo-striatal-kortikal

fonksiyonu değerlendirmek için yatay ve dikey lokomotor aktiviteleri; dopaminerjik nöronal fonksiyonu incelemek için stereotipik davranışlar ve fokal beyin iskemisinden sonra sensorimotor asimetriyi değerlendirmek için vücut asimetrisi kullanılır (84). Açık alan testi (open field test), dikey çubuk testi (vertical pole test), T-Labirent Testi (T- maze test) ve ışın yürüme testi (Beam Walking test) lokomotor aktiviteyi analiz etmeye yönelik testlere örnek olarak verilebilir.

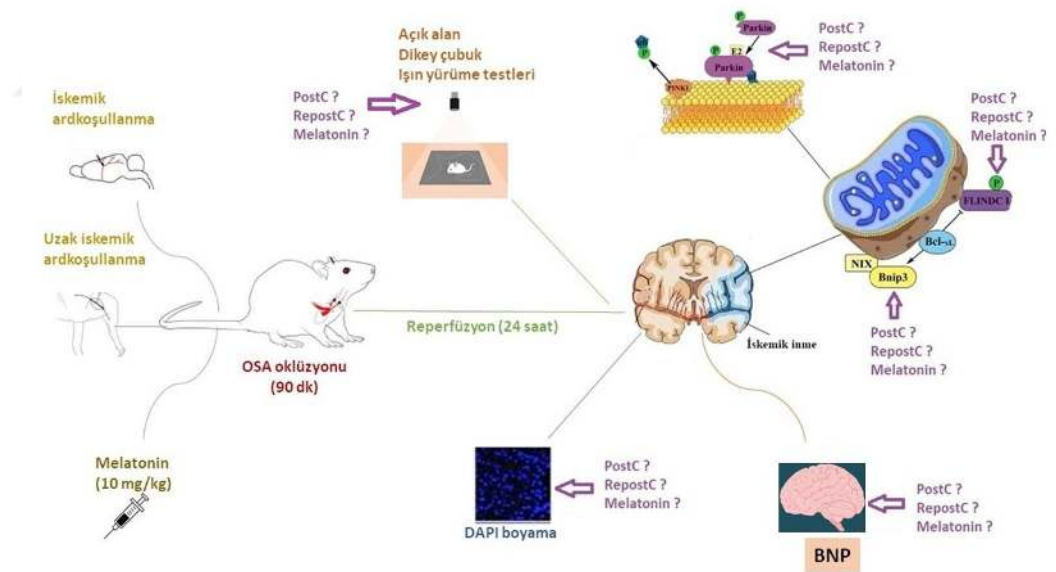
3.8. Hedef ve Amaç

Serebral IR hasarında melatonin ve ardkoşullanmanın mitofajide farklı yolaklarda görevli proteinler Parkin-PINK1, BNIP3 ve FUNDC1 düzeylerine etkileri ve serebral iskemiden FUNDC1 düzeylerinin nasıl etkilendiği bizim bilgilerimize göre bilinmemektedir. Bu çalışmada serebral IR hasarında söz konusu proteinler aracılı mitofajinin rolü ile ardkoşullanma, uzak iskemik ardkoşullanma ve melatoninin etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Mitofajide görevli protein düzeylerinin saptanması ve davranış testlerinin değerlendirilmesiyle aşağıdaki hedeflere ulaşılmak istenmektedir (şekil 4).

- 1- Hasar görmüş mitokondriyi ortadan kaldırarak hücresel hasarı en aza indirmeyi ve doku bütünlüğünü korumayı hedefleyen farklı mitofaji yolaklarında görevli proteinlerin (Parkin-PINK1, FUNDC1 ve BNIP3) OSA oklüzyonu, ardkoşullanma yöntemleri (klasik ve uzak ardkoşullanma) ve melatonin uygulamalarından nasıl etkilendiğinin ve bu proteinler arasında bir korelasyon olup olmadığının belirlenmesi.
- 2- Non-invaziv bir metod olan uzak iskemik ardkoşullanma ile klasik ardkoşullanmanın koruyuculuğunun benzer mekanizmalar üzerinden sağlanıp sağlanmadığının saptanması.

- 3- Ardkoşullanma ile melatonin uygulamalarının moleküler mekanizması karşılaştırılarak melatonin farmakolojik ardkoşullanma yapan bir ajan olabilir mi sorusuna yanıt aranması.
- 4- Doku hasar göstergesi sayılabilecek BNP düzeylerine PostC, RePostC ve melatonin uygulamalarının etkisinin belirlenmesi.
- 5- İskemik beyin hasarı sonrası davranış testleri (Açık alan testi, dikey çubuk testi, ışın yürüme testi) ile ardkoşullanma ve melatoninin lokomotor davranışlar üzerine etkilerinin saptanması.
- 6- Serebral iskemik hastalıklarının tedavisinde (ilaç tedavisi, serebral ve noninvaziv girişimler) başarımın artırılmasına yönelik olarak yeni yaklaşımlar geliştirilebilmesi bakımından bilimsel birikime katkı sağlanması.



Şekil 4. Çalışmanın hedefinin şematizasyonu

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney hayvanları

Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 04.04.2018 tarih ve 74 numaralı karar ile onaylandı ve hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından karşılandı. Çalışma öncesi ‘‘Web tabanlı örneklem büyüklüğü & güç analizi yazılımı’’ (85) ile yapılan örneklem büyüklüğü analizi, parametrelerin değerlendirilmesinde her grupta 6 olmak üzere en az 30 sıçanın çalışmaya alınması gerektiğini gösterdi (%80 güç, $\alpha=0.05$, $\beta=0.2$). Çalışmanın gücünü artırabilmek ve cerrahi işlem kaynaklı ölüme bağlı birey sayısını optimumda tutabilmek için toplam 50 sıçan kullanıldı. Kullanılan sıçanlar 10 haftalık, erkek, Sprague Dawley cinsi ve 250-280 gr ağırlığındaydı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık sıklısta, havalandırılmalı, sabit ısı (21±1 C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı ve beslenmeleri 8 mm’ lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı.

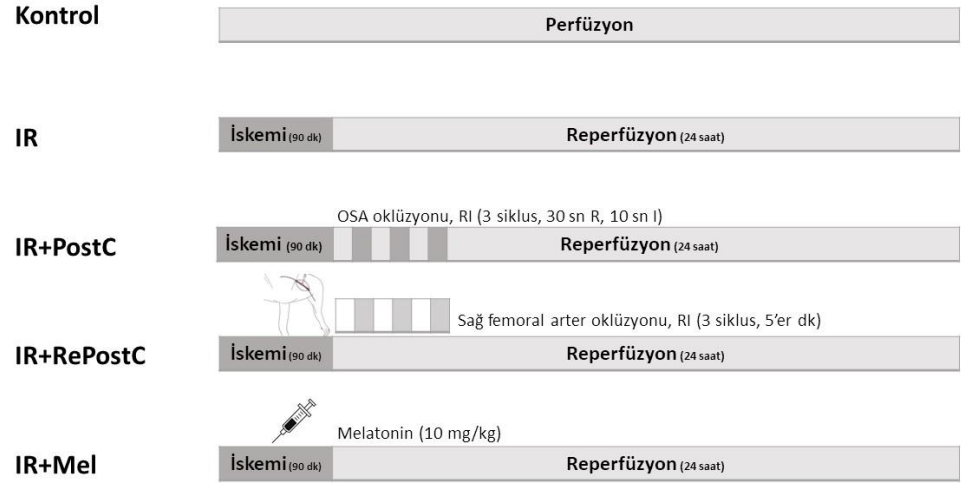
Kullanılan kimyasal ajanlar: Ketamin hidroklorid olarak Ketalar 500 mg enjektabl flakon (Pfizer, İstanbul), ksilazin olarak ise Rompun %2 enjeksiyonluk çözelti (Bayer, İstanbul) kullanıldı. Melatonin, Sigma-Aldrich (USA), TTC; VWR chemicals (UK) firmasından, western blot analizinde kullanılan kitler ise ThermoFisher Scientific (UK)’den temin edildi.

4.2. Deney grupları

Çalışmanın deneysel grupları şekil 2’de şematize edildi

1. Kontrol (Sham) grubu (n:10)
2. İskemi- reperfüzyon uygulanan sıçanlar (n:10)

3. İskemi- reperfüzyon ve ardkoşullanma uygulanan sıçanlar (n:10)
4. İskemi- reperfüzyon ve uzak iskemik ardkoşullanma uygulanan sıçanlar (n:10)
5. İskemi- reperfüzyon ve melatonin uygulanan sıçanlar (n:10)

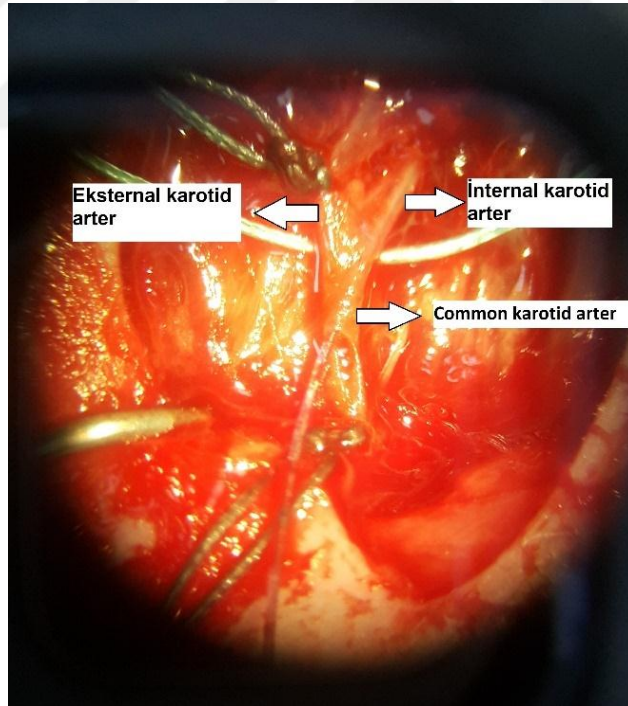


Şekil 5. Deney grupları

4.3. Cerrahi uygulamalar

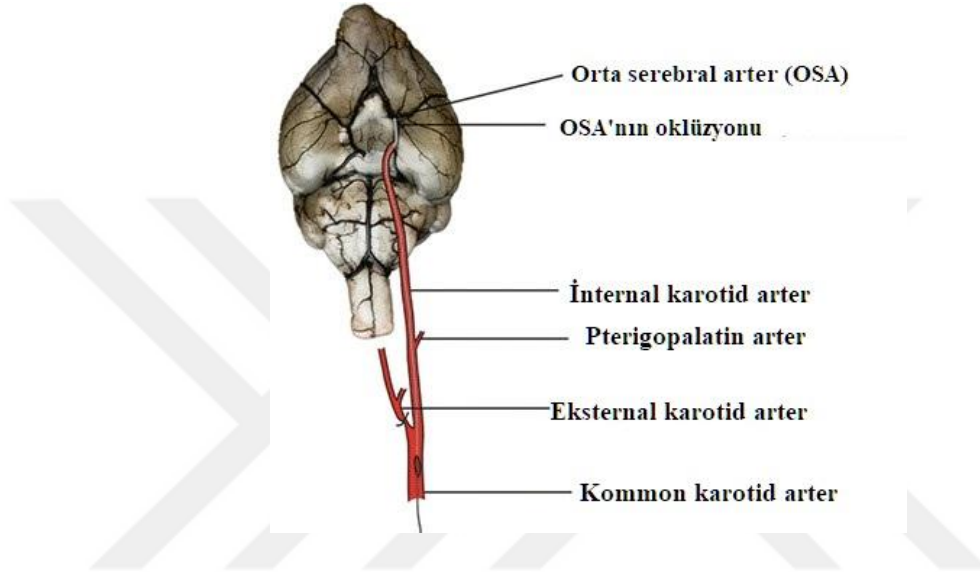
Anestezik olarak periton içi ketamin hidroklorid 75 mg/kg + ksilazin 8 mg/kg kullanıldı. Deney sürecince sıçanların vücut sıcaklıkları, ısıtıcılı operasyon masası 37 °C' ye sabitlenerek korundu ve rektal sıcaklık takibi yapıldı. İskemik inmelerin yaklaşık % 80'i OSA bölgesinde meydana geldiğinden, inme modellerinin birçoğu OSA oklüzyonunu hedefler (86). Serebral iskemi, Melani ve ark (87)' nin uyguladığı OSA'nın intraluminal filament yöntemi ile oklüze edilerek oluşturuldu. OSA oklüzyonu için ilk olarak, servikal orta hat insizyonu yapıldı ve deri altı ve yumuşak dokular geçildi. Sol kommon karotid arter (KKA) nervus vagustan izole edildi ve 5/0 ipek sütür ile ligasyonu sağlandı. Daha sonra eksternal karotid arter (EKA)

serbestleştirilerek bifürkasyon bölgesine mümkün olduğunca yakın bir noktadan 5/0 ipek sütür ile ligate edildi. İnternal karotid arter (IKA) ise klips ile kapatılarak KKA üzerinde bifürkasyonunun yaklaşık 3 mm proksimalinde mikrocerrahi makası ile arteriyotomi gerçekleştirildi (Şekil 3). Önceden hazırlanmış poli-L-lizin (% 0.1 g/ml) ile etrafı kaplı ve ucu kütleştirilmiş 4/0 naylon monofilament kesiden IKA'ya yerleştirildi. Klips kaldırılarak ve hafif bir direnç hissedilene kadar filament dikkatlice 18 mm kadar ilerletilerek OSA oklüze edildi. 5/0 ipek iplik kullanılarak oklüze IKA bifürkasyonunun distaline bağlandı (Şekil 6). Tüm prosedür her sıçan için 20-25 dakikada tamamlandı. 90 dakikalık oklüzyonu takiben, anestezi altında sütür çıkarılarak reperfüzyon sağlandı. Kontrol grubuna da süturun OSA'ya gönderilmesi dışında tüm cerrahi işlemler uygulandı.



Şekil 6. Karotid arter ligasyonu

PostC, reperfüzyon başlangıcında 3 siklus 30 sn reperfüzyon ve ardından 10 sn iskemi şeklinde OSA'ya uygulandı. RePostC ise reperfüzyon başlangıcında sağ arka bacağın femoral arterine 5 dk reperfüzyon ve 5 dk iskemi şeklinde 3 siklus uygulandı. Deney gruplarındaki sıçanlar, reperfüzyondan 24 saat sonra dekapite edildi, alınan doku ve serum örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 7. OSA oklüzyonu deney protokolü (88)

4.4. İlaç uygulaması

Melatonin çözeltisi, 10 mg/kg dozunda saf etanolde çözüldü ve %0,9 NaCl ile 1 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (0,01 etanol/izotonik solüsyon). Reperfüzyon öncesinde *i.p* olarak uygulandı.

4.5. Nörolojik bulgu skorlaması

Nörolojik defisitler OSA oklüzyonundan 22-24 saat sonra aşağıdaki 5 puan skoru kullanılarak değerlendirildi (89):

- 0: Normal fonksiyon;
- 1: Hayvanın kuyruktan tutulup kaldırılması ile kontralateral fleksiyon;
- 2: Kontralateral fleksiyon ile birlikte dinlenme halinde normal duruş;

3: İstirahat halinde kontralateral tarafa yaslanma;

4: Spontan motor aktivitesinin olmaması.

4.6. Davranış testleri

Lokomotor aktiviteyi ölçmek amacıyla OSA oklüzyonundan 22-24 saat sonra Açık Alan Testi (Open field test), Işın Yürüme Testi (Beam walking test) ve Dikey çubuk testi (Vertical Pole test) uygulandı

4.6.1. Açık alan testi:

Duvar yüksekliği 40 cm, tabanı 80*80 cm² ebatlarında ve 25 eşit kareye bölünmüş düzenekte yapıldı. Deneyin başlangıcında deney hayvanı bu alanın merkezine bırakıldı ve 10 dakika boyunca hareketleri dijital olarak kaydedildi (Şekil 8). Sıçanın girdiği kare sayısı hesaplandı. Düzenek her kullanımdan sonra %70 oranındaki alkol solüsyonu ile temizlendi.



Şekil 8. Açık alan testi

4.6.2. Dikey çubuk testi (Vertical Pole test)

Sıçan bant ile kaplı çubuğa (çap: 3.0 cm; uzunluk, 150 cm) yerleştirildi (Şekil 9) ve direğin üzerinde kaldığı süre en fazla 180 saniye boyunca kaydedildi. Bu test

modeli ile motor koordinasyon ve denge eksiklikliği olan hayvanın çubuktan dseceği varsayıldı (90) .



Şekil 9. Dikey ubuk testi (Vertical Pole test)

4.6.3. Iın Yürüme Testi (Beam walking test)

Yerden 50 cm yüksekliğinde, 120 cm uzunluğunda ve 5 cm çapında bez bant kaplı yatay çubuğun üzerine sıçan bir uçtan bırakılarak diğer uca doğru hareketi izlendi ve aşağıdaki skorldama sistemi kullanılarak ölçüm yapıldı (ekil 10) (91):

0, sıçan simetrik olarak çubuk üzerinde yürüyebildi;

1, sıçan, etkilenmemiş uzvunu tercihli olarak kullanarak kiriş üzerinde dengeleyip yürüyebildi;

2, sıçan etkilenmemiş uzuvlara dayanarak kiriş üzerinde dengeleyip yürüyebildi;

3, hareket etmeye başladığında, sıçan kiriş üzerinde dengeleme yapamadı;

4, sıçan hemen ışıktan düştü.

Test, her bir sıçan için üç kez gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz için ortalama skorlar hesaplandı.



Şekil 10. Işın Yürüme Testi (Beam walking test)

4.7. Trifenil tetrazolyum klorid (TTC) boyama

TTC boyama her grupta örneklem yapılarak OSA oklüzyonunun doğruluğunu teyit etmek amacıyla yapıldı. Sakrifiye edilen hayvandan hızlıca beyin dokusu çıkarıldı ve dilimlenebilmesi için 15-20 dk donduruldu. Daha sonra 2 mm kalınlığında dilimlendi ve %2 oranında TTC (VWR chemicals, UK) içeren tamponda (pH=7.4) 37 C° de 30 dk süreyle inkübe edildi. TTC, dokuda NADH, dehidrojenazlar ve diaforazlar bulunduğunda formazan pigmentlerini indirger. Canlı

dokular, bu enzimler ve kofaktörleri içerdikleri için koyu kırmızı renkte boyanırken, infarkt alanları bunları içermediklerinden boyanmazlar. TTC boyamanın ardından dokular %10 formalin çözeltisinde 24 saat ve ardından salin çözeltisinde bekletildi ve daha sonra fotoğraflandı (Şekil 11).

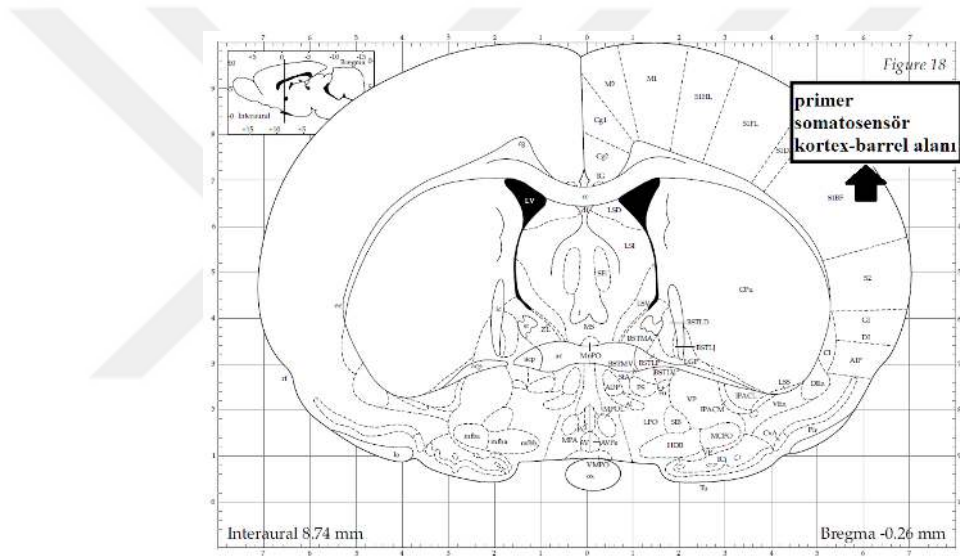


Şekil 11. OSA oklüzyonuna bağlı nekroz alanının TTC boyama ile gösterilmesi

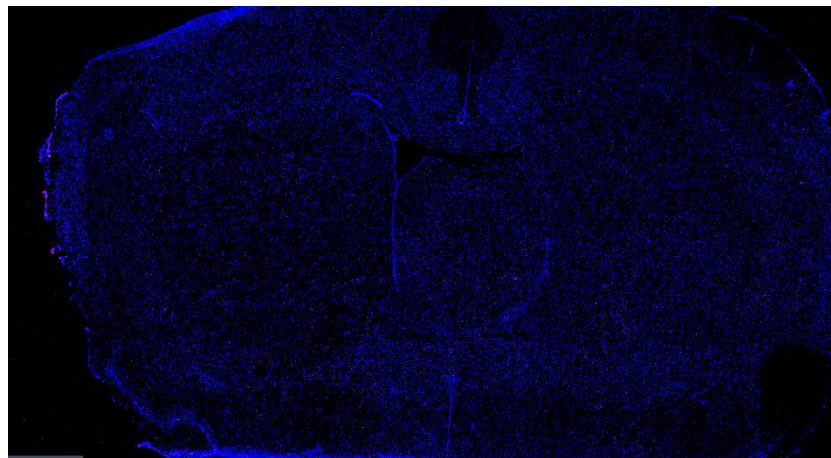
4.8. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama

Nöronal hasarın değerlendirilmesi için dekapitasyondan sonra, serebral dokular hızlıca çıkarılıp kuru buzda donduruldu ve kyrostat cihazında (Leica) 18 mikrometrelik kesitler alındı. Kesitler alanı olarak sıçan beyin atlasında gösterilen koronal diagramlardan Figür 18'de primer somatosensör korteks-barrel alanı belirlendi (Şekil 12 ve 13). Alınan kesitler slaytlara yapıştırıldı ve slaytlar ısıtıcı tablada 40 ± 5 °C'de 30 dk süreyle kurutuldu ve yine 30 dk süreyle oda sıcaklığında (20-25°C) bekletildi. Oda sıcaklığında bekletilen beyinler -20°C'deki etanolün içerisinde 15 dk fikse edildi. 3x5 dk shaker üzerinde fosfat tampon solüsyonu (PBS) içerisinde 80 RPM'de çalkalandı. %5 bovine serum albümin (BSA) (Sigma) ve PBS-T ile hazırlanan blok solüsyon her beyine 30 mikrolitre (μ l) olacak şekilde eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle 80 RPM'de çalkalandı. Daha sonra primer antikor (Proteintech) eklendi +4°C' de bir gece (yaklaşık 12-16 saat) 80 RPM'de çalkalandı.

Ertesi gün kesitler, 3x5 dk karıştırıcı üzerinde PBS’de 80 RPM’de yıkandı. Sekonder antikor (Jakson ImmunoResearch) eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında 80 RPM’de çalkalandı. Sekonder antikordan sonra kesitler 3x5 dk shaker üzerinde PBS ile içerisinde yıkandı. Çekirdek boyası (DAPI) eklenip 5 dk süreyle karanlık ortamda bekletildi. Kesitler, 80 RPM’de 5 dk PBS içerisinde çalkalandı. Kesitler lam üzerinde karanlıkta kuruduktan sonra Gel/Mount akışkan koruyucu madde ile kaplandı ve lamelle üzeri kapatıldı. ZEİSS floresan mikroskopta 10* büyütme ile görüntüler incelenip fotoğrafları çekildi. İlgili bölgelerin yoğunluk analizi yapıldı.



Şekil 12. Fare beyin atlasında primer somatosensör kortex-barrel alanı



Şekil 13. DAPI boyaması yapılan beyin kesitinin panoramik görüntüsü

4.9. Western blot analizi

Doku Parkin (ThermoFisher Scientific, Katolog no: PA1-751), PINK1 (ThermoFisher Scientific, Katolog no: PA1-16604), FUNDC1 (ThermoFisher Scientific, Katolog no: PA1-77785), BNIP3 (ThermoFisher Scientific, Katolog no: PA5-96388) ve BNP (ThermoFisher Scientific, Katolog no: PA5-96084) düzeyleri Western blot analizi için ilgili antikorlar kullanıldı. Primer antikorlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar, antikorlar ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37°C'de 90 dk süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Normalizasyon için beta-aktin kullanıldı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı, rölatif yoğunluklar Image Analyses System yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

4.10. İstatistik

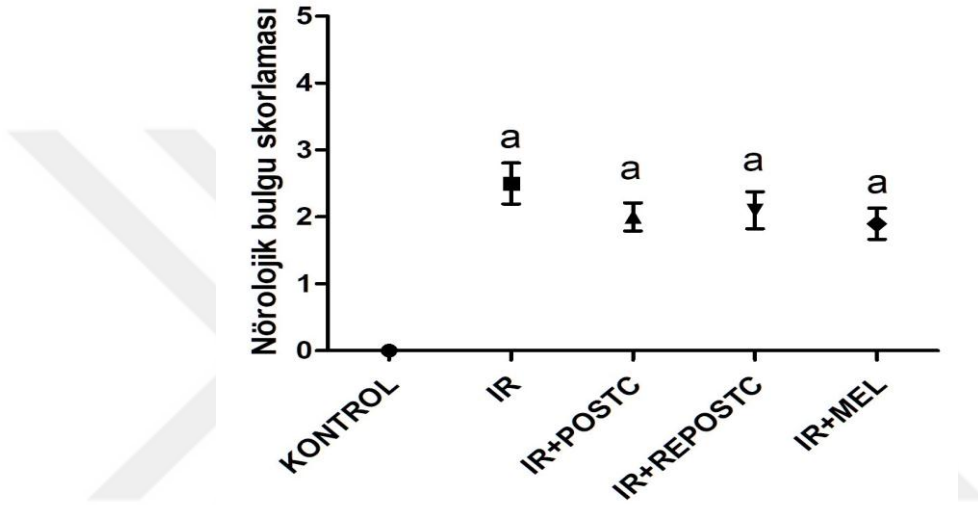
Veriler SPSS 21.0 programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve ortalama±standart sapma olarak belirlendi. Verilerin normallik analizi Shapiro–Wilk testi ile, gruplar arası farklılığın tespiti tek yönlü ANOVA analizi ve Post Hoc Tukey testi ile yapıldı. Korelasyon testi için Pearson ve iki yönlü önemlilik testi uygulandı. $p<0.05$ olduğunda, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



5.BULGULAR

5.1. Nörolojik bulgu skorlaması

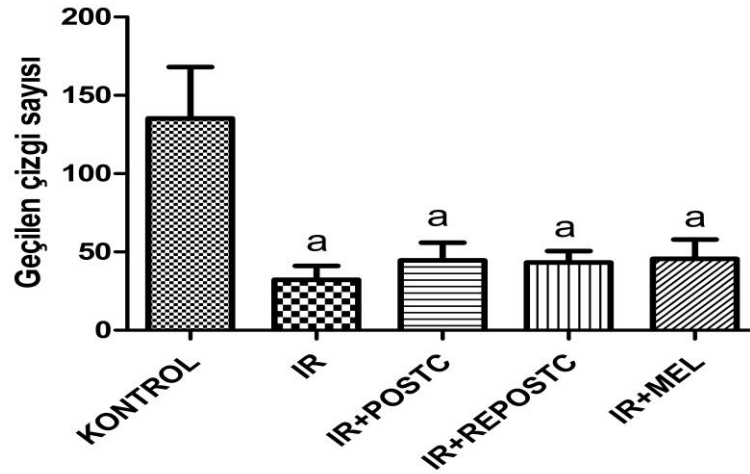
Nörolojik bulguların skor ortalaması IR grubunda $2,5 \pm 0,97$ düzeyindeydi, tedavi metodları IR'ye göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (IR+PostC: $2,2 \pm 0,67$, IR+RePostC: $2,1 \pm 0,88$, IR+Mel: $2,1 \pm 0,82$).



Şekil 14. Nörolojik bulgu skorlamasının gruplara göre değişimi. (a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.01$)

5.2. Açık alan testi

Sıçanların geçtikleri çizgi sayısı IR grubu ($32,30 \pm 8,74$)'nda kontrol ($135,3 \pm 32,74$)'e göre anlamlı azaldı. IR+PostC ($44,60 \pm 11,34$), IR+RePostC ($43,30 \pm 7,30$) ve IR+Mel ($45,50 \pm 12,34$) gruplarında IR grubuna göre anlamlı bir değişme gözlenmedi.

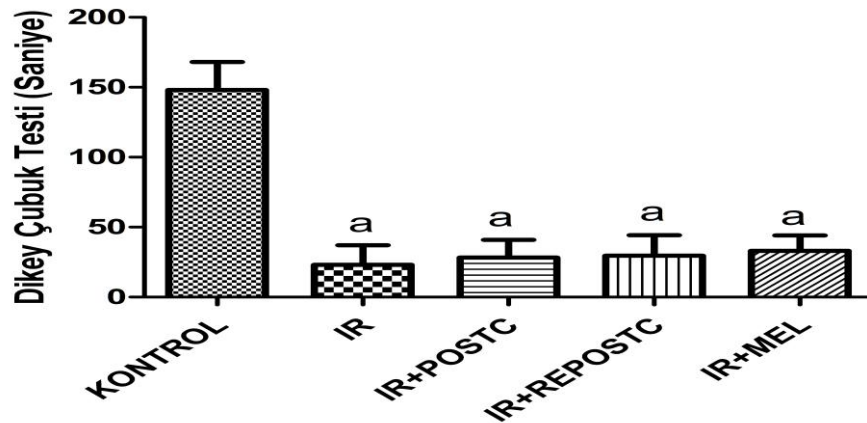


Şekil 15. Açık alan testinde geçen çizgi sayısının gruplara göre değişimi.

(a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.01$)

5.3. Dikey Çubuk Testi

Sıçanların dikey çubukta kalma süreleri değerlendirildiğinde IR grubu ($23,10 \pm 13,98$ sn)'nda kontrol ($148,1 \pm 19,97$ sn)'e göre anlamlı azaldı, tedavi gruplarında ise IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişmeye rastlanmadı (IR+PostC: $28,20 \pm 12,78$ sn, IR+RePostC: $29,60 \pm 14,63$ sn, IR+Mel: $33,00 \pm 11,09$ sn).

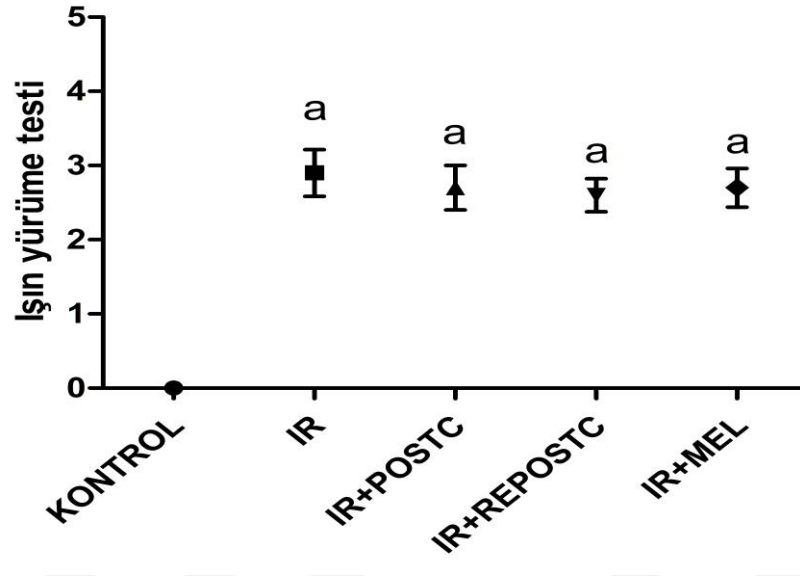


Şekil 16. Sıçanların dikey çubukta kalma sürelerinin gruplara göre

değişimi. (a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.01$)

5.4. Işın yürüme testi

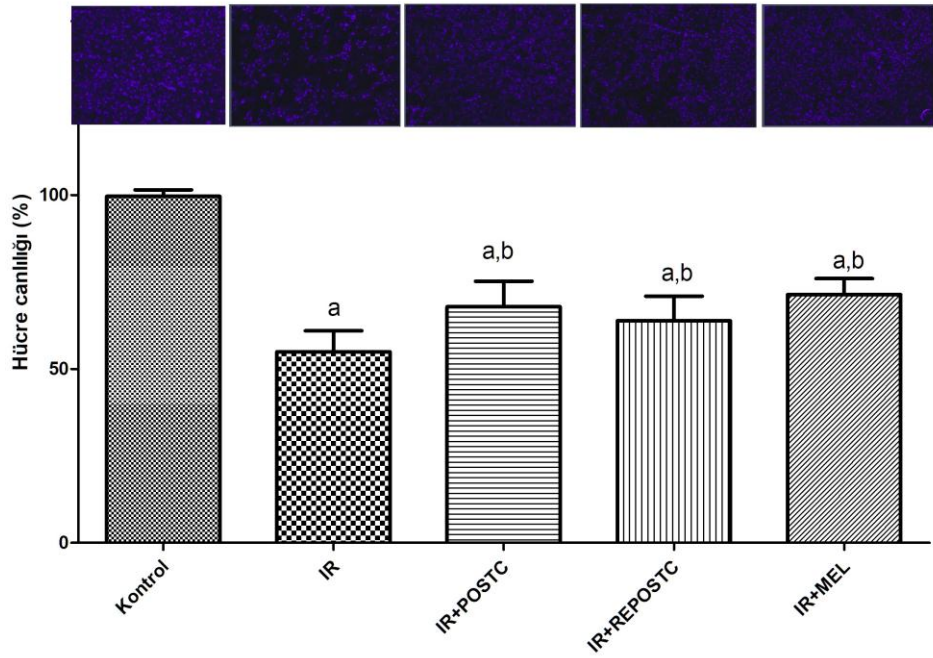
Işın yürüme testi skor ortalaması IR ($2,99 \pm 0,99$) ile anlamlı arttı, tedavi metodları ise anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (IR+PostC: $2,7 \pm 0,95$, IR+RePostC: $2,6 \pm 0,7$, IR+Mel: $2,7 \pm 0,82$).



Şekil 17. Işın yürüme testi bulgularının gruplara göre değişimi. (a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.01$)

5.5. DAPI boyama

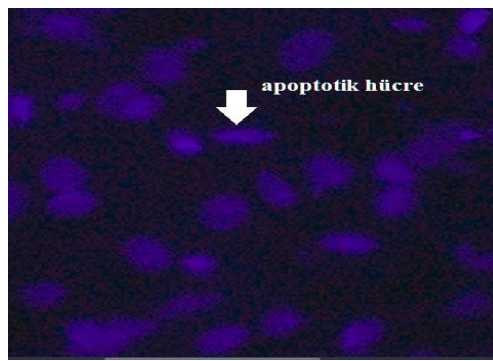
Kontrol grubu hücre canlılığı %100 kabul edildiğinde, IR grubunda hücre yoğunluğu $\%54,96 \pm 6,04$ tü. Tüm tedavi gruplarında IR grubuna göre hücre yoğunluğu oranı anlamlı olarak arttı (IR+PostC: $67,90 \pm 7,36$, IR+RePostC: $63,83 \pm 7,089$, IR+Mel: $72,8 \pm 5,56$).



Şekil 18-a. Hücre yoğunluğu yüzdesinin gruplara göre değişimi.

(a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b:IR grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.01$)

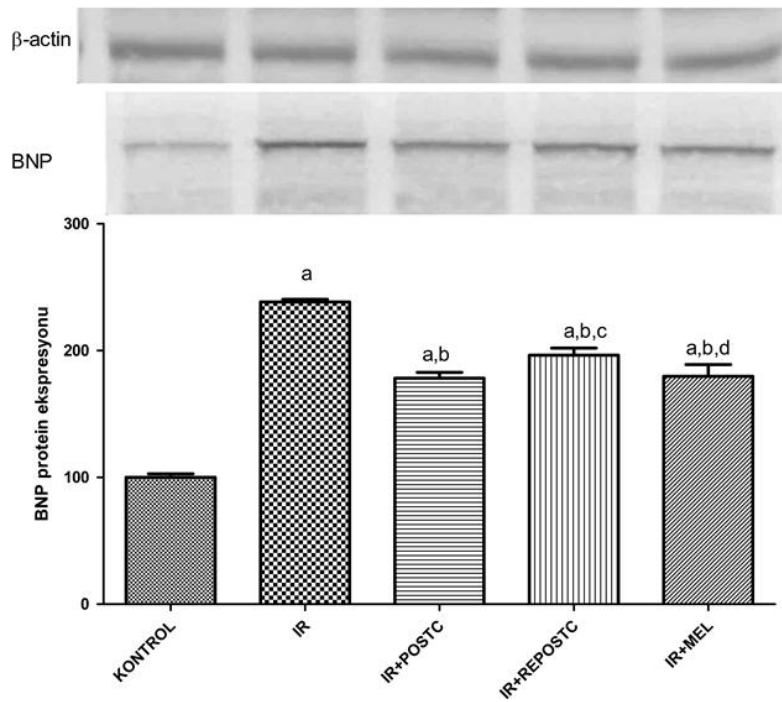
Ayrıca OSA oklüzyonuna maruz kalan sıçanların beyin dokusunda DAPI boyama ile Şekil 12’ de gösterilen tübüler şekilli apoptotik nükleer yapılara rastlandı.



Şekil 18-b. Apoptoz göstergesi nükleer yapılar

5.6. BNP protein ekspresyon düzeyleri

BNP protein ekspresyon düzeyleri IR grubu ($238,38 \pm 2,13$)'nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı, IR+PostC ($178,29 \pm 4,62$), IR+RePostC ($196,49 \pm 5,53$) ve IR+Mel ($179,74 \pm 9,24$) gruplarında ise IR grubuna göre anlamlı azaldı. Tedavi gruplarında IR+PostC ve IR+Mel gruplarındaki değişim IR+RePostC grubuna göre anlamlı bulundu.

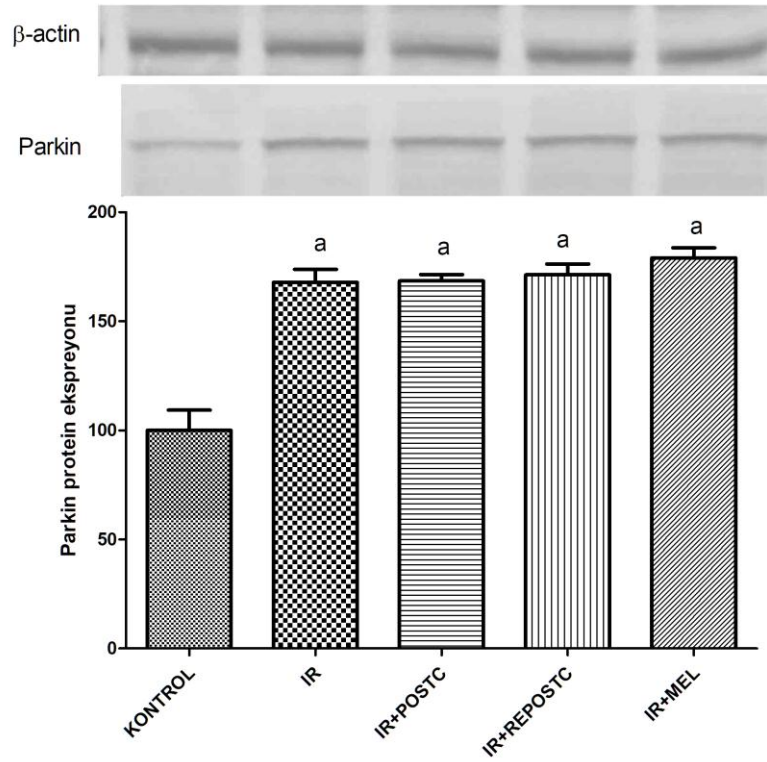


Şekil 19. BNP protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi

(a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b:IR grubuna göre anlamlı farklılık, c:IR+PostC grubuna göre anlamlı farklılık, d:IR+RePostC grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.05$)

5.7. Parkin protein ekspresyon düzeyleri

Parkin protein ekspresyon düzeyleri IR grubu ($167,84 \pm 5,95$)'nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı; IR+PostC ($168,53 \pm 2,84$), IR+RePostC ($171,28 \pm 5$) ve IR+Mel ($179,04 \pm 4,68$) gruplarında ise IR 'ye göre anlamlılık görülmedi.

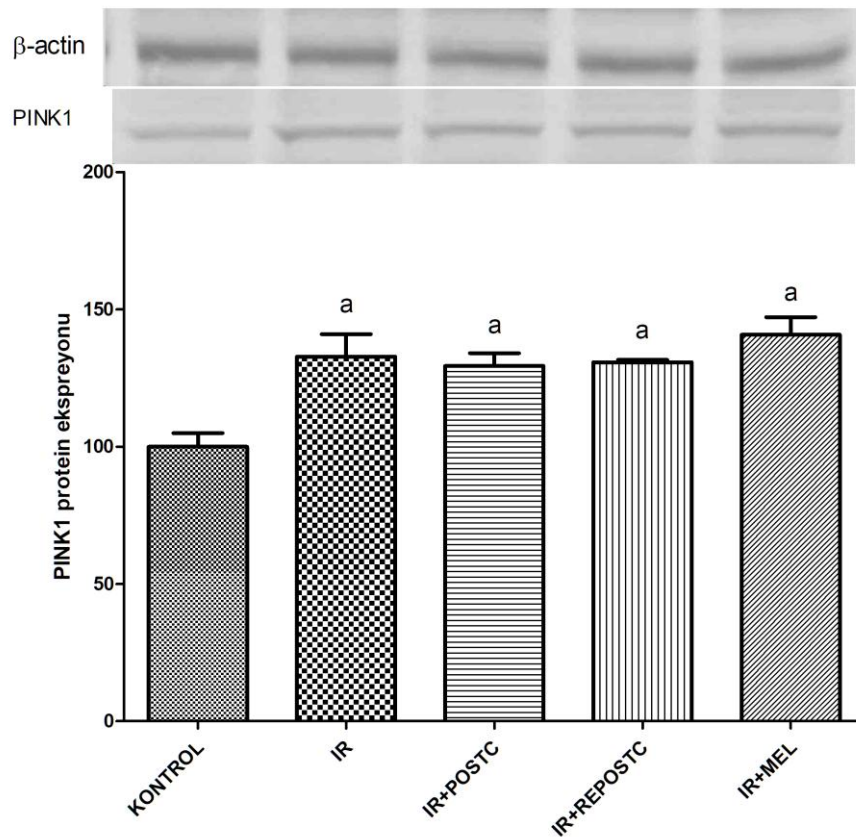


Şekil 20. Parkin protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.

(a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.05$)

5.8 PINK1 protein ekspresyon düzeyleri

PINK1 protein ekspresyon düzeyleri IR grubu ($132,83 \pm 8,22$)'nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı. IR+PostC ($129,4 \pm 4,7$), IR+RePostC ($130,77 \pm 0,85$) ve IR+Mel ($140,05 \pm 6,01$) gruplarındaki değişim ise IR grubuna göre anlamlı değildi. Ek olarak, uygulanan korelasyon testinde Parkin ve PINK1 düzeyleri arasında 0,01 anlamlılık düzeyinde pozitif korelasyon görüldü.

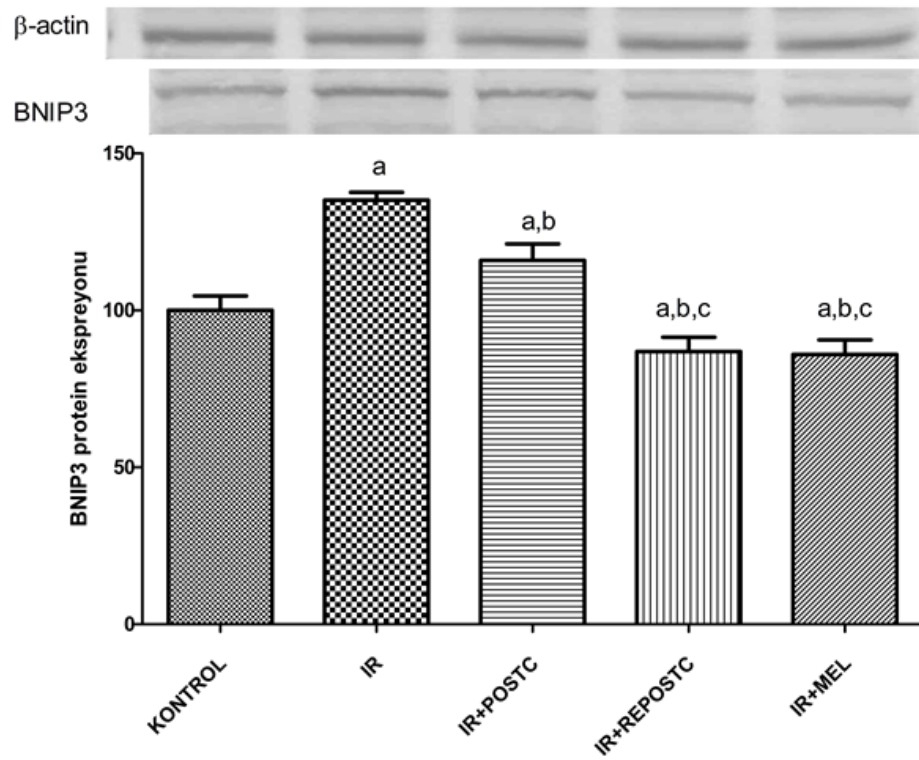


Şekil 21. PINK1 protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.

(a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.05$)

5.9. BNIP3 protein ekspresyon düzeyleri

BNIP3 protein ekspresyon düzeyleri IR ($135,08 \pm 2,52$) grubunda kontrol grubuna göre anlamlı arttı, IR+PostC ($115,89 \pm 5,25$), IR+RePostC ($86,85 \pm 4,58$) ve IR+Mel ($85,96 \pm 4,63$) gruplarında ise IR grubuna göre anlamlı azaldı. IR+RePostC ve IR+Mel gruplarındaki azalma IR+PostC grubuna göre daha fazlaydı.

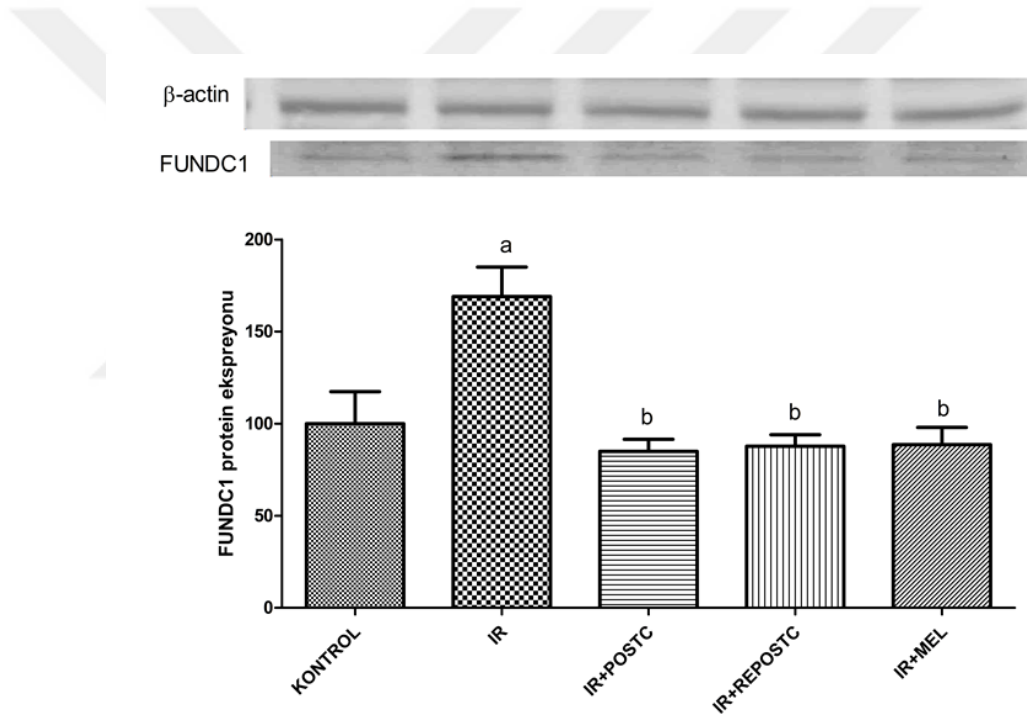


Şekil 22. BNIP3 protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.

(a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b:IR grubuna göre anlamlı farklılık, c:IR+PostC grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.05$)

5.10. FUNDC1 protein ekspresyon düzeyleri

FUNDC1 protein ekspresyon düzeyleri IR grubu ($169,07 \pm 15,92$)'nda kontrol grubuna göre anlamlı arttı. IR+PostC ($84,96 \pm 6,52$), IR+RePostC ($87,76 \pm 6,22$) ve IR+Mel ($88,66 \pm 9,26$) gruplarında ise IR grubuna göre anlamlı azaldı. Tedavi gruplarındaki değişimler birbirleriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlılığa rastlanmadı. Bunun yanında, FUNDC1 ve BNIP3 düzeyleri arasında 0,01 düzeyinde anlamlı pozitif korelasyon görüldü.



Şekil 23. FUNDC1 protein ekspresyon düzeylerinin gruplara göre değişimi.

(a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b: IR grubuna göre anlamlı farklılık, n:10, $p < 0.05$)

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda mitofajinin farklı yollarında görevli Parkin-PINK1, BNIP3 ve FUNDC1 protein ekspresyon düzeyleri IR ile kontrole göre anlamlı artarken; IR ile kıyaslandığında PostC, RePostC ve melatonin tedavileri ile Parkin ve PINK1 ekspresyon düzeylerinde değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi, BNIP3 ve FUNDC1 düzeyleri ise anlamlı azaldı. DAPI boyama ile elde edilen hücre yoğunluğu IR ile azalırken, serebral hasar göstergesi BNP düzeylerinde artış gözlemlendi. Tedavi grupları ise bu değişimleri inhibe etti. Davranış testlerinde sıçanların geçtikleri çizgi sayısı IR ile azalırken, dikey çubukta kalma süreleri kısaldı, ışın yürüme testi ve nörolojik bulgu skor ortalamaları anlamlı arttı. Uygulanan tedaviler davranış testlerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadi. Çalışmamızda serebral IR hasarında melatonin ve ardkoşullanmanın Parkin-PINK1, BNIP3 ile FUNDC1 düzeyleri üzerine etkileri ve serebral iskemiden FUNDC1 düzeylerinin nasıl etkilendiği ilk kez gösterildi.

Melatoninin birçok yolak ve genleri hedefleyerek IR hasarında enfarktüs hacmi ile ödemi azalttığı ve sağkalımı desteklediği bilinmektedir. Reperfüzyon başlangıcında melatonin ve ramelteon uygulanan in vitro sıçan kalbinde, infarkt alanı anlamlı azalmış, reseptör inhibitörü luzindol uygulaması ise bu koruyucu etkinin ortadan kalkmasına neden olmuştur (92). Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarda, melatoninin infarkt alanı üzerine PostC (93) ve PerC (94)' ye benzer oranda koruyuculuk sağladığı; uncoupling protein (UCP) 3, irisin, and NFkB düzeylerinde benzer değişimler oluşturduğu gösterildi. Ayrıca pinealektomi uygulanarak endojen melatonin düzeyinin azaltıldığı sıçanlarda PostC ve PerC'nin koruyuculuğunun ortadan kalktığı, eksojen melatonin uygulaması ile ise

koruyuculuğun geri kazandırıldığı gözlemlendi (93, 94). Benzer şekilde bu çalışmada da melatonin, PostC ve RePostC metodları ile aynı mitofaji yolları üzerine benzer etkiler gösterdi. Bu veriler, melatoninin ardkoşullanma yapan bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda 10 mg/kg melatonin ip enjeksiyonla tek doz şeklinde reperfüzyon öncesinde uygulandı. Global iskemiye maruz kalan sıçanlarda, iskeminin indüklenmesinden 1 saat sonra ip verilen 10 mg/kg melatonin SOD ve GR düzeylerini IR grubuna göre anlamlı azaltmıştır (95). Benzer şekilde, gebe sıçanlara oklüzyondan 60 dakika önce 10 mg/kg ip melatonin uygulaması, fetal sıçan beyinde mitokondriyal solunum aktivitesinin göstergesi olan solunum kontrol indeksi ve adenosin 5-difosfat/oksijen oranında IR'nin neden olduğu azalmaları normalize etmiştir (96). Chumboatong ve ark (97), sıçanlara kalıcı OSA oklüzyonundan 1 saat sonra tek doz melatonin (10 mg/kg, ip) uygulamışlar ve melatoninin, nörolojik defisit skorlarını ve MDA düzeylerini azalttığını, nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) protein ekspresyonunu arttırdığını ve apoptotik hücre ölümünü suprese ettiğini rapor etmişlerdir.

Açık alan testi, kemirgenlerdeki motor fonksiyonu ve normal keşif hareketini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (98). Açık alan aparatına tekrar tekrar maruziyet, hayvanların alışmasına neden olarak gözlem süresi boyunca hayvanların hareketini azaltır (99). Bu nedenle çalışmamızda hayvanlar deney alanında ön-eğitime tabi tutulmadı. Fokal iskeminin akut fazları sırasında hipoaktif bir fenotip gelişebilir. Bu hipoaktivite süresi değişkendir ve iskemi modeli, prosedürün şiddeti ve fare/sıçan suşu gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği düşünülmektedir (100). Çalışmamızda, açık alan testinde IR ile sıçanların geçtiği

çizgi sayısı azalırken, tedaviler ile anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bu etki, reperfüzyon süresinin 24 saatle sınırlı olmasından kaynaklanabilir. Benzer şekilde, subaraknoid kanamaya bağlı beyin hasarında isofluran PostC; nörolojik skor, rotarod testi ve açık alan testinden türetilen maksimum hız ve merkez-toplam mesafe oranındaki zaman-rota değişiklikleri cerrahi girişimden 24 saat sonra anlamlı bir değişiklik oluşturmazken, 48 saat sonra nörodavranışsal fonksiyonda tedaviye anlamlı cevap alındığı gösterilmiştir (101). Sol KKA'nın kalıcı bağlanmasıyla oluşturulan serebral hipoperfüzyonda 2. gün açık alan testinde belirgin motor bozukluğu görülürken 15. günde hareket sayısında artış görülmüştür (102).

Motor koordinasyonu değerlendirmek için kullanılan testlerden bir diğeri de dikey çubuk testidir. Genç ve yaşlı farelerde yapılan 60 dk.lık OSA oklüzyonu sonrasında genç sıçanlarda dikey çubuk test süresinde 1 ve 3. günlerde sham grubuna göre anlamlı bir azalma söz konusu iken, 5. günden itibaren iki grup arasında teste bağlı anlamlılık ortadan kalkmıştır. Yaşlı farelerde ise bu iyileşme 9. günde görülmüştür (103). Sıçanlarda beyin inflamasyonu modelinde, inflamasyonun indüklenmesinden 39 gün sonra yapılan dikey çubuk testinde hasara bağlı motor koordinasyon anlamlı azalırken, egzersiz uygulaması ile anlamlı iyileşme görülmüştür (104). Bizim çalışmamızda ise sıçanların dikey çubuk üzerinde geçirdiği süre iskemik hasar ile anlamlı azalırken, tedavi metodları anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Bu durumun nedeni reperfüzyon süresinin kısa olması ile ilişkili olabilir.

Sıçanlarda OSA oklüzyonundan 24 saat sonra ışın yürüme testi uygulanmış ve hayvanların motor koordinasyonunda anlamlı bozulma ile karşılaşılmıştır (105). Çalışmamızda da IR hasarı ile ışın yürüme testlerinde yüksek skorla karşılaşıldı ve

tedavi metodları bu skorlar üzerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Travmatik beyin hasarı oluşturulan farelerde ise ışın yürüme test sonuçları incelendiğinde, hasar ile birlikte teste verilen cevap süresinin anlamlı uzadığı; melatonin tedavisinin ise 5. günden sonra anlamlı bir iyileşme sağladığı görülmüştür (91). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada tekrarlayan RePostC (cerrahi girişimden sonra 3 gün günde bir kez) uygulaması subaraknoid kanama girişimi sonrası ikinci günden itibaren ışın yürüme testinde anlamlı iyileşme sağlarken erken RePostC (cerrahi girişimden hemen sonra) ve gecikmeli RePostC (cerrahi girişimden yarım saat sonra) 3 gün içinde söz konusu davranış testinde anlamlı bir değişim sağlamamıştır (106).

Beyin dokusu bölgeleri, farklı nöronal yapı içeriği ve hücre tiplerinin metabolizmasına bağlı olarak iskemiye farklı duyarlılıklar gösterir (107). Somatosensör korteks ve özellikle barrel alanı iskemiye karşı oldukça duyarlıdır (108). Anoksik depolarizasyon, parietal duyu korteksinin barrel alanında ortaya çıkar ve yayılır (109). Anoksik depolarizasyon, in vitro beyinde oksijen-glukoz yokluğuna bağlı serebral hasarın ve in vivo iskemik kordaki hasar ve geri dönüşümsüz aktivite kaybının başlatıcısıdır (110). Çalışmamızda nöronal hasarın değerlendirilmesi için primer somatosensör korteks-barrel alanı kullanıldı ve bu bölgenin hem iskemik hasara hem de tedavilere anlamlı şekilde cevap verdiği görüldü.

Nekroz; rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen, düzensiz bir süreçtir. Serebral doku hariç diğer tüm dokularda hipoksik ölümde karakteristik olarak karşılaşılan nekroz tipi koagülasyon nekrozu iken; beyin dokusu hipoksisinde dokunun enzimatik sindirimi ile ortaya çıkan likefaksiyon nekrozu görülür. Bu nekroz tipinde hücresel yapılar korunmaz (111). DAPI, deforme olmamış hücre

zarından geçerek nükleusu boyayan ve DNA fragmentasyon tespit yöntemlerinden biri olan immunoflorosan boyama çeşitidir (112). Çalışmamızda IR ile azalan hücre yoğunluğu tedavi gruplarında IR'ye göre anlamlı arttı. Sun ve ark. (113) OSA'ya 100 dk iskemi ve ardından 24 saat reperfüzyon uygulanan sıçanlarda, 1 siklus 10*10 dk RI şeklindeki PostC' nin iskemik çekirdek alanını çevreleyen koronal bölümlerde IR ile azalan hayatta kalan nöron (surviving neurons) sayısını anlamlı artırdığını; PostC ile birlikte otofaji inhibitörü 3-metiladenin (MA) uygulamasının bu koruyuculuğu azalttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, Tunel pozitif hücreler PostC ile azalırken, beraberinde MA uygulamasının söz konusu hücreleri artırdığı görülmüştür. 2 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyon uygulanan sıçanlarda IR'den 30 dakika önce ve sonra iki defa 5 mg/kg dozunda *ip* melatonin enjeksiyonunun striatum ve subventriküler bölgedeki oligodendrositleri kontrol ve IR grubuna göre anlamlı artırdığı çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA)/NG2 immünofloresan boyaması ile rapor edilmiştir. 72 saat reperfüzyondan sonra da PCNA/NG2 ve DAPI boyamalarının bu sonuçlarla uyumlu olduğu gösterilmiştir (114).

İskemik inmeye bağlı beyin ödemi patojenezinde yüksek BNP düzeyleri etkilidir (115). Beyindeki iskemik alanın potansiyel bir plazma BNP kaynağı olabileceği ve OSA oklüzyonunun sıçan beyindeki BNP mRNA ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (79,80). 60 dakika oklüzyonu takiben 48 saat reperfüzyona maruz kalan sıçanlarda beyin dokusu BNP seviyesinde anlamlı artış gösterilmiştir. Bununla birlikte IR öncesinde, sırasında ve sonrasında safran uygulaması ile beyin dokusu BNP düzeyi azalmıştır (116). Benzer şekilde, çalışmamızda da IR sonrası yükselen doku BNP düzeyleri PostC, RePostC ve melatonin tedavileri ile anlamlı azaldı. 2 saat sağ OSA iskemisi ve 24 saat reperfüzyon sonrası korpus striatumda

western blot tekniği ile BNP ekspresyon analizi yapılmış ve çalışmamıza benze şekilde kontrole göre yüksek ekspresyon seviyesi ile karşılaşılmıştır (117). Klinik bir çalışmada yüksek plazma BNP seviyelerinin, serebral enfarktüs ile güçlü ve bağımsız bir şekilde ilişkili olduğunu ve bu ilişkinin belirgin olarak anjiyografik vazospazmı olmayan hastalarda görüldüğünü rapor etmişlerdir (118). Dokudan BNP salınımı proinflamatuvar sitokinlerle ilişkilendirmektedir (119). BNP'nin mitokondriyal ROS üretimini azalttığı ve mitokondriyal ATP'ye duyarlı potasyum kanalının açılmasına neden olduğu rapor edilmiştir (120). Bununla birlikte, hipoksinin ilk önce HIF-1 α 'nın ekspresyonunu indüklediği ve buna bağlı olarak BNP mRNA'nın aktivasyonu ve ekspresyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir (121). Ayrıca mPTP açılmasını inhibe ederek ve PI3K/Akt yolağı aracılı koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (122). Akut stresle birlikte artan BNP düzeyleri beyin hasarını azaltmak için enflamasyon, mitokondri ve PI3K/Akt gibi yaşamsal yolaklara etki ederek endojen protektif bir rol oynayabilir.

Parkin ve PINK1, mitofajinin spesifik bir yolağını oluşturur ve mitokondrinin otofajik bozunmasında önemli rol oynar. Çalışmamızda Parkin ve PINK1 ekspresyon düzeyleri IR ile anlamlı arttı. Sıçanlarda 90 dk OSA oklüzyonu sonrası 6, 12, 24 ve 48 saat reperfüzyon gerçekleştirilmiş, tüm zaman noktalarında PINK1 pozitif hücrelerin belirgin regülasyonu saptanmıştır. Parkin'in ise reperfüzyondan 12-48 saat sonra önemli ölçüde arttığı ve her iki proteinin de 24 saat sonra maksimum seviyeye ulaştığı ve 48 saat sonra kademeli olarak azaldığı gösterilmiştir (123). 60 dk oklüzyon ve 7 gün reperfüzyona tabi tutulan transgenik farelerde, PINK1 overekspresyonunun Parkin protein düzeyinin yükselmesini sağladığı rapor edilmiştir (124).

Parkin proteinini kodlayan Park2 geni iskemik nöronlarda, mitokondriyal transmembrandaki potansiyel kaybı algılar ve degradasyon için hedeflenen hasarlı mitokondride birikir (125). Farelerde OSA oklüzyonundan 24 saat sonra mitokondriyal Park2 translokasyonunu arttığı gösterilmiştir. İskemiye bağlı infarkt hacmi Park2 silinmesi ile artarken, CO2 maruziyeti ile oluşturulan asidik PostC ile değişmemiş; Park2-/- nöronlarına eksojen Park2 uygulaması ile ise asidik PostC' nin nöroprotektif etkisi geri dönmüştür (126). Tiroid hormonunun biyolojik aktif formu olan triiyodotironin (T3) PostC, izole sıçan kalbinde 30 dk iskemi/45 dk reperfüzyon ile düzeyleri artan PINK1 ve Parkin protein ekspresyonunu daha da artırdığı rapor edilmiştir (127). Sıçanlarda 90 dk sağ OSA oklüzyonu sonrası 24 saat reperfüzyon uygulanmış, bilateral olarak iki bacağa 3 siklus 10'ar dk şeklinde gerçekleştirilen RePostC ile nörolojik defisit skorları ve serebral enfarktüs boyutunun yüzdesi azalırken, Parkin proteininin yukarı ifadesi rapor edilmiştir (128). Çalışmamızda ise Parkin ve PINK1 düzeyleri RePostC ve diğer tedavi uygulamalarından etkilenmedi. Protein düzeylerinin tedaviye verdiği cevaplardaki farklılık, önceki çalışmanın sağ OSA oklüzyonu yapması ve/veya RePostC'nin bilateral olarak iki bacağa uygulanması ile ilişkili olabilir. Parkin ve PINK1 düzeyinin serebral IR hasarında melatonin ve klasik PostC uygulamalarından nasıl etkilendiğine dair çalışma bizim bilgilerimize göre mevcut değildir. Sıçanlarda subaraknoid hemorajide, PINK1 ve Parkin protein ekspresyonunun cerrahi prosedürden 24 saat sonra kontrole kıyasla arttığı, melatonin tedavisinin bu ekspresyonu daha fazla indüklediği ve MA'nın melatonin ile uygulanmasının Parkin ve PINK1 düzeylerini hemoraji ve melatonin grubuna göre anlamlı azalttığı rapor edilmiştir (129).

BNIP3 normal şartlarda SSS'de düşüktür, ancak hipoksik ve iskemik koşullarda eksprese edilmesi için indüklenebilir (130). 1 saat OSA iskemisi 24 saat reperfüzyona tabi tutulan sıçanlarda (131) ve travmatik beyin hasarında (132) BNIP3 düzeylerinde anlamlı artış görülmüştür. Aynı zamanda BNIP3 geni susturmanın yenidoğan beyin hipoksisinde nöroprotektif etkili olduğu bildirilmiştir (133). İnsan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde nörotoksik syflutrin maruziyetine yanıt olarak artmış BNIP3 gen ifadesi melatonin tedavisi ile anlamlı olarak azalmıştır (134). Ayrıca kronik serebral hipoperfüzyonda Parkin ve BNIP3 protein ekspresyonu ve LC3-II/LC3-I oranı anlamlı şekilde artmıştır (135). Benzer şekilde çalışmamızda BNIP düzeyleri IR hasarı ile artarken, ardkoşullanma ve melatonin uygulamaları ile anlamlı azaldı.

FUNDC1 yeni saptanan bir mitofaji reseptörüdür ve LC3 ile doğrudan etkileşerek mitokondriyal iş hacmini yönetir. FUNDC1 mitofajisinin uygun şekilde aktivasyonu sadece mitokondriyal performansın sürdürülmesi için değil, aynı zamanda miyokardiyal IR hasarında hücre/organ homeostazı, mikrovasküler reperfüzyon defektleri ve trombosit aktivasyonu/agregasyonu için hayati öneme sahiptir (13). Çalışmamızda IR hasarı ile artan FUNDC1 protein ekspresyonu tedavilerle anlamlı azaldı. Benzer şekilde, Pc-12 nöroendokrin hücre kültüründe FUNDC1 protein ekspresyon artışının hipoksinin 6. saatinden itibaren anlamlı hale geldiği gösterilmiştir. Relatif mRNA ekspresyonu ise 24. saatte bile anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (74). FUNDC1'in serebral dokuda etkileri ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlı olmasına karşın kardiyak çalışmalar dikkat çekmektedir. Kardiyak iskeminin mitokondri aracılı apoptozu önlemek için defosforilasyon (Tyr18) yoluyla FUNDC1'i aktive ederek mitofajiyi artırdığı, ancak izole

kardiyomiyositlerde reperfüzyonla protein düzeyinin aşağı regüle edildiği bildirilmiştir (136). FUNDC1, IR hasarından 12 saat önce *ip* olarak (20 mg/kg) uygulanan melatonin 2 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon şeklindeki kardiyak IR hasarı ile azalan FUNDC1'in aktif olmayan formunun düzeyini tersine çevirmiştir (137). FUNDC1, sigara dumanı ekstrelerine maruz kalan insan bronşiyal epitel hücrelerinde ve KOAH farelerinde yüksek oranda eksprese edilmiştir. FUNDC1'in susturulmasının IL-6 ve TNF- α ve mPTP seviyelerini azalttığı, mukosilyer klirensi artırdığı ve sigara dumanının neden olduğu mitokondriyal otofajiyi ve hücre apoptozunu inhibe ettiği gözlenmiştir (138). Çalışmamızda uygulanan tedavilerin serebral koruyucu etkisinde mitofaji regülasyonunun yanısıra FUNDC1 düzeylerinin azalmasına bağlı olarak enflamasyon (IL-6) ile apoptoz (TNF- α)' un azaltılmasının ve mitokondriyal bütünlüğün (mPTP) sağlanmasının rolü olabilir.

Mitofaji yollarının arasında bir koordinasyon olup olmadığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Epidemiyolojik ve deneysel verilere göre potansiyel olarak Parkinson oluşturma riskine sahip insektisid olan rotenona maruz kalan SH-SY5Y hücrelerinde FUNDC1 reseptör aracılı mitofajinin PINK1/Parkin'e bağlı mitofajiden bağımsız olduğunu ortaya konmuştur (7). PINK1 delesyonu yapılmış farelerde miyokard enfarktüsünden sonra kalpte Parkin'in hasar görmüş kardiyak mitokondriye alındığı ve hücrelerin Parkin ekspresyonunu artırarak PINK1 eksikliğini telafi etmeye çalıştığını gösterilmiştir. Bu durum depolarize kardiyak mitokondriye Parkin alımının ve mitofajinin aktivasyonunun PINK1'den bağımsız olduğunu düşündürmektedir. Bu da BNIP3'ün mitokondriyal klerense aracılık etmesi için PINK1 eksikliğini telafiye dayalı bir mekanizmaya dahil olmadığını göstermektedir (139). Parkin eksik miyositlerde ise BNIP3 aracılı otofajinin azaldığı

gösterilmiştir (140). BNIP3'ün mitofaji üzerine etkisini PINK1 ile değil Parkin ile koordine ettiği düşünülebilir. BNIP3'ün inaktivasyonunun ise PINK1'i proteolitik işleme teşvik ettiği ve PINK /Parkin aracılı mitofajiyi baskıladığı bildirilmiştir. Hipoksinin neden olduğu BNIP3 ekspresyonu, PINK1 ve mitofajinin ekspresyonunun artmasına neden olur (141). Hücre kültüründe kardiyak progenitör hücre farklılaşması sırasında mitofaji reseptörleri FUNDC1 ve BNIP3 delesyonunun mitokondriyal ağ oluşumunu ve farklılaşma sırasında işlevsiz mitokondri birikimini artırdığı bildirilmiştir (142). NIX/Bnip3'un LC3II'e daha az bağlanma gösterdiği bu nedenle FUNDC1 mitofajisinin, NIX veya Bnip3 ile indüklenen mitofajiden bağımsız olduğu ve hipoksi ile indüklenen mitofaji sırasında FUNDC1'in ekspresyonu zayıflatıldığında ise hem NIX hem de BNIP3'ün arttığı bulunmuştur (75). Çalışmamızda Parkin ile PINK1 düzeyleri arasında ve FUNDC1 ile BNIP3 düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon görüldü. Bizim sonuçlarımız ve yukarıdaki tüm literatür verileri birlikte değerlendirildiğinde FUNDC1 yolağının Parkin/PINK1 ve BNIP3'ten bağımsız olduğu, BNIP3 yolağının ise PINK1'den bağımsız iken; Parkin ve FUNDC1'deki değişimlerden etkilendiği çıkarımında bulunulabilir.

Otofaji gibi mitofajinin de inmede sağkalım veya ölümü desteklediğine dair net bir teori yoktur. Akut serebral iskemi hasarında artmış mitofaji mitokondriyal yapının bozulmasını önleyerek ve mitokondriyal zar potansiyelini koruyarak, nörolojik fonksiyonu iyileştirmiş ve infarkt alanını azaltmıştır. Bu bulgular, inme sırasında mitofajinin koruyucu rolü olduğunu savunmaktadır (143). Öte yandan, karnosin tedavisinin p-Drp1 ve Parkin düzeyini azalttığı ve aynı zamanda apoptozu indükleyen faktör ve sitokrom C salınımını inhibe ettiği ve azalan mitofajinin

mitokondriyal korumayı sağladığı rapor edilmiştir (144). Bunun farklı olarak, aktive olan Parkin'in voltaj bağımlı anyon seçici kanal protein 1 (VDAC1)'i ubiquitinleyerek apoptozisi baskıladığı bildirilmiştir (145). BNIP3 düzeylerindeki artışın fizyolojik durumlarda mitofaji sürecinde artarken, hipoksi gibi patolojik durumlarda ise apoptoza bağlı olarak gerçekleşebileceği rapor edilmiştir (146). Ayrıca, Unc-51 gibi otofaji aktive edici kinaz 1 (Ulk1)' in aşırı ekspresyonunun, FUNDC1'in aktivasyonunu arttırdığı ve bu modülasyonun mitofajiyi destekleyerek sinir hücrelerini hipoksiye bağlı apoptozdan koruduğu rapor edilmiştir (74). Çalışmamızda IR hasarı ile tüm mitofaji yolları aktif hale gelerek Parkin-PINK1, BNIP3 ve FUNDC1 düzeyleri arttı; PostC, RePostC ve melatonin tedavileri ile ise Parkin/PINK1 düzeyleri değişmezken, BNIP3 ve FUNDC1 düzeyleri azaldı ve nükleer yapı korundu. Bizim çalışmamızda her ne kadar Parkin ve PINK1 düzeylerinde tedaviye bağlı ekstra artış gözlenmemişse de diğer çalışmaların verileri ile birlikte değerlendirildiğinde Parkin/PINK1'e bağlı mitofajinin sağkalımı desteklediği, FUNDC1' bağlı mitofaji artışının hücreyi apoptozdan koruduğu, BNIP3 düzeylerindeki artışın ise apoptoz kaynaklı olup hücrel hasara neden olabileceği düşünülebilir.

Farklı mitofaji yollarında görevli proteinlerin hücrenin apoptotik sürecinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Parkin'in, mitofaji sırasında BAX'ın mitokondriyal lokalizasyonunu önleyerek ve BAK ubiquitinleşmesini sağlayarak apoptotik fonksiyonlarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (147). Benzer şekilde, Parkin delesyonunun sıçan hipokampal nöral kök hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (148). Ayrıca Parkin'in hayatta kalma yanlısı Bcl-2 ailesi üyesi Mcl-1'i parçalayarak ciddi mitokondriyal hasar durumunda hücre ölümünü teşvik edebileceği

de gösterilmiştir (149). Bu durum Parkin'in, mitokondriyal hasarın derecesine bağlı olarak yaşamı veya ölümü destekleyen yollar arasında dengeyi değiştirebileceğini düşündürmektedir. BNIP3 proapoptotik mitokondriyal protein olarak kabul edilir. Bcl-2 proapoptotik proteininin inhibe etme, Bax ve LC3 ile etkileşen bölge aracılı mitofajiyi aktive etme görevlerine sahip olduğunu gösterilmiştir (71). Apoptoz ve mitofaji arasındaki BNIP3 fonksiyonunun değişimi belirsizdir. Bellot ve ark (69), proteinler Bcl-2/Bcl-XL için BNIP3 BH3 peptitlerinin afinitesinin, otofaji yerine hücre ölümünü tetikleyemeyecek kadar düşük olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışma, BNIP3'ün LC3 ile etkileşen bölgesinin, sitokrom c salınımından önce mitokondriyi hedefleyerek mitofajiyi indüklediğini ve böylece hücrel sitokrom c salım kapasitesini azalttığını göstermiştir (150). Ayrıca hipoksi altında, BNIP3-siRNA ile transfekte edilen hücreler ise kontrolden daha düşük bir apoptoz oranı sergilemiş ve BNIP3 tarafından indüklenen apoptozun, kaspazdan bağımsız olduğu rapor edilmiştir. MA uygulanması, BNIP3 kaynaklı hücre apoptozunu ve ölümünü artırabileceği ve mitofajinin hipoksida koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir (150). Çalışmamızda DAPI boyama ile IR'ye maruz serebral dokularda apoptotik çekirdeklerin varlığı dikkat çekti. Bu çekirdekler mitofajide görevli yollardan herhangi birinin strese bağlı olarak apoptoz yönüne eğilimi ile ilişkili olabilir. Bunlara ek olarak, kardiyak iskeminin FUNDC1 defosforilasyonunu değiştirerek mitofajiyi aktive ettiği ve hasarlı mitokondri ve sitokrom-c'yi elimine ettiği, reperfüzyonda ise, FUNDC1 aktivasyonunun azaldığı ve apoptoz olasılığını artıran mitofajiyi azaltan ve nekroptoz ana medyatörlerinden olan Ripk3 ekspresyonunu arttığı rapor edilmiştir (136). Buna göre, mitofaji medyatörleri apoptoz ve otofaji

arasındaki dengenin yanısıra nekroptoz modülasyonu ile de hücresel denge sağlayabilir.

Sonuç

- Parkin-PINK1, FUNDC1 ve BNIP3 protein ekspresyon düzeylerinin artışı OSA oklüzyonuna bağlı serebral IR ile tüm mitofaji yolaklarının aktif olduğunu gösterebilir.
- İskemik ardkoşullanma, uzak iskemik ardkoşullanma ve melatonin mitofaji yolaklarından FUNDC1 ve BNIP3 yolaklarını inhibe ederek koruyucu etki gösterebilir. IR ile FUNDC1 ve BNIP3 aracılı mitofaji artışının tedavilerle azalmış olması, bu yolakların reperfüzyon hasarına aracılık edebileceğini ve tedavi ile artışının sınırlandırılabilceğini düşündürebilir.
- IR ile artmış Parkin-PINK1 düzeylerinin tedavi uygulamaları ile korunması, bu mitofaji yolağının aktivasyonunun hücresel sağkalımı desteklediğini düşündürebilir.
- Klinik uygulanabilirliği oldukça kolay ve noninvaziv bir metod olan uzak iskemik ardkoşullanma, klasik ardkoşullanma kadar mitofaji mekanizmaları ve nöronal hasarda koruyuculuk sağlayabilir.
- Melatonin, ardkoşullanma metodları ile aynı mitofaji yolaklarını kullanarak koruyuculuk sağlayabilir ve farmakolojik ardkoşullanma yapan bir ajan olarak düşünülebilir.
- Serebral IR hasarına bağlı olarak artan BNP, IR hasarının teşhisinde ve tedavinin değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir biyobelirteç olabilir.

- Serebral IR hasarında kullanılan tedavilerin daha etkili olabilmesi için semptomlar başladıktan hemen sonra, mümkün olan en kısa sürede uygulanabilmesi büyük önem taşır. İnvaziv olmayan ve etkili gücü yüksek bir metod olan uzak iskemik ardkoşullanma ve melatonin klinik olarak uygulanabilirliği test edilebilir ve terapötik bir strateji olarak değerlendirilebilir.

Çalışmanın sınırlılıkları

Ardkoşullanma ve melatonin uygulamaları moleküler düzeyde ve nöronal hücre yoğunluğu açısından iyileşme/koruyuculuk sağlarken, bu etki davranış testleri aracılığı ile klinik tabloya yansımadı. Bu durum reperfüzyon süresinin 24 saatle sınırlı olmasından kaynaklanabilir (Reperfüzyon süresi mitofaji yollarında görevli Parkin ve Pink1 vs proteinlerin 24. saatte maksimum seviyeye ulaştığına dair literatür bilgisine bağlı olarak belirlendi).

Çalışmada göze çarpan apoptotik çekirdeklerin varlığı, mitofajide görevli yollardan herhangi birinin strese bağlı olarak apoptoza eğilimi ile ilişkili olabilir. Çalışmamızda, immunoflorosan boyama yöntemi olarak DAPI boyaması yapıldı. Beraberinde tunel boyama ve Bcl-2, kaspaz-9 vs düzeylerinin analizi ile mitofaji bağımlı/mitofajiden bağımsız apoptotik seyrin gözlenmemiş olması çalışmanın eksik yönleri olarak düşünülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. WHO | Top 10 causes of death [Internet]. WHO. World Health Organization; [a.yer 28 Mart 2020]. Erişim adresi: http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/
2. Türkiye İstatistik Kurumu, Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2018 [Internet]. [a.yer 30 Temmuz 2019]. Erişim adresi: <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30626>
3. Chugh C. Acute Ischemic Stroke: Management Approach. Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med. Haziran 2019;23(Suppl 2):S140-6.
4. Sağlık Bakanlığı TH. Akut İskemik İnme Tanı ve Tedavi Rehberi-2020. :75.
5. Fan Y-Y, Hu W-W, Nan F, Chen Z. Postconditioning-induced neuroprotection, mechanisms and applications in cerebral ischemia. Neurochem Int. Temmuz 2017;107:43-56.
6. Guan R, Zou W, Dai X, Yu X, Liu H, Chen Q, vd. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. J Biomed Sci. Aralık 2018;25(1):1-16.
7. Park SY, Koh HC. FUNDC1 regulates receptor-mediated mitophagy independently of the PINK1/Parkin-dependent pathway in rotenone-treated SH-SY5Y cells. Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc. Mart 2020;137:111163.
8. Yu Z, Lin L, Wang X. Chapter 24 - Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury and Hemorrhagic Transformation in the Brain. İçinde: Caplan LR, Biller J, Leary MC, Lo EH, Thomas AJ, Yenari M, vd., editörler. Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2017. s. 121-4.
9. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, vd. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. Cell Physiol Biochem. 2018;46(4):1650-67.
10. Hahn CD, Manlhiot C, Schmidt MR, Nielsen TT, Redington AN. Remote ischemic per-conditioning: a novel therapy for acute stroke? Stroke. Ekim 2011;42(10):2960-2.
11. Wang Y, Reis C, Applegate R, Stier G, Martin R, Zhang JH. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. Exp Neurol. Ekim 2015;272:26-40.
12. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. Kasım 1986;74(5):1124-36.
13. Wang J, Zhu P, Li R, Ren J, Zhou H. Fundc1-dependent mitophagy is obligatory to ischemic preconditioning-conferred renoprotection in ischemic AKI via suppression of Drp1-mediated mitochondrial fission. Redox Biol;30.
14. Pignataro G, Cuomo O, Esposito E, Sirabella R, Di Renzo G, Annunziato L. ASIC1a contributes to neuroprotection elicited by ischemic preconditioning and postconditioning. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2011;3(1):1-8.

15. Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, vd. "Ischemic tolerance" phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res.* 1991;561(2):203-11.
16. Vinten-Johansen J, Shi W. Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16(3-4):260-6.
17. Esposito E, Desai R, Ji X, Lo EH. Pharmacologic pre- and postconditioning for stroke: Basic mechanisms and translational opportunity. *Brain Circ.* 2015;1(1):104.
18. Xu Y, Xue H, Zhao P, Yang Y, Ji G, Yu W, vd. Isoflurane postconditioning induces concentration- and timing-dependent neuroprotection partly mediated by the GluR2 AMPA receptor in neonatal rats after brain hypoxia-ischemia. *J Anesth.* 2016;30(3):427-36.
19. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.* 1993;15(2):59-69.
20. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998;78(3):687-721.
21. Makomela NM. [Elements of system semiotics of the brain and head with cranial vessels of patients with stroke and with risk of stroke development]. *Lik Sprava.* 2007;(3):47-50.
22. Paterniti I, Cordaro M, Esposito E, Cuzzocrea S. The antioxidative property of melatonin against brain ischemia. *Expert Rev Neurother.* 2016;16(7):841-8.
23. Sahna E, Parlakpınar H, Ozer MK, Ozturk F, Ozugurlu F, Acet A. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res.* 2003;35(4):257-61.
24. Ma Z, Xin Z, Di W, Yan X, Li X, Reiter RJ, vd. Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017;74(21):3989-98.
25. Han Y, Zhang S, Wang X, Wu J. Inhibition of mitochondria responsible for the anti-apoptotic effects of melatonin during ischemia-reperfusion. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(2):142-7.
26. Liu L, Chen H, Jin J, Tang Z, Yin P, Zhong D, vd. Melatonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through SIRT3 activation. *Life Sci.* 2019;239:117036.
27. Andrabi SS, Parvez S, Tabassum H. Melatonin and Ischemic Stroke: Mechanistic Roles and Action [Internet]. C. 2015, *Advances in Pharmacological Sciences.* Hindawi; 2015 s. e384750.
28. Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, vd. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2014;34(8):2967-78.

29. Duan Q, Wang Z, Lu T, Chen J, Wang X. Comparison of 6-hydroxymelatonin or melatonin in protecting neurons against ischemia/reperfusion-mediated injury. *J Pineal Res.* 2006;41(4):351-7.
30. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, vd. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H579-588.
31. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(9):1114-21.
32. Ekström K, Dalsgaard M, Iversen K, Pedersen-Bjergaard U, Vejlstrup N, Diemar SS, vd. Effects of liraglutide and ischemic postconditioning on myocardial salvage after I/R injury in pigs. *Scand Cardiovasc J SCJ.* 2017;51(1):8-14.
33. Joo SP, Xie W, Xiong X, Xu B, Zhao H. Ischemic postconditioning protects against focal cerebral ischemia by inhibiting brain inflammation while attenuating peripheral lymphopenia in mice. *Neuroscience.* 2013;243:149-57.
34. Pan J, Li X, Peng Y. Remote ischemic conditioning for acute ischemic stroke: dawn in the darkness. *Rev Neurosci.* 01 2016;27(5):501-10.
35. Ezepeue CJ, Hess DC. Remote Ischemic Conditioning: A Highly Translatable Therapy for Acute Stroke. İçinde: Lapchak PA, Zhang JH, editörler. *Neuroprotective Therapy for Stroke and Ischemic Disease.* s. 459-76.
36. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, vd. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2009;117(5):191-200.
37. Ren C, Yan Z, Wei D, Gao X, Chen X, Zhao H. Limb remote ischemic postconditioning protects against focal ischemia in rats. *Brain Res.* 2009;1288:88-94.
38. Malhotra S, Naggar I, Stewart M, Rosenbaum DM. Neurogenic pathway mediated remote preconditioning protects the brain from transient focal ischemic injury. *Brain Res.* 2011;1386:184-90.
39. Sun Z, Baker W, Hiraki T, Greenberg JH. The effect of right vagus nerve stimulation on focal cerebral ischemia: an experimental study in the rat. *Brain Stimulat.* 2012;5(1):1-10.
40. Henninger N, Fisher M. Stimulating circle of Willis nerve fibers preserves the diffusion-perfusion mismatch in experimental stroke. *Stroke.* 2007;38(10):2779-86.
41. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MMH, Cherepanov V, vd. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics.* 2004;19(1):143-50.
42. Liu Z-J, Chen C, Li X-R, Ran Y-Y, Xu T, Zhang Y, vd. Remote Ischemic Preconditioning-Mediated Neuroprotection against Stroke is Associated with

Significant Alterations in Peripheral Immune Responses. *CNS Neurosci Ther.* 2016;22(1):43-52.

43. Fan Y-Y, Zhang X-N, He P, Shen Z, Shen Y, Wang X-F, vd. Transient lack of glucose but not O₂ is involved in ischemic postconditioning-induced neuroprotection. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(1):30-7.
44. Saransaari P, Oja SS. GABA release under normal and ischemic conditions. *Neurochem Res.* 2008;33(5):962-9.
45. Liu J, Xu Q, Wang H, Wang R, Hou X-Y. Neuroprotection of ischemic postconditioning by downregulating the postsynaptic signaling mediated by kainate receptors. *Stroke.* 2013;44(7):2031-5.
46. Kong Y, Rogers MR, Qin X. Effective neuroprotection by ischemic postconditioning is associated with a decreased expression of RGMa and inflammation mediators in ischemic rats. *Neurochem Res.* 2013;38(4):815-25.
47. Wang Y, Ge P, Yang L, Wu C, Zha H, Luo T, vd. Protection of ischemic post conditioning against transient focal ischemia-induced brain damage is associated with inhibition of neuroinflammation via modulation of TLR2 and TLR4 pathways. *J Neuroinflammation.* 2014;11:15.
48. Wei D, Xiong X, Zhao H. Tim-3 cell signaling and iNOS are involved in the protective effects of ischemic postconditioning against focal ischemia in rats. *Metab Brain Dis.* 2015;30(2):483-90.
49. Zhao H, Wang R, Tao Z, Gao L, Yan F, Gao Z, vd. Ischemic postconditioning relieves cerebral ischemia and reperfusion injury through activating T-LAK cell-originated protein kinase/protein kinase B pathway in rats. *Stroke.* 2014;45(8):2417-24.
50. Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordonez AN, Ashley MD, Xiong Z, vd. In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(2):232-41.
51. Gao L, Jiang T, Guo J, Liu Y, Cui G, Gu L, vd. Inhibition of autophagy contributes to ischemic postconditioning-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats. *PloS One.* 2012;7(9):e46092.
52. Liang J, Luan Y, Lu B, Zhang H, Luo Y, Ge P. Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF- κ B/p65 activation. *PloS One.* 2014;9(5):e96734.
53. Han D, Zhang S, Fan B, Wen L-L, Sun M, Zhang H, vd. Ischemic postconditioning protects the neurovascular unit after focal cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Mol Neurosci MN.* 2014;53(1):50-8.
54. Han D, Sun M, He P-P, Wen L-L, Zhang H, Feng J. Ischemic Postconditioning Alleviates Brain Edema After Focal Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats Through Down-Regulation of Aquaporin-4. *J Mol Neurosci MN.* 2015;56(3):722-9.

55. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* 2012;22(1):43-61.
56. Delbridge LMD, Mellor KM, Taylor DJR, Gottlieb RA. Myocardial autophagic energy stress responses--macroautophagy, mitophagy, and glycophagy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308(10):H1194-1204.
57. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1542-52.
58. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):124-31.
59. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011;147(4):728-41.
60. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(12):872-84.
61. Tang Y-C, Tian H-X, Yi T, Chen H-B. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein Cell.* 2016;7(10):699-713.
62. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1817(10):1833-8.
63. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 2005;8(1):3-5.
64. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):9-14.
65. Rodriguez-Enriquez S, Kai Y, Maldonado E, Currin RT, Lemasters JJ. Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes. *Autophagy.* 2009;5(8):1099-106.
66. Chen Y, Dorn GW. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science.* 2013;340(6131):471-5.
67. Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon S-K, Lee S-H, vd. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(3):975-80.
68. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, vd. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 2015;524(7565):309-14.
69. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, vd. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol.* 2009;29(10):2570-81.

70. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, vd. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10892-903.
71. Choe SC, Hamacher-Brady A, Brady NR. Autophagy capacity and sub-mitochondrial heterogeneity shape Bnip3-induced mitophagy regulation of apoptosis. *Cell Commun Signal CCS*. 2015;13.
72. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, vd. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 2007;6(6):458-71.
73. Li W, Zhang X, Zhuang H, Chen H, Chen Y, Tian W, vd. MicroRNA-137 is a novel hypoxia-responsive microRNA that inhibits mitophagy via regulation of two mitophagy receptors FUNDC1 and NIX. *J Biol Chem*. 2014;289(15):10691-701.
74. Wang L, Wang P, Dong H, Wang S, Chu H, Yan W, vd. Ulk1/FUNDC1 Prevents Nerve Cells from Hypoxia-Induced Apoptosis by Promoting Cell Autophagy. *Neurochem Res*. 2018;43(8):1539-48.
75. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, vd. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2012;14(2):177-85.
76. Wu W, Li W, Chen H, Jiang L, Zhu R, Feng D. FUNDC1 is a novel mitochondrial-associated-membrane (MAM) protein required for hypoxia-induced mitochondrial fission and mitophagy. *Autophagy*. 2016;12(9):1675-6.
77. Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 006;50(2):198-207.
78. McGirt MJ, Blessing R, Nimjee SM, Friedman AH, Alexander MJ, Laskowitz DT, vd. Correlation of serum brain natriuretic peptide with hyponatremia and delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2004;54(6):1369-73.
79. Tomita H, Metoki N, Saitoh G, Ashitate T, Echizen T, Katoh C, vd. Elevated plasma brain natriuretic peptide levels independent of heart disease in acute ischemic stroke: correlation with stroke severity. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens*. 2008;31(9):1695-702.
80. Goetze JP, Gore A, Møller CH, Steinbrüchel DA, Rehfeld JF, Nielsen LB. Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2004;18(15):1928-30.
81. James ML, Wang H, Venkatraman T, Song P, Lascola CD, Laskowitz DT. Brain natriuretic peptide improves long-term functional recovery after acute CNS injury in mice. *J Neurotrauma*. 2010;27(1):217-28.
82. Osmon KJ, Vyas M, Woodley E, Thompson P, Walia JS. Battery of Behavioral Tests Assessing General Locomotion, Muscular Strength, and Coordination in Mice. *J Vis Exp JoVE*. 2018;(131).

83. Shen H, Wang Y. Correlation of locomotor activity and brain infarction in rats with transient focal ischemia. *J Neurosci Methods*. 2010;186(2):150-4.
84. Borlongan CV, Hida H, Nishino H. Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery. *Neuroreport*. 1998;9(16):3615-21.
85. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Yoloğlu S. WSSPAS: An Interactive Web Application for Sample Size and Power Analysis with R Using Shiny. *Turk Klin J Biostat*. 2018;10(3):224-46.
86. Crupi R, Di Paola R, Esposito E, Cuzzocrea S. Middle Cerebral Artery Occlusion by an Intraluminal Suture Method. İçinde: Skaper SD, editör. *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 s. 393-401.
87. Melani A, Pantoni L, Corsi C, Bianchi L, Monopoli A, Bertorelli R, vd. Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke*. 1999;30(11):2448-54.
88. Belayev L, Endres M, Prinz V. Focal Cerebral Ischemia in the Mouse and Rat by Intraluminal Suture. İçinde: Dirnagl U, editör. *Rodent Models of Stroke* [Internet]. New York, NY: Springer; 2016. s. 31-43.
89. Abe T, Kunz A, Shimamura M, Zhou P, Anrather J, Iadecola C. The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(1):66-72.
90. Yun H-S, Park M-S, Ji E-S, Kim T-W, Ko I-G, Kim H-B, vd. Treadmill exercise ameliorates symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder through reducing Purkinje cell loss and astrocytic reaction in spontaneous hypertensive rats. *J Exerc Rehabil*. 2014;10(1):22-30.
91. Sweis BM, Bachour SP, Brekke JA, Gewirtz JC, Sadeghi-Bazargani H, Hevesi M, vd. A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behav Brain Res*. 2016;296:149-56.
92. Stroethoff M, Behmenburg F, Spittler K, Raupach A, Heinen A, Hollmann MW, vd. Activation of Melatonin Receptors by Ramelteon Induces Cardioprotection by Postconditioning in the Rat Heart. *Anesth Analg*. 2018;126(6):2112-5.
93. Aslan G, Gül HF, Tektemur A, Sahna E. Ischemic postconditioning reduced myocardial ischemia-reperfusion injury: The roles of melatonin and uncoupling protein 3. *Anatol J Cardiol*. 2020;23(1):19-27.
94. Gul-Kahraman K, Yilmaz-Bozoglan M, Sahna E. Physiological and pharmacological effects of melatonin on remote ischemic preconditioning after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats: Role of Cybb, Fas, NfκB, Irisin signaling pathway. *J Pineal Res*. 2019;67(2):e12589.
95. El-Abhar HS, Shaalan M, Barakat M, El-Denshary ES. Effect of melatonin and nifedipine on some antioxidant enzymes and different energy fuels in the blood and brain of global ischemic rats. *J Pineal Res*. 2002;33(2):87-94.

96. Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N, Fukaya T. Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain. *J Pineal Res.* 2001;31(2):167-72.
97. Chumboatong W, Khamchai S, Tocharus C, Govitrapong P, Tocharus J. Agomelatine protects against permanent cerebral ischaemia via the Nrf2-HO-1 pathway. *Eur J Pharmacol.* 2020;874:173028.
98. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res.* 2001;125(1-2):141-9.
99. Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(3):330-8.
100. Li J, Henman MC, Tatlisumak T, Shaw GG, Doyle KM. The pre-ischaemic neuroprotective effects of N1-dansyl-spermine in a transient focal cerebral ischaemia model in mice. *Brain Res.* 2005;1055(1-2):180-5.
101. Mutoh T, Mutoh T, Nakamura K, Yamamoto Y, Tsuru Y, Tsubone H, vd. Acute cardiac support with intravenous milrinone promotes recovery from early brain injury in a murine model of severe subarachnoid haemorrhage. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(4):463-9.
102. Martínez-Díaz JA, García LI, Hernández ME, Aranda-Abreu GE. Effects on locomotion and memory in 2 models of cerebral hypoperfusion in male Wistar rats. *Neurol Engl Ed.* 2015;30(7):407-15.
103. Manwani B, Liu F, Xu Y, Persky R, Li J, McCullough LD. Functional recovery in aging mice after experimental stroke. *Brain Behav Immun.* 2011;25(8):1689-700.
104. Song S-H, Jee Y-S, Ko I-G, Lee S-W, Sim Y-J, Kim D-Y, vd. Treadmill exercise and wheel exercise improve motor function by suppressing apoptotic neuronal cell death in brain inflammation rats. *J Exerc Rehabil.* 2018;14(6):911-9.
105. Guo Y-B, Ji T-F, Zhou H-W, Yu J-L. Effects of microRNA-21 on Nerve Cell Regeneration and Neural Function Recovery in Diabetes Mellitus Combined with Cerebral Infarction Rats by Targeting PDCD4. *Mol Neurobiol.* 2018;55(3):2494-505.
106. Hu X, Lv T, Yang S-F, Zhang X-H, Miao Y-F. Limb remote ischemic post-conditioning reduces injury and improves long-term behavioral recovery in rats following subarachnoid hemorrhage: Possible involvement of the autophagic process. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):21-30.
107. Kawai K, Nitecka L, Ruetzler CA, Nagashima G, Joó F, Mies G, vd. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12(2):238-49.
108. Lin CS, Polsky K, Nadler JV, Crain BJ. Selective neocortical and thalamic cell death in the gerbil after transient ischemia. *Neuroscience.* 1990;35(2):289-99.

109. Kaufmann D, Theriot JJ, Zyuzin J, Service CA, Chang JC, Tang YT, vd. Heterogeneous incidence and propagation of spreading depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(5):1748-62.
110. Joshi I, Andrew RD. Imaging anoxic depolarization during ischemia-like conditions in the mouse hemi-brain slice. *J Neurophysiol*. 2001;85(1):414-24.
111. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Dergipark.org*. 2011; 20:145
112. Chazotte B. Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harb Protoc*. ;2011(1):pdb.prot5556.
113. Sun Y, Zhang T, Zhang Y, Li J, Jin L, Sun Y, vd. Ischemic Postconditioning Alleviates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Through Activating Autophagy During Early Reperfusion in Rats. *Neurochem Res*. 01 Eylül 2018;43(9):1826-40.
114. Zhao Y, Wang H, Chen W, Chen L, Liu D, Wang X, vd. Melatonin attenuates white matter damage after focal brain ischemia in rats by regulating the TLR4/NF-κB pathway. *Brain Res Bull*. 2019;150:168-78.
115. Modrego PJ, Boned B, Berlanga JJ, Serrano M. Plasmatic B-Type Natriuretic Peptide and C-Reactive Protein in Hyperacute Stroke as Markers of Evidence of Brain Edema. *Int J Med Sci*. 2008;5(1):18-23.
116. Abdel-Rahman RF, El Awdan SA, Hegazy RR, Mansour DF, Ogaly HA, Abdelbaset M. Neuroprotective effect of *Crocus sativus* against cerebral ischemia in rats. *Metab Brain Dis*. 2020;35(3):427-39.
117. Wang H, Niu F, Fan W, Shi J, Zhang J, Li B. Modulating effects of preconditioning exercise in the expression of ET-1 and BNP via HIF-1α in ischemically injured brain. *Metab Brain Dis*. 2019;34(5):1299-311.
118. Taub PR, Fields JD, Wu AHB, Miss JC, Lawton MT, Smith WS, vd. Elevated BNP is Associated with Vasospasm-Independent Cerebral Infarction Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2011;15(1):13-8.
119. Vesely DL, Bold AJ de. Cardiac Natriuretic Peptides Gene Expression and Secretion in Inflammation. *J Investig Med*. 2009;57(1):29-32.
120. Talha S, Bouitbir J, Charles A-L, Zoll J, Goette-Di Marco P, Meziani F, vd. Pretreatment with brain natriuretic peptide reduces skeletal muscle mitochondrial dysfunction and oxidative stress after ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2013;114(2):172-9.
121. Wilhide ME, Jones WK. Potential therapeutic gene for the treatment of ischemic disease: Ad2/hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1)/VP16 enhances B-type natriuretic peptide gene expression via a HIF-1-responsive element. *Mol Pharmacol*. 2006;69(6):1773-8.
122. Sun Y, Zhang Y, Yan M, Wu Y, Zheng X. B-type natriuretic peptide-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(9):1545-51.

123. Lan R, Wu J-T, Wu T, Ma Y-Z, Wang B-Q, Zheng H-Z, vd. Mitophagy is activated in brain damage induced by cerebral ischemia and reperfusion via the PINK1/Parkin/p62 signalling pathway. *Brain Res Bull.* 2018;142:63-77.
124. Wen Y, Gu Y, Tang X, Hu Z. PINK1 overexpression protects against cerebral ischemia through Parkin regulation. *Environ Toxicol.* 2020;35(2):188-93.
125. Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 2008;183(5):795-803.
126. Shen Z, Zheng Y, Wu J, Chen Y, Wu X, Zhou Y, vd. PARK2-dependent mitophagy induced by acidic postconditioning protects against focal cerebral ischemia and extends the reperfusion window. *Autophagy.* 2017;13(3):473-85.
127. Bi W, Jia J, Pang R, Nie C, Han J, Ding Z, vd. Thyroid hormone postconditioning protects hearts from ischemia/reperfusion through reinforcing mitophagy. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2019;118:109220.
128. Zhou M, Xia Z-Y, Lei S-Q, Leng Y, Xue R. Role of mitophagy regulated by Parkin/DJ-1 in remote ischemic postconditioning-induced mitigation of focal cerebral ischemia-reperfusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(24):4866-71.
129. Cao S, Shrestha S, Li J, Yu X, Chen J, Yan F, vd. Melatonin-mediated mitophagy protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep [Internet].* 2017: 234-245
130. Zhang Z, Yang X, Zhang S, Ma X, Kong J. BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia. *Stroke.* 2007;38(5):1606-13.
131. Lu J, Jiang Z, Chen Y, Zhou C, Chen C. Knockout of programmed cell death 5 (PDCD5) gene attenuates neuron injury after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 2016;1650:152-61.
132. Mu J, Weng J, Yang C, Guan T, Deng L, Li M, vd. Necrostatin-1 prevents the proapoptotic protein Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3 from integration into mitochondria. *J Neurochem.* 2020; 257-65.
133. Shi R, Zhu S, Li V, Gibson SB, Xu X, Kong J. BNIP3 Interacting with LC3 Triggers Excessive Mitophagy in Delayed Neuronal Death in Stroke. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20(12):1045-55.
134. Martínez M-A, Rodríguez J-L, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga M-R, Anadón A, vd. Oxidative stress and related gene expression effects of cyfluthrin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Protective effect of melatonin. *Environ Res.* 2019;177:108579.
135. Su S-H, Wu Y-F, Wang D-P, Hai J. Inhibition of excessive autophagy and mitophagy mediates neuroprotective effects of URB597 against chronic cerebral hypoperfusion. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):733.

136. Zhou H, Zhu P, Guo J, Hu N, Wang S, Li D, vd. Ripk3 induces mitochondrial apoptosis via inhibition of FUNDC1 mitophagy in cardiac IR injury. *Redox Biol.* 2017;13:498-507.
137. Zhou H, Li D, Zhu P, Hu S, Hu N, Ma S, vd. Melatonin suppresses platelet activation and function against cardiac ischemia/reperfusion injury via PPAR γ /FUNDC1/mitophagy pathways. *J Pineal Res.* 2017;63(4).
138. Wen W, Yu G, Liu W, Gu L, Chu J, Zhou X, vd. Silencing FUNDC1 alleviates chronic obstructive pulmonary disease by inhibiting mitochondrial autophagy and bronchial epithelium cell apoptosis under hypoxic environment. *J Cell Biochem.* 2019;120(10):17602-15.
139. Kubli DA, Cortez MQ, Moyzis AG, Najor RH, Lee Y, Gustafsson ÅB. PINK1 Is Dispensable for Mitochondrial Recruitment of Parkin and Activation of Mitophagy in Cardiac Myocytes. *PLoS ONE.* 2015;10(6):361-69.
140. Lee Y, Lee H-Y, Hanna RA, Gustafsson ÅB. Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2011;301(5):H1924-31.
141. Zhang T, Xue L, Li L, Tang C, Wan Z, Wang R, vd. BNIP3 Protein Suppresses PINK1 Kinase Proteolytic Cleavage to Promote Mitophagy. *J Biol Chem.* 2016;291(41):21616-29.
142. Lampert MA, Orogo AM, Najor RH, Hammerling BC, Leon LJ, Wang BJ, vd. BNIP3L/NIX and FUNDC1-mediated mitophagy is required for mitochondrial network remodeling during cardiac progenitor cell differentiation. *Autophagy.* 2019;15(7):1182-98.
143. Lazarou M, Narendra DP, Jin SM, Tekle E, Banerjee S, Youle RJ. PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *J Cell Biol.* 2013;200(2):163-72.
144. Baek S-H, Noh AR, Kim K-A, Akram M, Shin Y-J, Kim E-S, vd. Modulation of mitochondrial function and autophagy mediates carnosine neuroprotection against ischemic brain damage. *Stroke.* 2014;45(8):2438-43.
145. S G, Km H, D S, Fc F, Oc R, Pj K, vd. PINK1/Parkin-mediated Mitophagy Is Dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [Internet]. C. 12, Nature cell biology. *Nat Cell Biol*; 2010
146. Moulis MF, Millet AM, Daloyau M, Miquel M-C, Ronsin B, Wissinger B, vd. OPA1 haploinsufficiency induces a BNIP3-dependent decrease in mitophagy in neurons: relevance to Dominant Optic Atrophy. *J Neurochem.* 2017;140(3):485-94.
147. Bernardini JP, Brouwer JM, Tan IK, Sandow JJ, Huang S, Stafford CA, vd. Parkin inhibits BAK and BAX apoptotic function by distinct mechanisms during mitophagy. *EMBO J.* 2019;38(2).
148. Park H, Chung KM, An H-K, Gim J-E, Hong J, Woo H, vd. Parkin Promotes Mitophagic Cell Death in Adult Hippocampal Neural Stem Cells Following Insulin Withdrawal. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2019;12.

149. Carroll RG, Hollville E, Martin SJ. Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1. *Cell Rep.* 20 Kasım 2014;9(4):1538-53.
150. Ma Z, Chen C, Tang P, Zhang H, Yue J, Yu Z. BNIP3 induces apoptosis and protective autophagy under hypoxia in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: BNIP3 regulates cell death. *Dis Esophagus Off J Int Soc Dis Esophagus.* 2017;30(9):1-8.



8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Samsun/Vezirköprü’ de doğdum. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans eğitimini tamamlayarak Vezirköprü Devlet Hastanesi’nde çalışmaya başladım. 2013 yılında başlamış olduğum Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’ndaki yüksek lisans eğitimini 2016 yılında tamamlayarak doktora eğitimine başladım. Aynı zamanda Elazığ Fethi Sekin Şehir Hastanesi’nde çalışma hayatına devam etmekteyim.

